

# Tekuća biopsija u dijagnostici malignih bolesti

---

Klarin, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:727620>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



**Tea Klarin**

**Primjena tekuće biopsije u dijagnostici  
malignih bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Biokemija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Karmeli Barišić na potpori, stručnom vodstvu i savjetima te strpljenju prilikom izrade diplomskog rada. Posebnu zahvalnost iskazujem mojim roditeljima na razumijevanju, potpori i pruženoj ljubavi tijekom studija. Veliko hvala svim prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane i bili podrška tijekom studija.

# SADRŽAJ

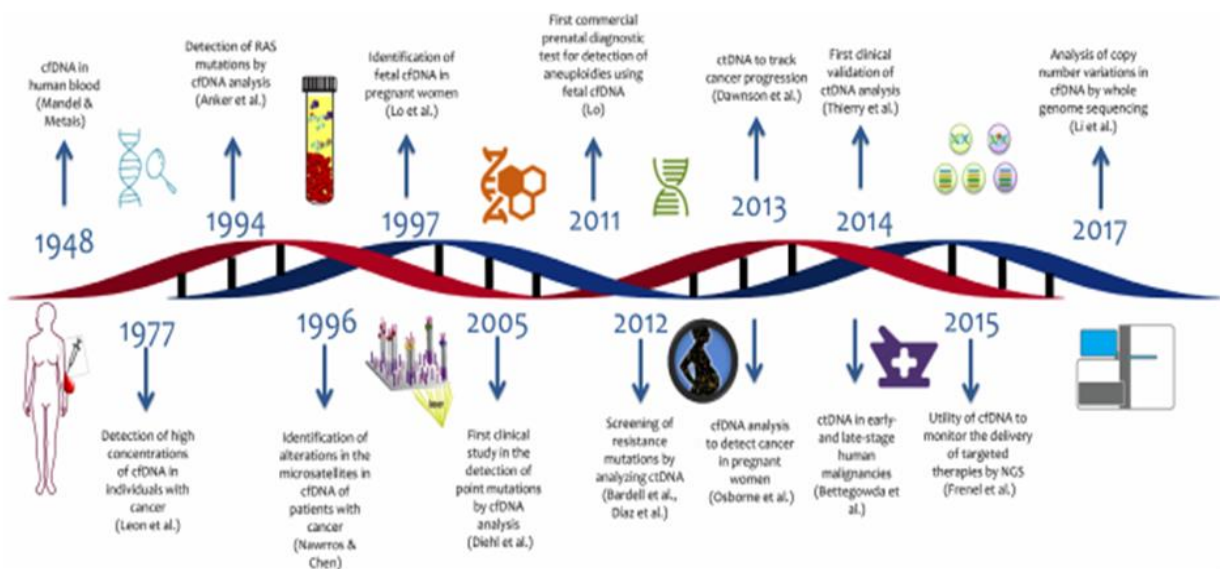
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Povijest razvoja tekuće biopsije .....	1
1.2. Usporedba tekuće biopsije i biopsije tkiva .....	2
1.3. Biljezi u tekućoj biopsiji .....	3
1.3.1. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC).....	4
1.3.2. Slobodna cirkulirajuća DNA (cf DNA) .....	8
1.3.3. Egzosomi .....	9
1.3.4. MikroRNA molekule .....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>17</b>
<b>4. RASPRAVA I REZULTATI .....</b>	<b>18</b>
4.1. Tekuća biopsija u dijagnozi karcinoma dojke .....	18
4.1.1. Uloga egzosoma u liječenju, prognozi i dijagnozi karcinoma dojke.....	19
4.2. Primjena tekuće biopsije u dijagnostici karcinoma jajnika .....	22
4.2.1. Cirkulirajuće tumorske stanice u dijagnostici karcinoma jajnika .....	24
4.2.2. Izvanstanične vezikule – novi izvor biljega u liječenju karcinoma jajnika .....	24
4.3. Tekuća biopsija u dijagnozi i liječenju gastrointestinalnih karcinoma .....	26
4.3.1. Cirkulirajuće tumorske stanice kao prognostički čimbenik u dijagnozi karcinoma želuca .....	26
4.3.2. Cirkulirajuće tumorske stanice u dijagnozi karcinoma pankreasa.....	27
4.4. Tekuća biopsija u dijagnostici karcinoma pluća .....	28
4.4.1. CfDNA u dijagnostici karcinoma pluća.....	29
4.4.2. Genska metilacija cfDNA u ranoj dijagnozi karcinoma pluća .....	30
4.4.3. MikroRNA u prognozi karcinoma pluća .....	31
4.4.4. TEPs (engl. <i>tumor-educated platelets</i> ) - neinvazivni biljeg u dijagnozi karcinoma pluća .....	31
4.5. Koncept tekuće biopsije u dijagnozi glioblastoma.....	32

4.5.1.	Identifikacija biljega u cerebrospinalnoj tekućini (CSF).....	33
4.5.2.	Biljezi glioblastoma u urinu .....	34
4.5.3.	CftDNA u uzorcima krvi pacijenata oboljelih od glioblastoma .....	34
4.5.4.	Egzosomi – prognostički biljezi u dijagnozi glioblastoma .....	35
4.6.	Budućnost tekuće biopsije u prenatalnoj dijagnostici .....	37
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK /SUMMARY.....</b>	<b>48</b>
7.1.	Sažetak .....	48
7.2.	Summary .....	49
<b>8.</b>	<b>PRILOZI.....</b>	<b>50</b>
8.1.	Popis kratica.....	50
<b>9.</b>	<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD.....</b>	<b>53</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Povijest razvoja tekuće biopsije

Američki nacionalni institut za istraživanje tumora definirao je tekuću biopsiju kao „test učinjen na uzorku krvi“ koji traži tumorske stanice, koje cirkuliraju u krvi, ili dijelove DNA iz tumorskih stanica u krvi (Domínguez-Vigil i sur., 2018.). Tekuća biopsija predstavlja inovaciju na području onkološke dijagnostike. Neinvazivna je metoda kojom se iz uzorka krvi izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice (CTC), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA), cirkulirajući egzosomi ili mikroRNA (Periša i sur., 2017.). Prvi opis cfDNA datira iz 1948. godine. Međutim, tek 50 godina kasnije cfDNA je postigla visoku kliničku važnost u otkrivanju dijagnostičke fetalne DNA u uzorcima majčine krvi, stoga su tekuća biopsija i cfDNA postali standardna metoda u prenatalnoj dijagnozi. Prenatalnom dijagnozom rak je slučajno otkriven i dijagnosticiran identifikacijom mutacije u cfDNA. Tim otkrićem otvoren je put korištenju tekuće biopsije u dijagnozi tumora analizom genskih mutacija. Danas tekuća biopsija ima važnu ulogu u otkrivanju mutacija u genu za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) za ciljano liječenje karcinoma pluća ne-malih stanica (NSCLC) (Krašić i sur., 2018.).



Slika 1: Povijest razvoja tekuće biopsije (Domínguez-Vigil i sur., 2018.)

## 1.2. Usporedba tekuće biopsije i biopsije tkiva

Rak predstavlja drugi vodeći uzrok smrti u svijetu. Molekularno profiliranje tumora neophodno je za optimizaciju liječenja u kliničkoj praksi. Dijagnostičke strategije trenutno koriste uzorke tkiva za procjenu specifičnih biljega (Siravegna i sur., 2019.). Kirurške biopsije tj. biopsije tkiva i dalje dominiraju kao „zlatni standard“ za dijagnozu i izbor liječenja za bolesti genetskog i zaraznog podrijetla (Domínguez-Vigil i sur., 2017.).

Cilj tekuće biopsije je jednostavno, brzo i učinkovito praćenje stanja bolesti ili odgovora na liječenje. U usporedbi s biopsijom tkiva, tekuća je biopsija manje opterećujuća, jer je do tjelesnih tekućina, poput krvi, sline ili mokraće, puno lakše doći. Za neke bolesti, poput raka pluća, uzimanje biopsije tkiva često nije moguće zbog visokog rizika od krvarenja, ozljede živaca ili širenja bolesti. Također, biopsije tkiva ne odražavaju na odgovarajući način složeni molekularni profil primarnog tumora zbog prostorne heterogenosti (Neumann i sur., 2018.).

Postupak biopsije tkiva predstavlja rizično i bolno iskustvo za pacijenta te je u nekim slučajevima nepristupačnih tumora i nedostupno. Biopsija tumorskog tkiva može se primijeniti samo jedanput. Tekuća biopsija predstavlja analizu biljega u krvi te ima izvanredne prednosti u odnosu na tradicionalnu metodu: nema rizika, neinvazivna je i bezbolna, ne zahtijeva operaciju te smanjuje troškove i vrijeme dijagnoze, a ponovljiva je. Neinvazivno dobiveni elementi, derivati pune krvi poput CTC-a, cfDNA i egzosoma sadrže biljege specifične za solidni tumor. Osim toga, ovi cirkulirajući elementi podrijetlom iz tumora zrcale molekularne promjene u malignim stanicama i imaju ključnu ulogu i u razumijevanju metastaza i tumorigeneze, što bi moglo pružiti bolji uvid u razvoju tumorske dinamike tijekom liječenja i napredovanja bolesti (Marrugo-Ramírez i sur., 2018.).

**Tablica 1:** Usporedba tekuće biopsije i biopsije tkiva (preuzeto i prilagođeno iz članka „Recipe“, Andrašić., 2020.).

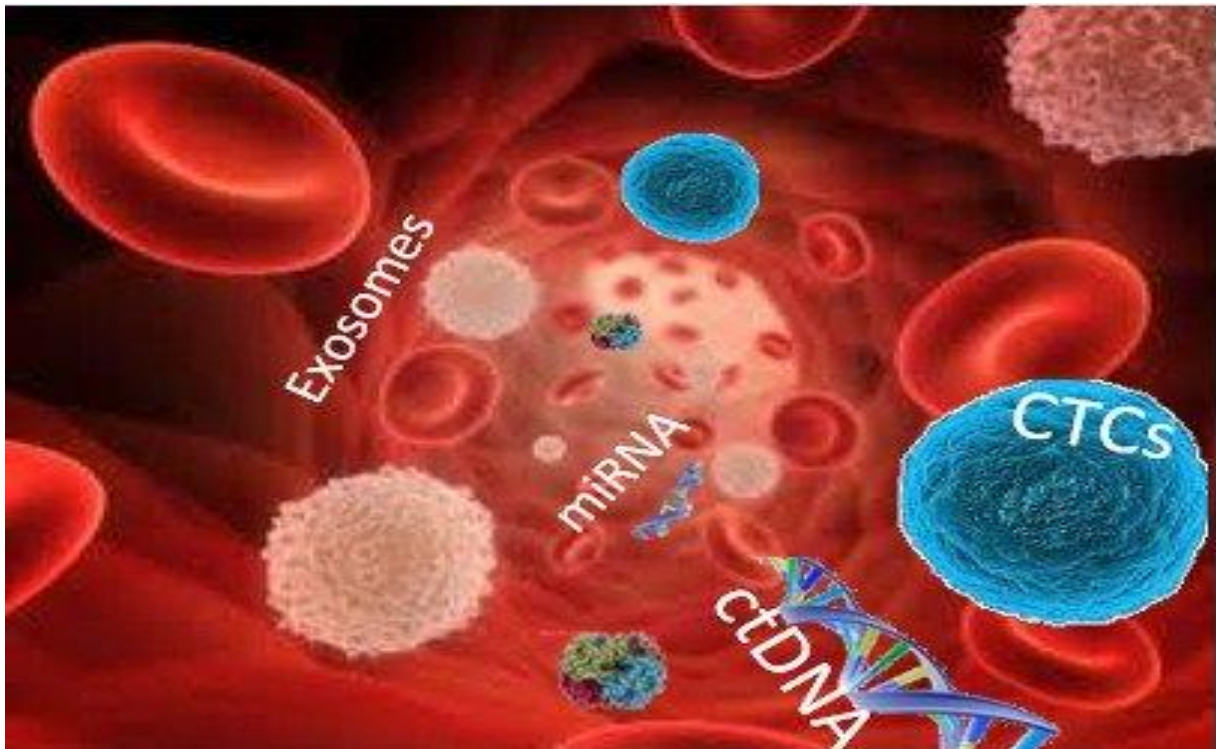
Karakteristike	Tekuća biopsija	Biopsija tkiva
Invazivnost	Minimalno invazivna	Invazivna
Razgradnja uzorka	Dugo čuvanje na -70°C	Umrežavanje i DNA fragmentacija
Rezidualni tumori	Da	Ne
Odgovor na terapiju	Da	Ne
Prognoza relapsa	Da	Ne
Kontinuirano dinamičko promatranje (monitoring)	Da	Ne
Količina biomaterija	3 ml periferne krvi	Ovisi o organu i tehnici
Probir	Moguć	Nije moguć
Broj tumorskih stanica za otkrivanje cftDNA	$5 \times 10^7$	$>10^9$

### 1.3. Biljezi u tekućoj biopsiji

Posljednjih nekoliko godina CTC, izvanstanične vezikulne strukture, koje se nazivaju egzosomi, te cfDNA i mikroRNA (miRNA), smatraju se glavnim elementima u konceptu tekuće biopsije. Pretpostavlja se da je brzi metabolizam tumorskih stanica uzrok stalnog oslobađanja nukleinskih kiselina, vezikula i CTC-a (Marrugo-Ramírez i sur., 2018.).



Ti elementi, koji vode podrijetlo iz tumorskih stanica, odlijevaju se u periferne tekućine s mjesta tumora tako da ih se može otkriti i analizirati u tjelesnim tekućinama s ciljem dobivanja boljeg molekuskoga profila tumora što značajno onda utječe na izbor terapije, praćenje i prognozu maligne bolesti.



**Slika 2:** Ključni biomarkeri u dijagnozi malignih bolesti metodom tekuće biopsije

(Marrugo-Ramírez i sur., 2018.)

### 1.3.1. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC)

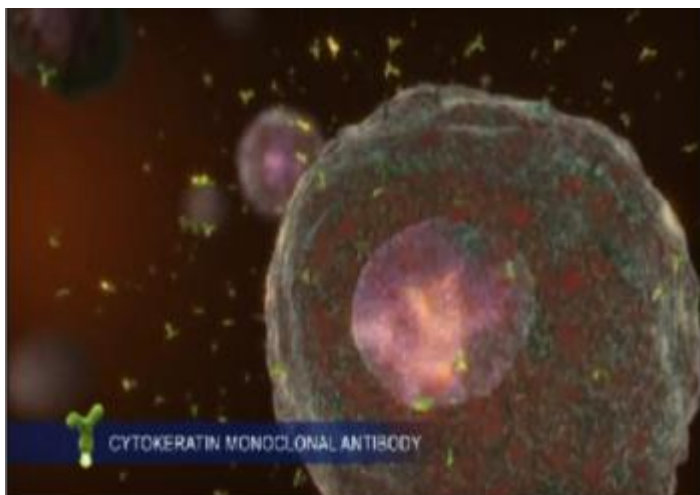
Prije gotovo 150 godina T. R. Ashworth prvi je put opisao epitelne stanice u krvi pacijenata oboljelih od metastatskog karcinoma (Krašić i sur., 2018.). CTC su posebno važne za metastatski proces u karcinomima te se smatra da čine "sjeme" za širenje metastatskog karcinoma u udaljene organe (Krašić i sur., 2018.). Metastaze čine glavni uzrok smrti pacijenata sa solidnim tumorima. CTC su znak progresije većine epitelnih tumora, uključujući karcinom dojke, prostate, jajnika, pluća, bubrega te kolorektalni karcinom (Redžović i sur., 2015.).

Predstavljaju rijetku staničnu populaciju u krvi, s obično manje od 10 stanica/ml te u „uspavanom“ stanju mogu preživjeti i do nekoliko godina u perifernoj krvi (Krašić i sur., 2018.). CTC su povezane s lošom prognozom te ukazuju na kraće preživljavanje u pacijenata s metastatskim karcinomom dojki, kolorektalnim karcinomom ili karcinomom prostate, koji imaju broj CTC-a  $\geq 5$  ili  $\geq 3$  po 7,5 ml krvi u bilo kojem trenutku tijekom bolesti (Domínguez-Vigil i Fsur., 2017.).

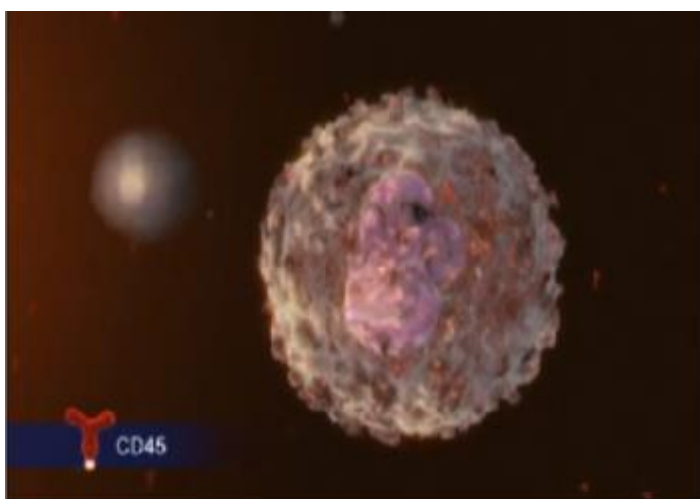
Uspostavljeno je više metoda izolacije CTC-a: metoda protočne citometrije i metoda lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom (CellSearch™). Protočna citometrija (engl. *flow cytometry*) je analitička metoda koja omogućuje multiparametarsku analizu pojedinačnih stanica u suspenziji. CTC prolaze pojedinačno pored laserske zrake te se na temelju rasapa svjetlosti i fluorescencije istovremeno određuje nekoliko parametara, poput veličine, zrnatosti i prisutnosti biljega (<https://nanocollect.com/blog/how-does-flow-cytometry-work/>). Sustav CellSearch® predstavlja automatizirani detekcijski sustav koji se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju CTC-a iz uzorka krvi. Pomoću imunomagnetske i fluorescentne tehnologije otkriva CTC epitelnog podrijetla (CD45-, EpCAM+, citokeratini+) s visokom razinom osjetljivosti i specifičnosti ([www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)).



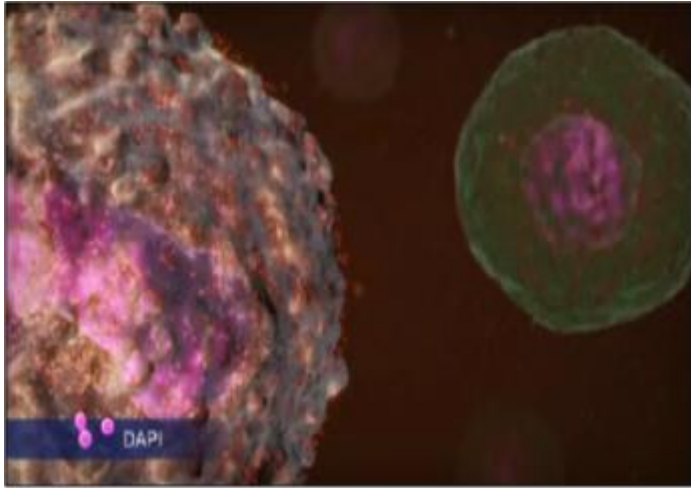
**Slika 3:** Uzorak krvi od 7,5 ml stavlja se u posebnu epruvetu te centrifugira kako bi se odvojile komponente krvi od plazme, a potom stavlja u sustav CELLTRACKS® AUTOPREP®. Korištenjem ferrofluidnih nanočestica s antitijelima molekule adhezije epitelnih stanica, CTC se magnetski odvajaju od većine ostalih stanica u krvi ([www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)).



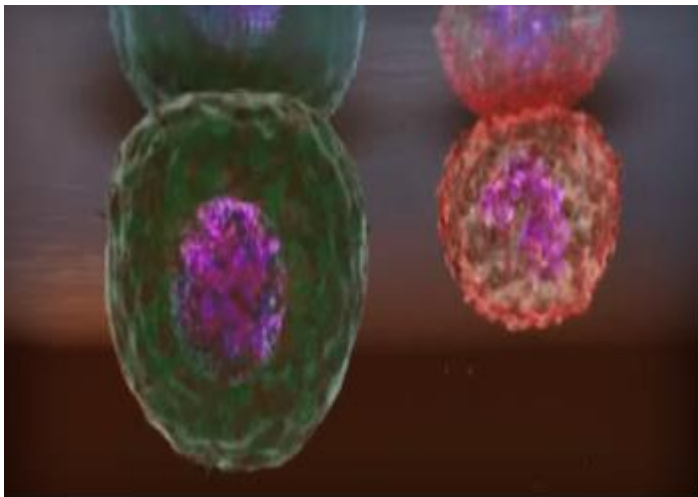
**Slika 4:** CTC se zatim boje monoklonskim antitijelima citokeratina koji su specifični za epitelne stanice ([www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)).



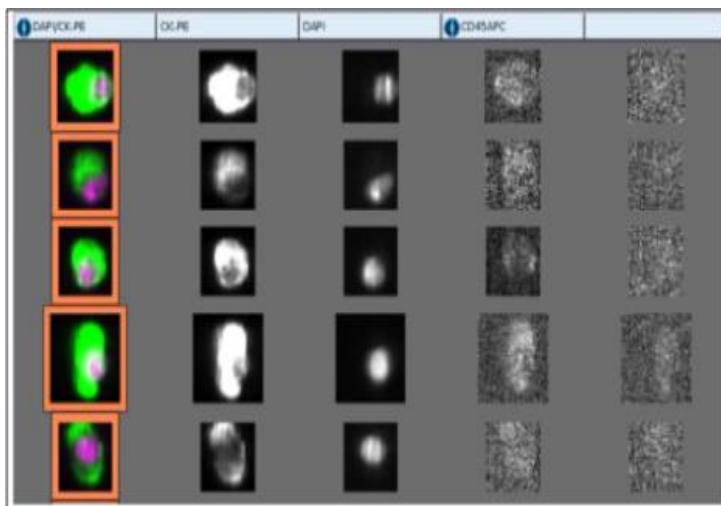
**Slika 5:** Monoklonska protutijela identificiraju biljeg CD45, koji je specifičan za leukocite te identificira sve leukocite koji su kontaminirali uzorak ([www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)).



**Slika 6:** U uzorak se dodaje DNA mrlja (DAPI), pomoću koje se ističu jezgre CTC-a i leukocita ([www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)).



**Slika 7:** Stanice se stavljaju u magnetni uložak u kojem magnetska sila povlači stanice na jednu žarišnu dubinu ([www.cellsearch.com](http://www.cellsearch.com)).

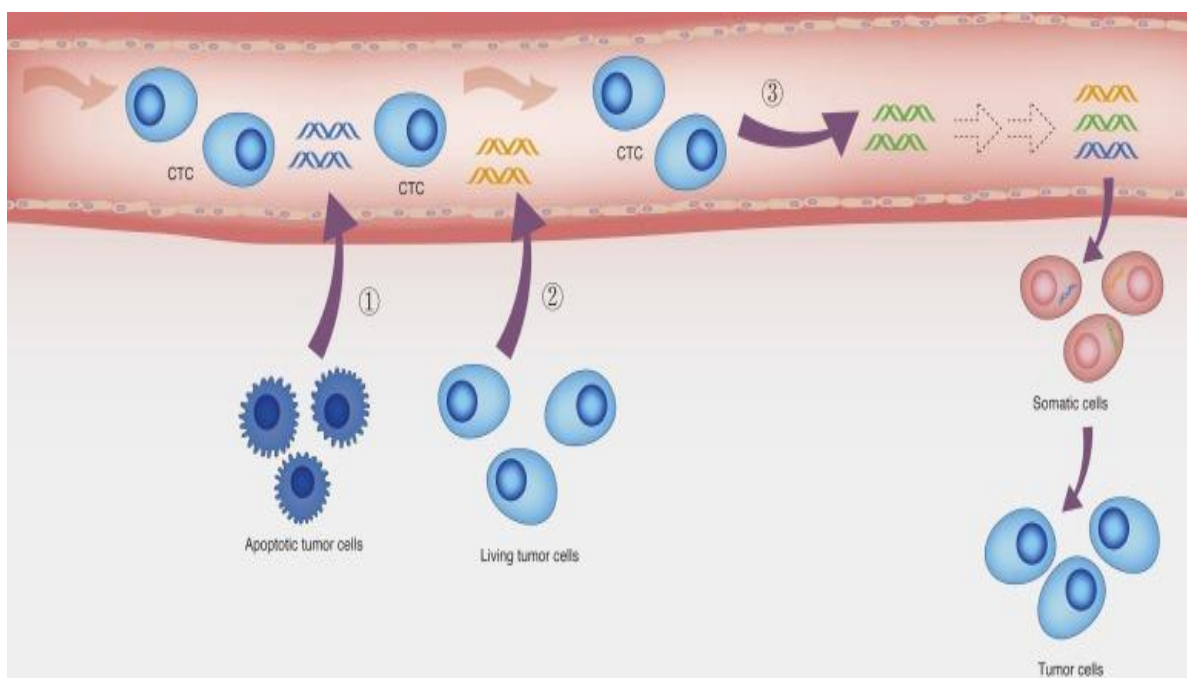


**Slika 8:** Uložak koji sadrži zamrljane CTC stavlja se na sustav CELLTRACKS ANALYZER II® za skeniranje. Nakon što je uložak skeniran, sustav prikazuje kandidate tumorskih stanica koji su pozitivni na citokeratin i DAPI (www.cellsearch.com).

### 1.3.2. Slobodna cirkulirajuća DNA (cf DNA)

Tekuća se biopsija uglavnom koristi za analizu „cell free“ nukleinskih kiselina (poput cfDNA) u perifernoj krvi. Također se može koristiti i za analizu nukleinskih kiselina iz drugih tjelesnih tekućina, poput cerebrospinalne tekućine, urina i tekućine ascitesa. U dijagnozi tumora, cfDNA izolirana iz periferne krvi, uobičajeno se koristi za gensku analizu (Jung i sur., 2018.). CfDNA jest slobodna „cell free“ cirkulirajuća DNA koja potječe iz stanica. U zdravih osoba cfDNA ima nisku koncentraciju u perifernoj krvi jer se eliminira putem slezene, jetre i bubrega (Krašić i sur., 2018.). Prvi put su je opisali Mandel i Metais 1948. u krvi zdravih pojedinaca (Krašić i sur., 2018.). Sedamnaest godina kasnije, 1965. godine, Bendich i kolege pretpostavili su da bi cftDNA podrijetlom iz tumorskih stanica mogla biti uključena u proces metastaziranja (Volik i sur., 2016.).

Osjetljive metode, kao što su BEAMing, Safe-SeqS, TamSeq i digitalni PCR, služe za otkrivanje cfDNA odnosno cftDNA. Prednost cftDNA, u usporedbi s CTC-ima, predstavlja mogućnost analiziranja iz smrznute bio-banke biotekućina (Krašić i sur., 2018.). Raspon koncentracije cfDNA u zdravih osoba je 0-35 ng/ml, dok njezine koncentracije mogu prelaziti 1000 ng/ml kod osoba oboljelih od karcinoma (Periša i sur., 2017.).



**Slika 9:** Slika prikazuje tri potencijalna podrijetla ctDNA molekule :(1) apoptotske tumorske stanice, (2) žive tumorske stanice i (3) cirkulirajuće tumorske stanice. CtDNA može transformirati normalne stanice u tumorske stanice, što rezultira udaljenim metastazama (Cheng i sur., 2016.)

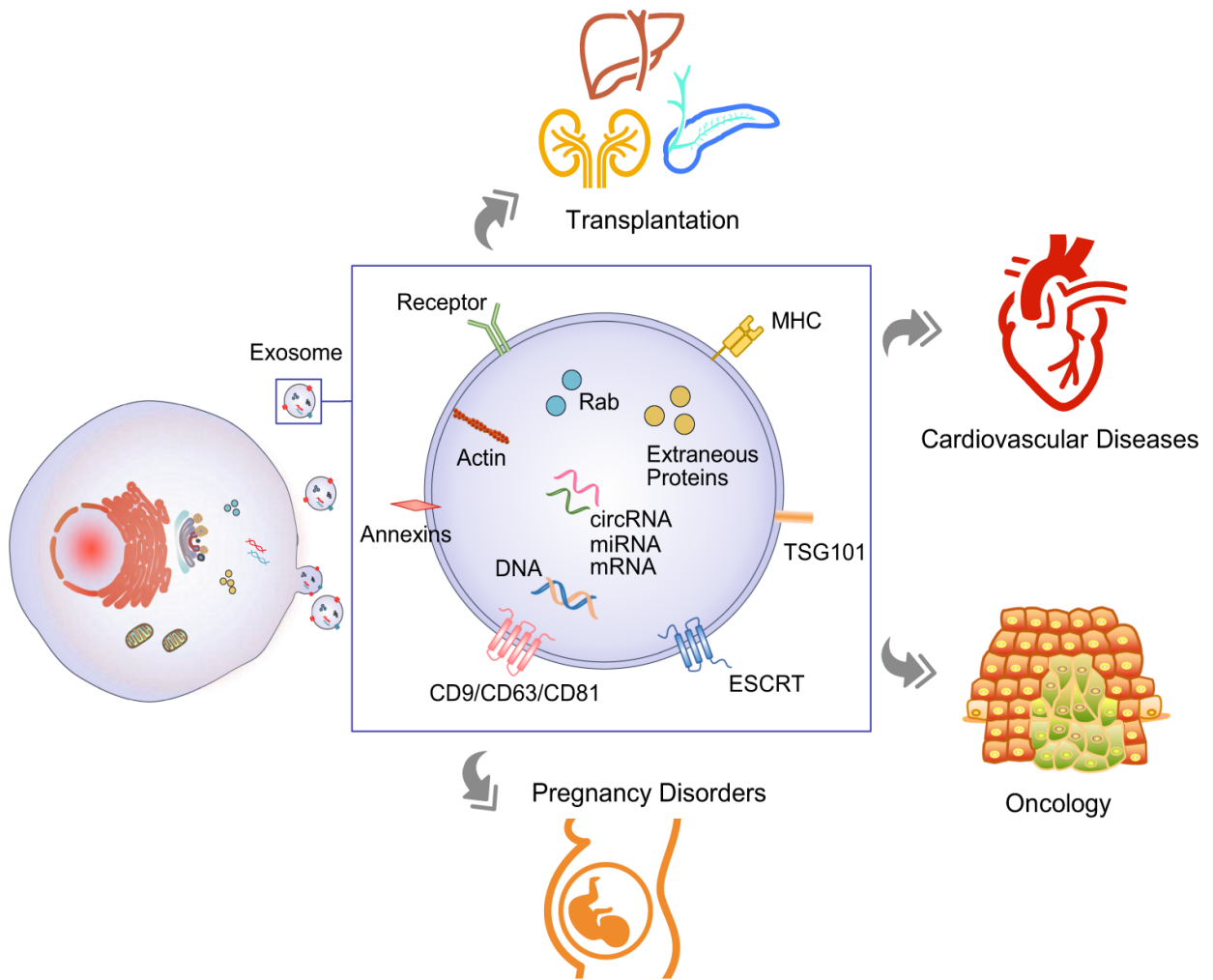
### 1.3.3. Egzosomi

Pojam egzosoma prvi put spomenut je 1981. Opisani su kao membranske zatvorene strukture oslobođene s površine uzgajanih stanica (Krašić i sur., 2018.). Egzosomi su mikrovezikule, veličine 30-150 nm, koje sadrže RNA, proteine i lipide unutar membranskoga lipidnoga dvosloja. Fiziološke funkcije egzosoma, koji cirkuliraju u krvi, jesu komunikacija i prijenos molekula između udaljenih stanica. Tumorske stanice ih koriste za poticanje proliferacije stanica, angiogenezu i metastaze (Periša i sur., 2017.). Imaju ključnu ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima, uključujući rak, poremećaje trudnoće, kardiovaskularne bolesti i imunološke reakcije (Zhou i sur., 2020.).

Formiraju se tijekom unutarnjeg pupanje endosoma u kojima su inkapsulirani nukleinske kiseline i proteini. Potom se oslobađaju u izvanstanični prostor i ulaze u cirkulaciju. Oslobađaju se od različitih vrsta stanica, poput stanica imunskog sustava, trombocita, endotelnih i tumorskih (Krašić i sur., 2018.). Nalaze se u biološkim tekućinama poput krvi, urina, slina, pleuralnih izljeva, plodne vode, nazalnog sekreta, cerebrospinalne tekućine, majčinog mlijeka i ascitesa (Domínguez-Vigil i sur., 2017.).

Egzosomi pokazuju superiornost u odnosu na druge elemente tekuće biopsije. Postoje u gotovo svim tjelesnim tekućinama i posjeduju visoku stabilnost jer sadrže proteine i transkripte iz stanica iz kojih su potekli te su inkapsulirani u lipidni dvosloj. Visoka biološka stabilnost može smanjiti troškove kratkotrajnog čuvanja uzorka te poteškoće prijevoza, što povećava kliničku primjenjivost egzosoma. Izoliraju se pri pH 7 te čuvaju na temperaturi od 4 °C unutar 24 sata. Sadrže biološke informacije iz roditeljskih stanica te predstavljaju reprezentativniji materijal u odnosu na cfDNA. Također, ekspimiraju specifične proteine kao što su CD63, ALIX, TS101 i HSP70,20 koji se mogu koristiti kao biljezi za učinkovito razlikovanje od ostalih vezikula (Zhou i sur., 2020.).

Egzosomi nose visoko specifične molekularne uzorke i pridonose detaljnom proučavanju tumora. Jedna je studija predstavila specifičnu molekulu - glipikan-1 (GPC1 (+)), izoliranu iz cirkulirajućih egzosoma, koja se nalazila u serumu bolesnika s tumorom gušterače. Ta je molekula imala apsolutnu specifičnost i osjetljivost za razlikovanje zdravih ispitanika, bolesnika s dobroćudnom bolešću gušterače te bolesnika s ranim i kasnim stadijem raka gušterače (Periša i sur., 2017.).

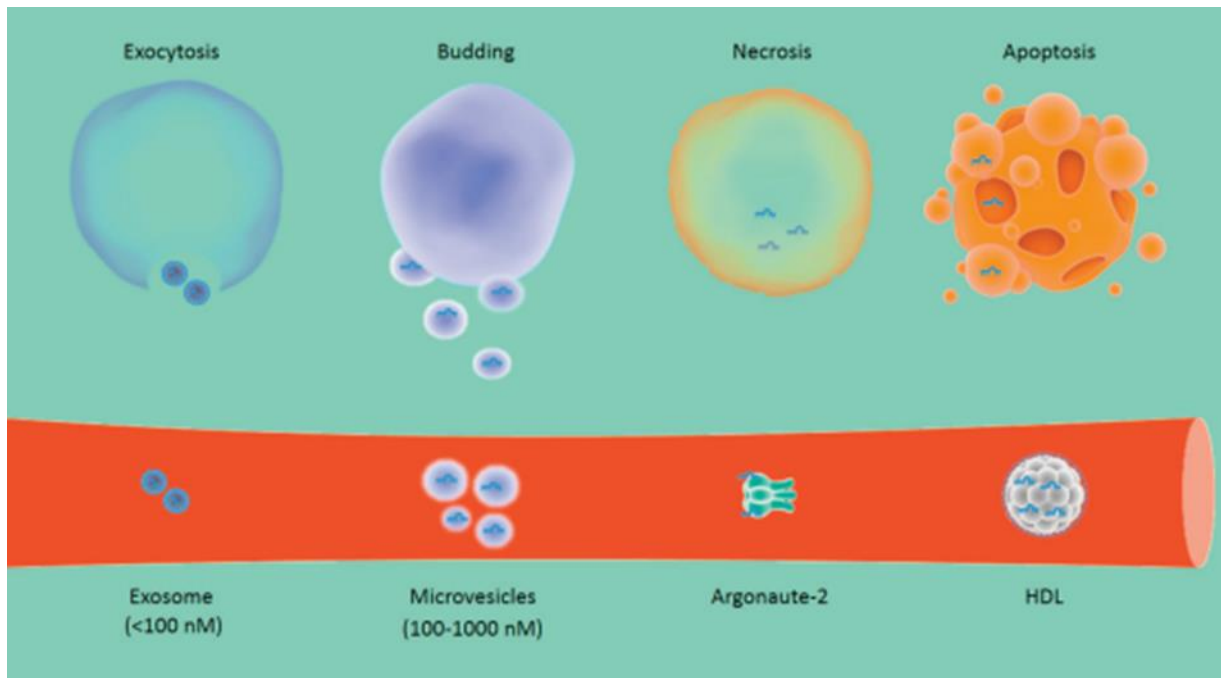


**Slika 10:** Biogeneza i aplikacija egzosoma u tekućoj biopsiji (preuzeto i prilagođeno prema Zhou i sur., 2020.)

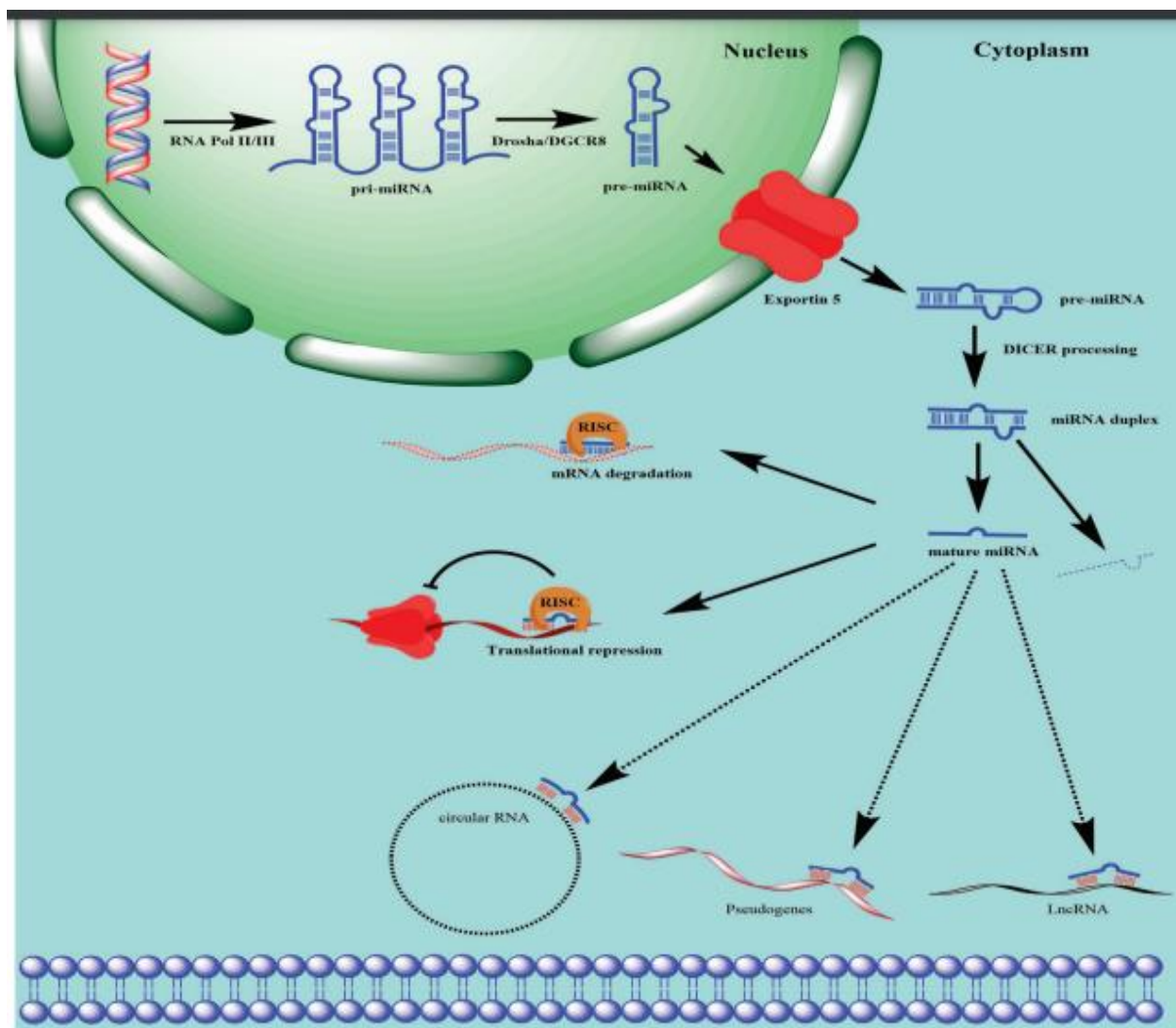


### 1.3.4. MikroRNA molekule

MikroRNA su kratke, dvolančane RNA molekule duljine 19–23 nukleotida. Nastale su iz 70-nukleotidnih prekursora koji kontroliraju ekspresiju gena u raznim fiziološkim i razvojnim procesima, imajući tako ključnu ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji genske ekspresije u biološkim sustavima. Uglavnom su vezane za ribonukleoproteinske komplekse te lipoproteine visoke gustoće ili se oslobađaju iz stanica u vezikulama, mikrovezikulama, egzosomima i apoptotičkim tjelešcima (Hamam i sur., 2017.).



**Slika 11:** Izvori i oblici cirkulirajućih mikroRNA (Hamam i sur., 2017.)



**Slika 12:** Biogeneza i funkcija mikroRNA. Primarni mikroRNA transkript (pri-miRNA) je prepisan od strane RNA polimeraze II/III u jezgri pri čemu se stvara izdužena RNA nalik ukosnici. Potom tu strukturu kida Drosha u 70 nukleotidne pre-miRNA molekule. Pre-miRNA izlazi iz jezgre u citoplazmu pomoću molekule exportin 5. Petlja se kida pomoću pre-miRNA proteina Dicer, stvarajući kratku dvolančanu strukturu smislene (engl. *sense*) miRNA i protusmislene (engl. *antisense*) miRNA. Zrela miRNA, duga 22 nukleotida, ugrađuje se u kompleks koji se naziva mRISC (miRNA inducirani kompleks za utišavanje). MRISC dovodi do utišavanja gena putem razgradnje glasničke RNA (mRNA) ili onemogućavanjem njezine translacije (translacijska represija). Također, razina zrelih miRNA regulirana je vezanjem na cirkulirajuće RNA molekule, pseudogene i lncRNA (engl. *long-non coding RNA*) molekule, koje sprječavaju vezanje miRNA za ciljnu mRNA (Hamam i sur., 2017.).

**Tablica 2 :** Uobičajene metode za kvantificiranje cirkulirajućih miRNA (preuzeto i prilagođeno prema Hamam i sur., 2017.)

Metoda	Prednost	Nedostatak
Lančana reakcija polimerazom u stvarnome vremenu (qPCR)	Vrlo osjetljiva.	Uglavnom se koristi za kvantificiranje definiranog skupa miRNA
Microarray	Zahtijeva male količine ulazne RNA. Može istodobno mjeriti veliki broj cirkulirajuće miRNA.	Niski dinamički raspon. Nemogućnost otkrivanja nove neregistrirane miRNA.
Next-generation sequencing	-	Zahtijeva velike količine početnog materijala. Generira obilne količine podataka koji zahtijevaju složene analize podataka.
NanoString nCounter	Može kvantificirati točan broj kopija miRNA u biološkim uzorcima.	Trenutno ograničeno na otkrivanje do 800 miRNA po uzorku.

**Tablica 3 :** Popis cirkulirajućih miRNA u raznim ljudskim karcinomima (Hamam i sur., 2017.)

<b>miRNA</b>	<b>Tip karcinoma</b>
miR-21 , -210	B-stanični limfom
miR-141	Karcinom prostate
miR-17-3p,-92	Kolorektalni karcinom
miR-25 , -223	Karcinom pluća
miR-21,-92,-93,-126,-29	Karcinom jajnika
miR-92a	Akutna leukemija
miR-500	Hepatocelularni karcinom
miR-184	Rak skvamoznih stanica

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U današnje vrijeme rak predstavlja drugi vodeći uzrok smrti u svijetu te je stoga molekulsko profiliranje tumora neophodno za optimizaciju liječenja u kliničkoj praksi. Metastatsko širenje raka na udaljena mjesta ostaje glavni uzrok smrti pacijenata, koji boluju od malignih bolesti, u 90 % slučajeva. Tekuća biopsija predstavlja inovaciju u dijagnostici malignih bolesti te ima potencijal za rano otkrivanje bolesti. Također, omogućuje promicanje preciznije medicinske intervencije na području onkološke medicine. Poboljšava pristup u ranoj dijagnozi bolesti, kao i prognozi kliničkog ishoda te predviđanje kemoterapijskog odgovora i razvoj kemorezistencije u bolesnika oboljelih od malignih bolesti. Razvojem tekuće biopsije i istraživanjem specifičnih biljega, poboljšano je usmjeravanje terapije i nadzor malignih bolesti.

Cilj je ovog diplomskog rada proučiti znanstvenu i stručnu literaturu koja se bavi područjem onkološke dijagnostike i obrađuje koncept tekuće biopsije u otkrivanju i dijagnostici malignih bolesti, fokusirajući se pritom na karcinom dojke, jajnika, pluća, prostate, kolorektalni karcinom te glioblastom.

### 3. MATERIJALI I METODE

Prilikom izrade ovoga diplomskoga rada korišteni su znanstveni radovi u bazama:

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>),

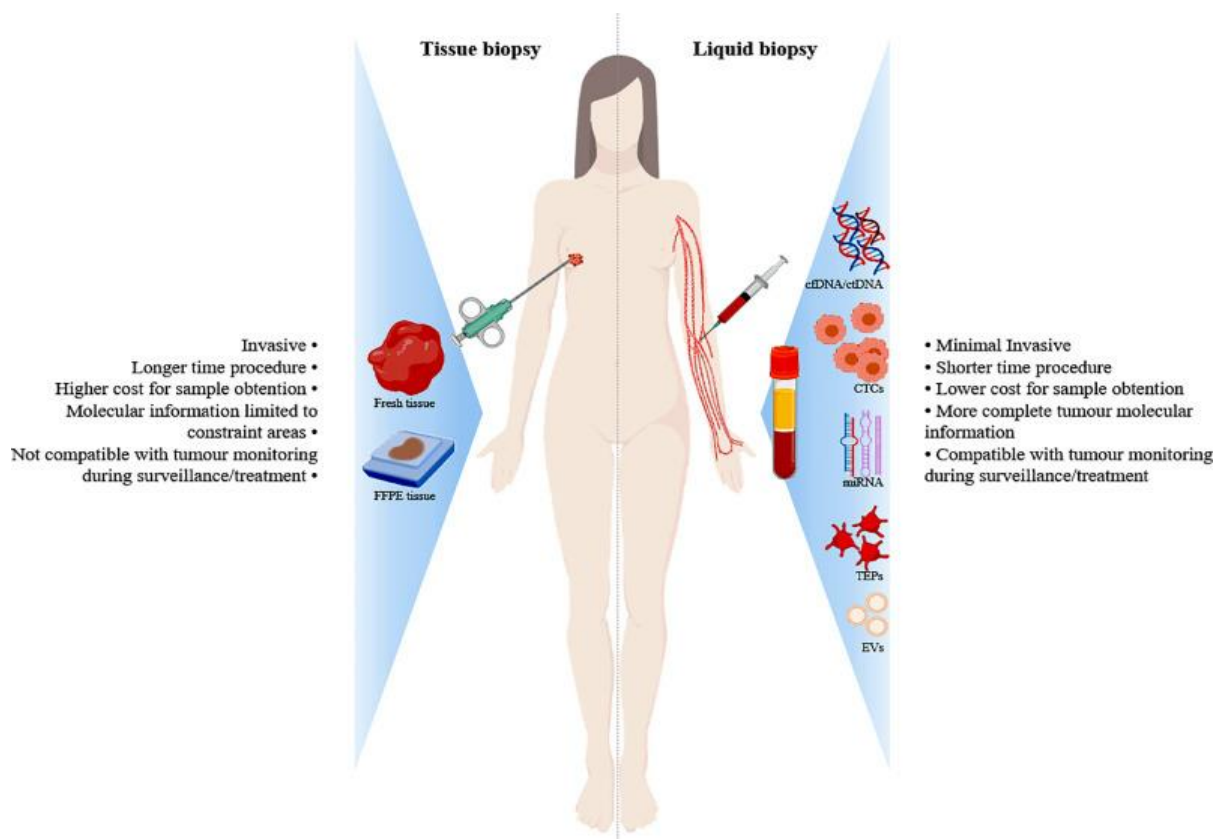
ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>).

Pregled baza znanstvenih radova učinjen je u razdoblju od 4. prosinca 2020. do 10. travnja 2021. godine po ključnim riječima: tekuća biopsija (engl. *liquid biopsy*), cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulant tumor DNA*), egzosomi (engl. *exosomes*), cfDNA (engl. *cell free DNA*) te miRNA (engl. *micro RNA*) u vremenskom razdoblju od 2000. do 2020. godine.

## 4. RASPRAVA I REZULTATI

### 4.1. Tekuća biopsija u dijagnozi karcinoma dojke

Rak dojke jedna je od najčešćih zloćudnih bolesti u svijetu, s procijenjenih 1,5 milijuna novih slučajeva godišnje. Čimbenici rizika za razvoj neoplazme su brojni, uključujući dob, obiteljsku anamnezu, pretilost, izloženost hormonima i terapijsko zračenje (Hamam i sur., 2017.). Rak dojke najčešća je neoplazma, koja pogađa žene u svijetu, i čini 23 % ukupnih onkoloških dijagnoza te ukupno 14 % smrtnih slučajeva. Tekuća biopsija, u kombinaciji s visoko osjetljivim molekularnim tehnologijama i naprednim protokolima bioinformatike, poboljšava dijagnozu i praćenje karcinoma dojke (Jemal i sur., 2011.). FDA (engl. *Food and Drug Administration*) je odobrila test Cellsearch® za ekstrakciju CTC-a kod pacijentica, koje boluju od raka dojke, radi utvrđivanja njihove prognoze (Amelio i sur., 2020.).

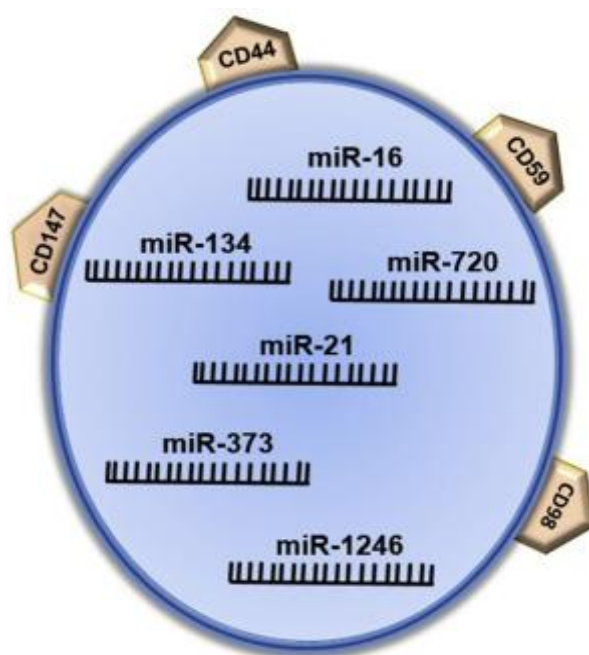


**Slika 13:** Usporedba biopsije tkiva i tekuće biopsije u dijagnostici karcinoma dojke (preuzeto i prilagođeno prema <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103100>).

### 4.1.1. Uloga egzosoma u liječenju, prognozi i dijagnozi karcinoma dojke

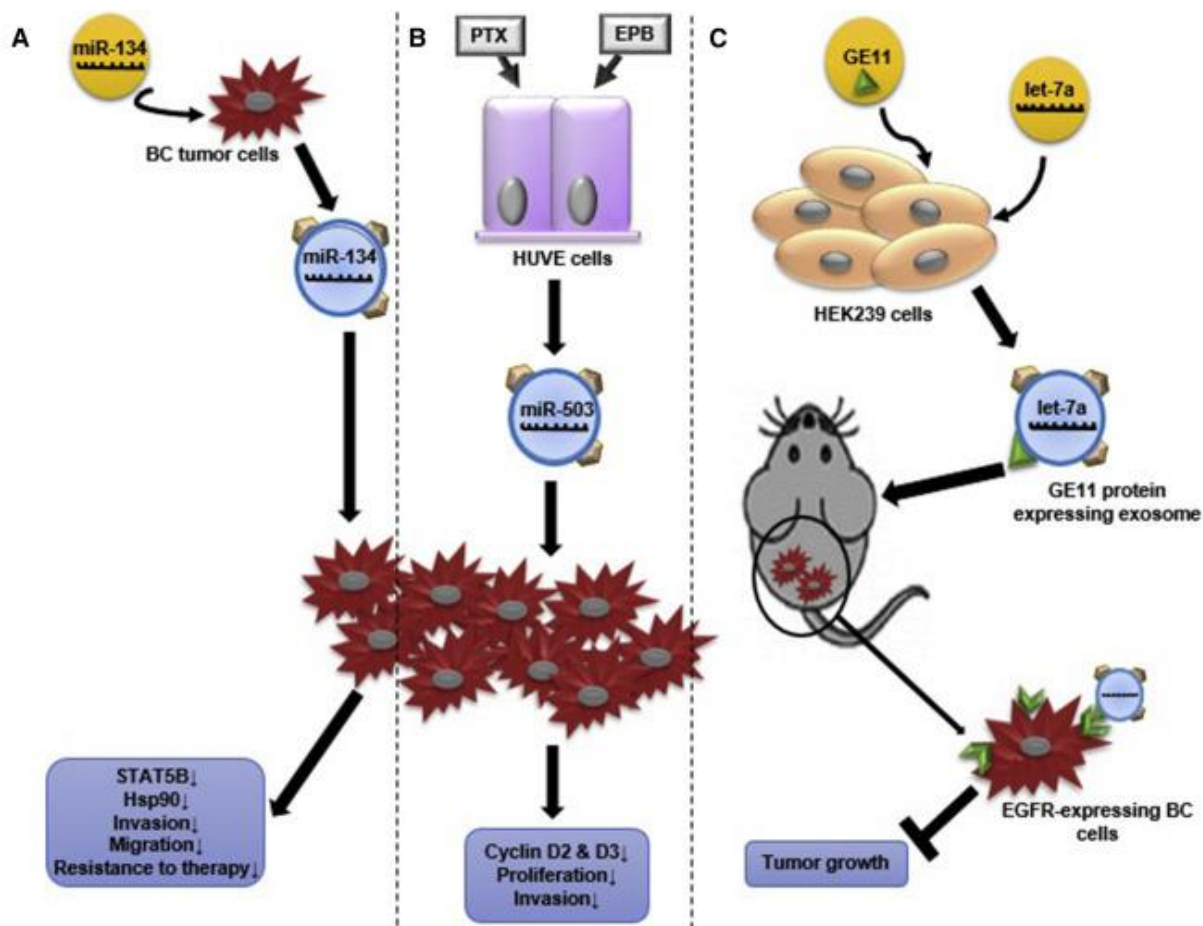
Majčino mlijeko predstavlja pouzdan izvor egzosoma i specifičnih biljega. Prikupljanje majčinog mlijeka manje je invazivno i praktičnije u odnosu na prikupljanje ljudskoga seruma. Egzosomi ljudskog mlijeka sadrže visoku razinu transformirajućeg faktora rasta  $\beta 2$  (TGF- $\beta 2$ ), stoga izlučivanje TGF- $\beta 2$  u majčinom mlijeku može povećati rizik od karcinoma (Qin W i sur., 2016.).

Egzosomi i njihove komponente: DNA, RNA i proteini, mogu utjecati na invaziju tkiva, metastaze i angiogenezu tumora. Postojanje egzosomalnih miRNA u cirkulaciji može biti dijagnostički biljeg za maligne bolesti dojke. Stanice trostruko negativnog karcinoma dojke proizvode egzosome koji sadrže određene proteine i miRNA što rezultira malignom transformacijom. U usporedbi s malignim stanicama, normalne stanice oslobađaju egzosome koji pakiraju neutralne miRNA (Dhahbi i sur., 2014.).



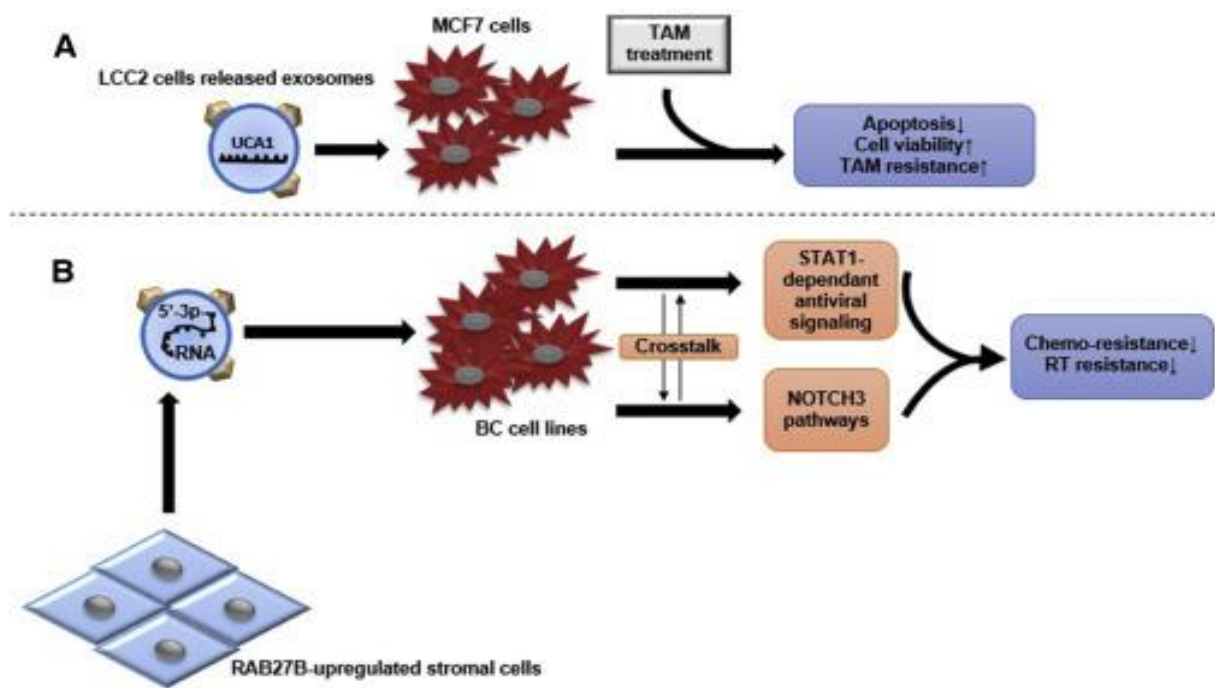
**Slika 14:** Stanice trostruko negativnog karcinoma dojke (TNBC engl. *triple-negative breast cancer*) stvaraju egzosome sa specifičnim površinskim proteinima: CD98,CD59,CD44 i CD147 te miRNA molekule (preuzeto i prilagođeno prema Halvaei i sur., 2017.)





**Slika 15** : Egzosomi kao novi terapijski ciljevi:

(A) miR-134 transficirane stanice oslobađaju egzosome koji nose miR-134 te mogu smanjiti ekspresiju STAT5B i HSP90. Također, ti egzosome smanjuju migraciju i invaziju te povećavaju osjetljivost na lijekove protiv HSP90 u stanicama Hs578Ts. (B) Endotelne stanice humane umbilikalne vene (HUVE) oslobađaju egzosome koji prekomjerno ekspimiraju miR-503 nakon liječenja PTX-om i EPB-om. Ti egzosome smanjuju invaziju tumora i ekspresiju D2 i D3 ciklina što je dovelo do smanjenja proliferacije tumorskih stanica. (C) Ljudske embrionalne stanice bubrega (HEK239) transficirane su s proteinom GE11, koji se specifično veže na stanice koje ekspimiraju EGFR i miRNA let-7a. Stanice HEK239 oslobodile su egzosome koji ekspimiraju GE11 i prekomjerno izražavaju let-7a te inhibiraju razvoj tumora na životinjskom modelu (preuzeto i prilagođeno prema Halvaei i sur., 2017.).

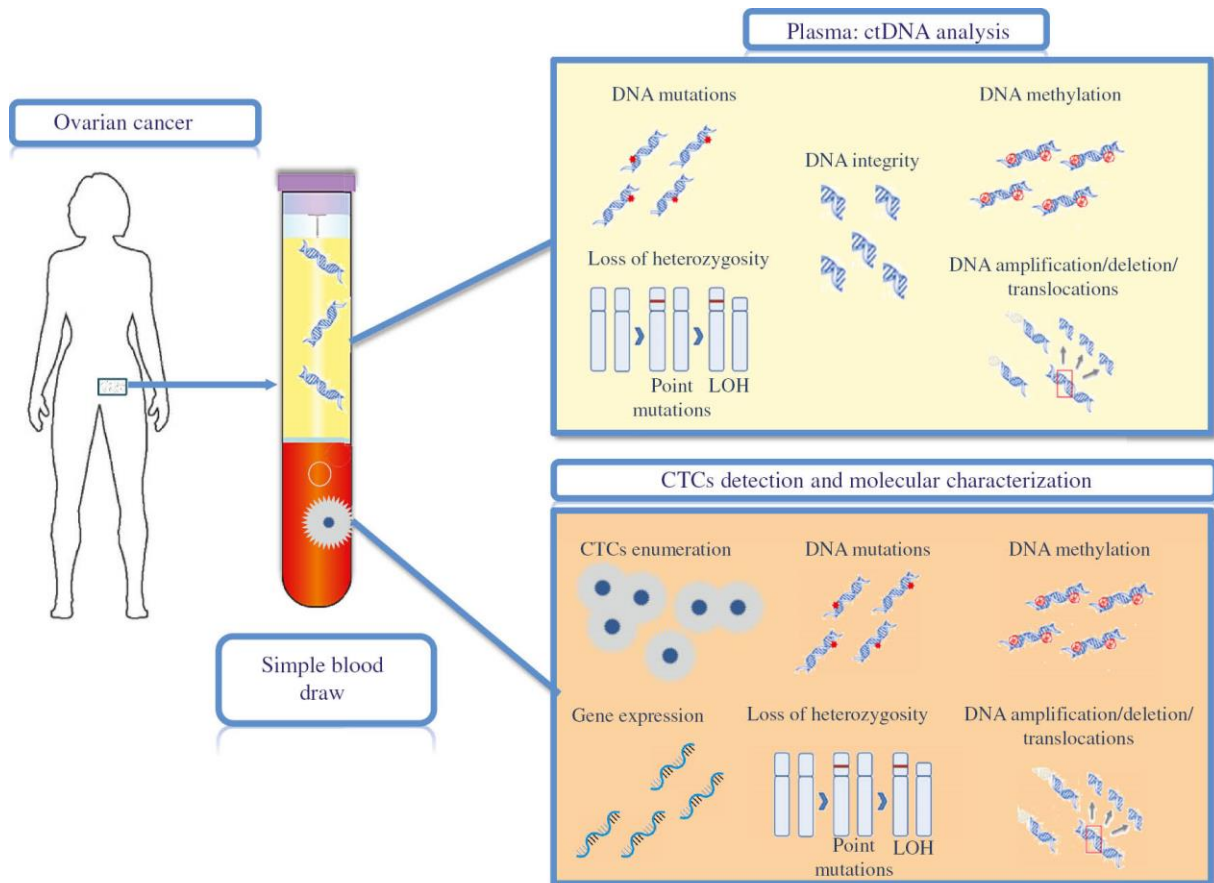


**Slika 16:** Uloga egzosoma u rezistenciji karcinoma dojke na terapiju. Tumorske stanice rezistentne na tamoksifen (stanična linija LCC2) izlučuju prekomjerno eksprimirane UCA1, što može prouzročiti rezistenciju na liječenje tamoksifenom i smanjiti apoptozu. (B) RAB27B-regulirane stromalne stanice oslobađaju egzosome koji sadrže 5'-trifosfatne RNA i aktiviraju STAT1-ovisne antivirusne signalne i NOTCH3 putove u susjednim tumorskim stanicama što rezultira smanjenjem kemo-rezistencije i otpornosti na radioterapiju u različitim tumorskim staničnim linijama (preuzeto i prilagođeno prema Halvaei i sur., 2017.).

## 4.2. Primjena tekuće biopsije u dijagnostici karcinoma jajnika

Rak jajnika povezan je s većinom smrtnih slučajeva ginekoloških karcinoma i predstavlja treći ginekološki karcinom u svijetu. Često se vrlo kasno dijagnosticira kad je već poodmakloj fazi, no postignut je mali napredak u standardnom liječenju kemoterapijom i ukupnom preživljavanju u posljednja tri desetljeća (Giannopoulou i sur., 2017.). Bolest je vrlo heterogena, s nekoliko podtipova koji se razlikuju po molekulskim i histopatološkim značajkama, a različiti ishodi i potrebe za terapijom javljaju se zbog heterogenosti tumorskih stanica, čak i unutar istog histološkog podtipa. Trenutno najčešće korištene dijagnostičke metode uključuju pregled zdjelice, tumorske biljege CA125 i HE4 te transvaginalni ultrazvuk (TVU). Međutim, oni nisu primjereni za rano otkrivanje, jer povišeni CA125 nije specifičan za rak jajnika te ne pokazuje svaki pacijent visoku koncentraciju CA125, posebno u ranim fazama. Također, pacijenti često razvijaju rezistenciju na kemoterapiju, koja uključuje platinu i paklitaksel, u uznapredovalim stadijima karcinoma (Zhang i sur., 2020.).

Metastaze raka jajnika odvijaju se na dva načina, koja karakteriziraju različiti mehanizmi, a to su transkoelomična pasivna diseminacija tumorskih sferoida u peritonealnoj tekućini i ascitesu te hematogene metastaze stanica karcinoma u cirkulaciji i njihovo preferirano odlaganje u omentumu. CTC pridonose hematogenom metastatskom putu, no većinom su rijetki te je količina dostupnog uzorka periferne krvi ograničena. CftDNA cirkulira u visokim koncentracijama u perifernoj krvi osoba oboljelih od raka te se može koristiti za otkrivanje nekoliko molekularnih promjena povezanih s razvojem raka. CftDNA predstavlja veći postotak cfDNA te perspektivno neinvazivno dijagnostičko, prognostičko i prediktivno sredstvo, jer pruža lako dostupan izvor tumorske DNA.



**Slika 17:** Moguća uloga tekuće biopsije u ranoj dijagnozi, prognozi kliničkog ishoda te predviđanju kemoterapijskog odgovora ili razvoju kemorezistencije u bolesnika s karcinomom jajnika (Giannopoulou i sur., 2017.)

### **4.2.1. Cirkulirajuće tumorske stanice u dijagnostici karcinoma jajnika**

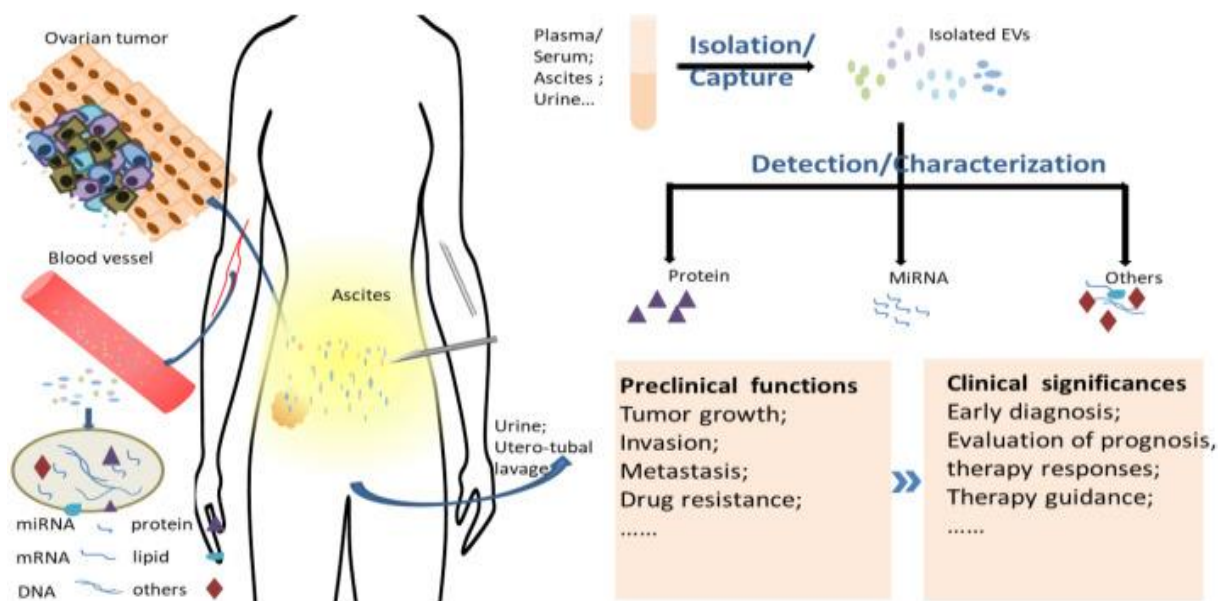
Prva ispitivanja CTC-a kod karcinoma jajnika temeljila su se na otkrivanju CTC-a korištenjem imunocitokemijskog testa. (Judson PL i sur., 2003.). Cirkulirajuće tumorske stanice pronađene su u perifernoj krvi 12 % oboljelih od karcinoma jajnika s medijanom praćenja od 25 mjeseci. Uzimanje uzorka obavljeno je 7-20 dana nakon operacije i prije odgovarajuće kemoterapije (Marth i sur., 2002.).

Judson i sur. otkrili su CTC-e u 18,7 % pacijenata s medijanom praćenja od 18,7 mjeseci. Obje studije nisu izvijestile o povezanosti CTC-a u perifernoj krvi i kliničkog ishoda pacijenata (Judson PL i sur., 2003.). Fan i sur. prvi su izvijestili o prognostičkom značaju CTC-a u primarnom karcinomu jajnika. Otkrivanje CTC-a temeljilo se na imunocitokemijskom testu pomoću adhezijske molekule epitelnih stanica (EpCAM), specifičnog antigena epitela (ESA) i panela od sedam pan-citokeratina te je dokazano da su CAM+ CTC invazivne te da je njihova prisutnost u značajnoj korelaciji sa smanjenim preživljavanjem (Fan i sur., 2009.). Kolostova i sur. dokazali su heterogenost CTC-a u pacijenata koji boluju od karcinoma jajnika i identificirali EpCAM, MUC16, MUC1, KRT7, KRT18 i KRT19 kao gene koji su visoko specifični za cirkulirajuće tumorske stanice karcinoma jajnika (Kolostova i sur., 2016.).

### **4.2.2. Izvanstanične vezikule – novi izvor biljega u liječenju karcinoma jajnika**

Izvanstanične vezikule pospješuju rast, invaziju i metastaziranje tumora putem različitih bioaktivnih molekula. Sherman-Samis i sur. otkrili su da egzosomalni protein Nanog, koji oslobađaju OVCAR3 stanice karcinoma jajnika, poboljšava invaziju, migraciju i aktivnost tumorskih stanica (Sherman-Samis i sur., 2019.). Egzosomalni miR-205 iz karcinoma jajnika može pospješiti proliferaciju tumorskih stanica, suzbiti njihovu apoptozu i ubrzati migraciju i invaziju stanica raka (Wang i sur., 2019.). Tang i sur. dokazali su snažnu angiogenu učinkovitost topljivih E-kadherin-pozitivnih egzosoma oslobođenih iz tumorskih stanica te je primijećena njihova velika količina u ascitesu pacijenata (Tang i sur., 2018.).

Glavna prepreka u liječenju karcinoma jajnika jest rezistencija na kemoterapiju, a posljednjih je godina utvrđeno da su mehanizmi otpornosti povezani s izvanstaničnim vezikulama. Potvrđeno je da izvanstanične vezikule, koje oslobađaju stanice raka tretirane cisplatinom, induciraju veću otpornost na kemoterapiju (Samuel i sur., 2018.). Aneksin A3 u vezikulama povezan je s rezistencijom na kemoterapiju platinom, jer je koncentracija aneksina A3 u serumu pacijenata, otpornih na platinu, bila viša u odnosu na pacijente osjetljive na platinu. Otkriveno je da miR-1246 posreduje većoj otpornosti na paklitaksel utječući na makrofage tipa M2 (Yin i sur., 2012.).



**Slika 18:** Egzosomi sadrže više biomolekula te su prisutni u raznim tjelesnim tekućinama, poput plazme i ascitesa. Analizom ovih vezikula, pokazan je njihov značaj kao kliničkih biljega za liječenje raka jajnika (Zhang i sur., 2020.)

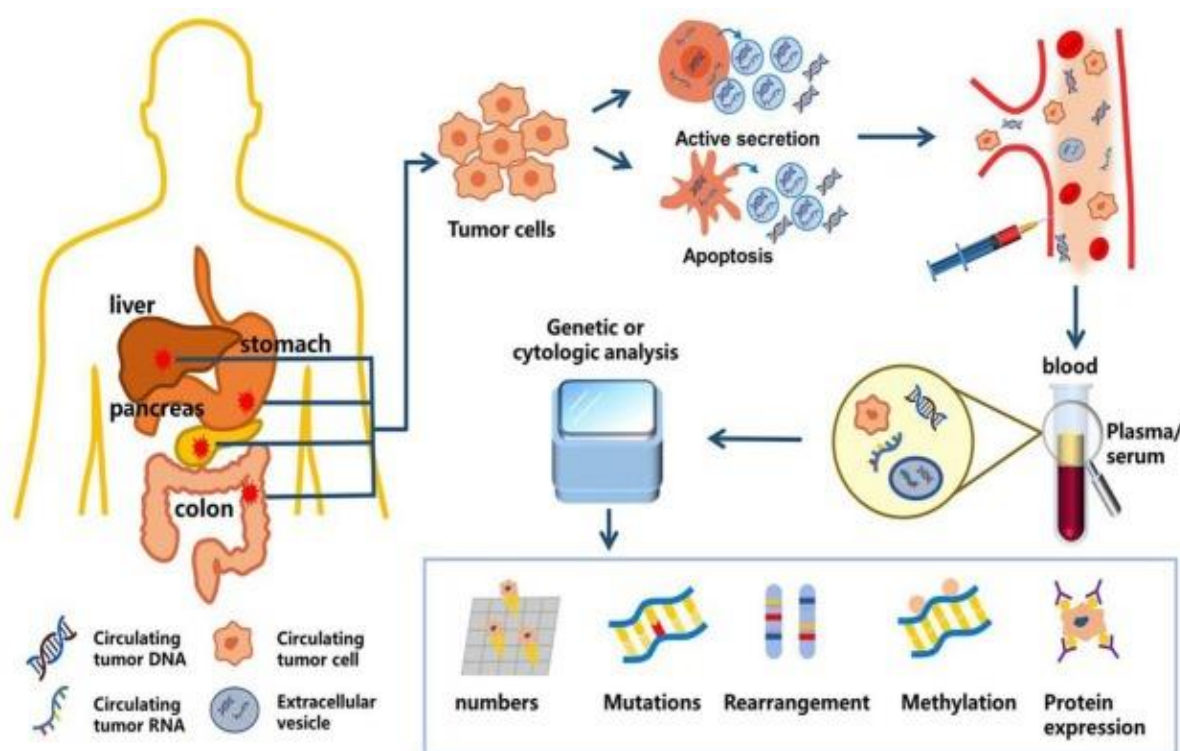
### **4.3. Tekuća biopsija u dijagnozi i liječenju gastrointestinalnih karcinoma**

#### **4.3.1. Cirkulirajuće tumorske stanice kao prognostički čimbenik u dijagnozi karcinoma želuca**

Rani dijagnostički biljeg za dijagnozu karcinoma želuca predstavlja promjena u broju CTC-a. Rezultati studije koja je obuhvaćala 116 bolesnika i 31 zdravu kontrolu pokazali su da je 97,1 % osoba, s razinom CTC  $\geq 2$  po 7,5 ml krvi, imalo karcinom želuca. Osjetljivost i specifičnost dijagnoze raka iznosila je 85,3 %, odnosno 90,3 % (Kang i sur., 2017.).

Broj i fenotip CTC-a koriste se za praćenje recidiva tumora, udaljenih metastaza i odgovora na liječenje, kao neovisni prognostički čimbenici. Pacijenti s CTC-om  $\geq 5/7,5$  ml u postoperativnoj krvi imali su značajno kraće preživljenje u usporedbi s onima s manjim brojem CTC-a. Povećani broj CTC-a nakon liječenja također je povezan s ranim recidivima (Zhang i sur., 2018.).

CD133+CTC-i su identificirani u uzorcima krvi pacijenata oboljelih od karcinoma želuca, pri čemu je prognoza bolesnika bila znatno lošija od one kod pacijenata bez CD133+CTC-a. Ekspresija liganda programirane stanične smrti (PDL-1) u cirkulirajućim tumorskim stanicama zabilježena je u 50 od 70 bolesnika (71 %), a veći broj PD-L1+CTC-a ukazao je na loš terapijski odgovor i kratko trajanje preživljavanja (Liu i sur., 2020.).



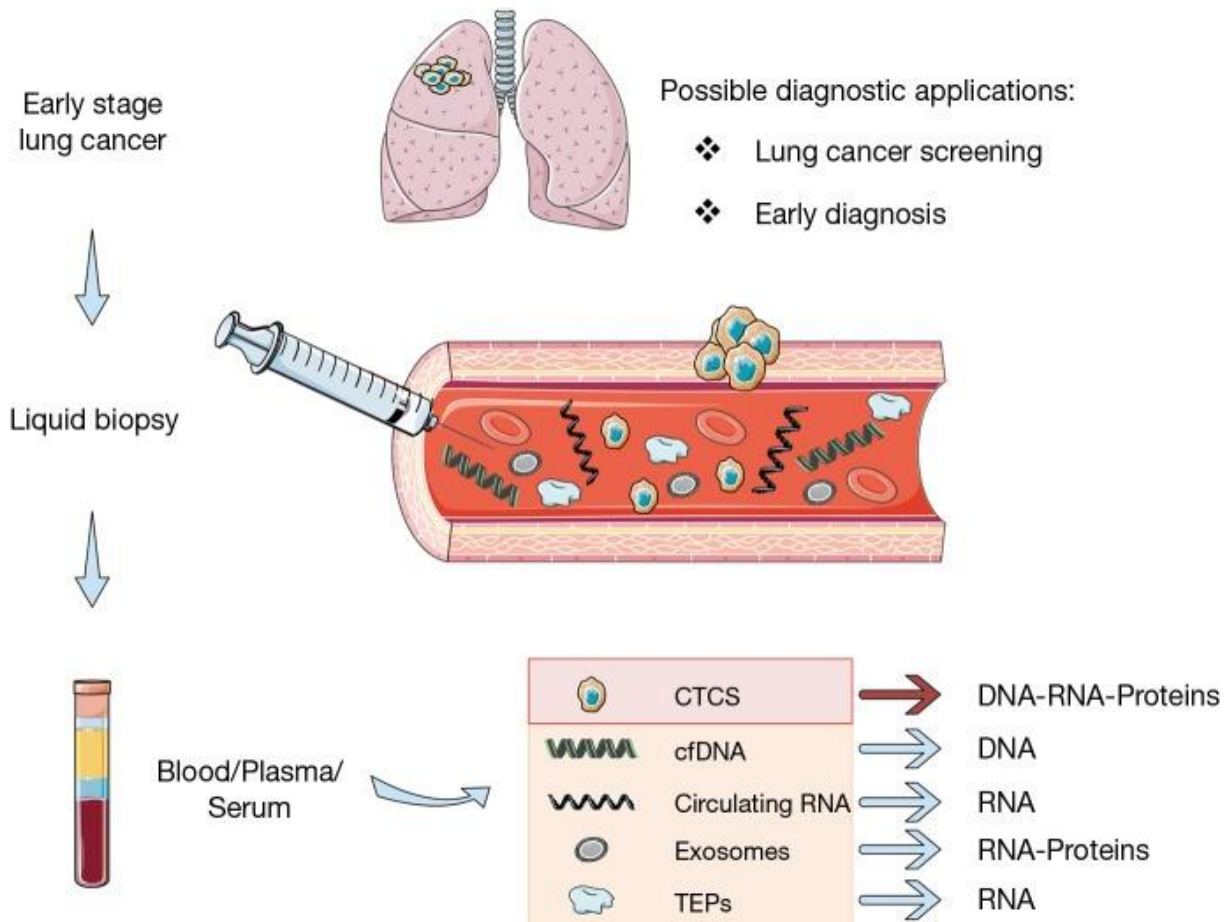
**Slika 19:** Koncept tekuće biopsije u dijagnostici i liječenju gastrointestinalnoga karcinoma (preuzeto i prilagođeno prema Wu i sur., 2020.)

#### 4.3.2. Cirkulirajuće tumorske stanice u dijagnozi karcinoma pankreasa

Wei i sur. proveli su studiju i utvrdili da je visoka izraženost vimentin+ CTC-a kod 76 % bolesnika s duktalnim adenokarcinomom gušterače (Wei i sur., 2019.). Također su izvijestili da je visoka razina vimentin+CTC-a povezana s kraćim preživljavanjem bez recidiva i lošim odgovorom na liječenje. Analizom fenotipa CTC-a korištenjem sustava CellSearch otkriveno je da pacijenti s CTC-ima koji eksprimiraju mucin 1 (MUC-1) imaju lošije predviđanje preživljavanja (Dotan i sur., 2016.). Visoke razine CTC-a koji eksprimiraju biljege matičnih stanica raka, uključujući ALDH, CD133 i CD44, također su povezane s lošijim preživljavanjem i recidivom tumora u duktalnom adenokarcinomu gušterače (Poruk i sur., 2017.).



#### 4.4. Tekuća biopsija u dijagnostici karcinoma pluća



**Slika 20 :** Prikaz tumorskih komponenata koji se mogu koristiti za rano otkrivanje karcinoma pluća (preuzeto i prilagođeno prema Santarpia i sur., 2018.)

Rak pluća predstavlja najčešći uzrok smrti kod osoba oba spola. Visoka smrtnost uglavnom se pripisuje njegovoj agresivnosti i činjenici da se većina tumora pluća obično otkriva u uznapredovalom, neoperabilnom stadiju bolesti. Oko 85 % karcinoma pluća odnosi se na NSCLC (engl. *non-small-cell lung carcinoma*), koji uglavnom obuhvaća adenokarcinom, karcinom skvamoznih stanica i karcinom pluća velikih stanica.

Samo se manjini bolesnika bolest dijagnosticira u ranoj fazi, a za te pacijente optimalno liječenje predstavlja kirurška resekcija. Najmanje trećina pacijenata, koji su podvrgnuti potpunoj kirurškoj resekciji, doživljava ponavljajuću bolest u roku od 5 godina, uglavnom sistemski recidiv, što sugerira da je NSCLC u ranoj fazi često metastatski u dijagnozi. Rano otkrivanje raka pluća pojavljuje se kao vrijedan pristup dijagnosticiranju bolesti u asimptomatskoj i potencijalno izlječivoj fazi, s ciljem poboljšavanja ishoda pacijenta (Santarpia i sur., 2018.).

#### **4.4.1. cfDNA u dijagnostici karcinoma pluća**

Više razine cfDNA u bolesnika s karcinomom sugeriraju da cfDNA potencijalno može imati dijagnostičku i prognostičku vrijednost. Koncentracija DNA u plazmi, određena kvantitativnim PCR-om u stvarnome vremenu (qPCR) ljudskoga gena za telomerase (hTERT), reverznu transkriptazu odgovornu za održavanje duljine telomera, bila je gotovo osam puta veća u bolesnika s karcinomom pluća nego u odgovarajućim kontrolama kod pušača te predstavlja značajan prognostički faktor za razvoj raka pluća (Sozzi i sur., 2003.).

U 35 onkoloških bolesnika prikupljen je uzorak plazme 3 do 15 mjeseci nakon operacije te je analizirana koncentracija DNA u plazmi. Srednja koncentracija DNA tijekom praćenja bila je značajno niža u osoba koje ne boluju od karcinoma pluća u usporedbi s pet pacijenata s dokazanim relapsom karcinoma, što ukazuje na potencijalnu ulogu tekuće biopsije i u predviđanju recidiva i cfDNA kao prognostički biljeg. Također, veća količina DNA u plazmi bila je značajno povezana s lošijom prognozom pri petogodišnjem preživljavanju, što ukazuje na prisutnost agresivnijeg karcinoma (Sozzi G i sur., 2003.). CAPP-Seq (engl. *Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing*) predstavlja osjetljivu metodu koja kvantificira cfDNA te otkriva somatske mutacije. Primjenom je utvrđena cfDNA u 100 % bolesnika s NSCLC stadija II-IV te 50 % bolesnika s bolešću stadija I (Newman i sur., 2014.).

#### 4.4.2. Genska metilacija cfDNA u ranoj dijagnozi karcinoma pluća

Epigenetske modifikacije, uključujući metilaciju CpG otoka u regijama promotora gena, usko reguliraju ekspresiju velikog broja gena koji sudjeluju u malignoj transformaciji. Uglavnom reguliraju ekspresiju tumorskih supresorskih gena te se često opažaju u tumorima, uključujući karcinom pluća.

Hipermetilacija pridonosi karcinogenezi, a jedna od glavnih prednosti metilacije DNA, u usporedbi s drugim potencijalnim dijagnostičkim biljezima, je to što je metilacija stabilna, a promijenjeni obrasci metilacije javljaju se rano tijekom karcinogeneze i mogu se utvrditi na DNA prisutnoj u cirkulaciji te različitim tjelesnim tekućinama, uključujući krv i ispljuvak (Esteller i sur., 2002.). Metilacija cirkulirajuće DNA može se procijeniti pomoću različitih tehnika, poput PCR-a specifičnog za metilaciju (MSP, engl. *methylation specific PCR*), kvantitativnog MSP-a u stvarnom vremenu, multiplex PCR-a specifičnog za metilaciju i metil-BEAMinga. Iako epigenetske promjene nisu jedinstvene ni za jedan tumor, promotorska područja nekih tumorskih supresorskih gena često su metilirana što bi moglo biti korisno za dijagnostičke i prognostičke svrhe (Shivapurkar N i sur., 2010.).

Devet gena (*APC*, *CDH13*, *KLK10*, *DLEC1*, *RASSF1A*, *EFEMP1*, *SFRP1*, *RAR-β* i *p16INK4A*) pokazali su značajno veću učestalost metilacije u NSCLC u usporedbi s normalnim tkivima ( $P \leq 0,001$ ). Skup od pet gena (*APC*, *RASSF1A*, *CDH13*, *KLK10* i *DLEC1*) postigao je osjetljivost od 83,64 % i specifičnost od 74,0 % za dijagnozu raka. Ovi su geni često hipermetilirani u tumorima pluća i korelirani s lošom prognozom (Ponometryova AA i sur., 2013.). Analizom bronhijalnih tekućina otkriveno je da metilacija lokusa gena *SHOX2* predstavlja osjetljiv i specifičan prognostički biljeg. Metilacija *SHOX2* omogućila je razlikovanje malignih i benignih plućnih bolesti s osjetljivošću od 68 % i visokom specifičnošću od 95 % (Schmidt B i sur., 2010.).

#### **4.4.3. MikroRNA u prognozi karcinoma pluća**

MikroRNA predstavljaju kratke nekodirajuće RNA sekvence koje reguliraju ekspresiju gena vezanjem na specifične molekule mRNA. Često su disregulirane u tumorima. Jedna miRNA može ciljati stotine mRNA, regulirajući time ekspresiju velikog broja gena koji su uključeni u ključne procese raka, uključujući proliferaciju, migraciju stanica i apoptozu (Siravegna G i sur., 2017.).

Profiliranje miRNA izvedeno je na ukupnoj RNA ekstrahiranoj iz seruma NSCLC-a korištenjem GenoExplorer mikroRNA ekspresijskog sustava. Dvije miRNA, miR-1254 i miR-574-5p, značajno su povećane u uzorcima NSCLC u ranoj fazi u usporedbi s kontrolama, s 82 % odnosno 77 % osjetljivosti i specifičnosti. Istraživanje sugerira potencijalnu ulogu ove dvije miRNA za neinvazivni pregled raka pluća (Foss i sur., 2016.).

#### **4.4.4. TEPs (engl. *tumor-educated platelets*) - neinvazivni biljeg u dijagnozi karcinoma pluća**

Trombociti su drugi najzastupljeniji tip stanica u perifernoj krvi. Predstavljaju cirkulirajuće fragmente enukleiranih stanica, koje potječu iz megakariocita u koštanoj srži, poznatih po svojoj ulozi u hemostazi. Trombociti komuniciraju s tumorskim stanicama i utječu na rast, invaziju i uspostavljanje udaljenih metastaza (Denis MM i sur., 2005.).

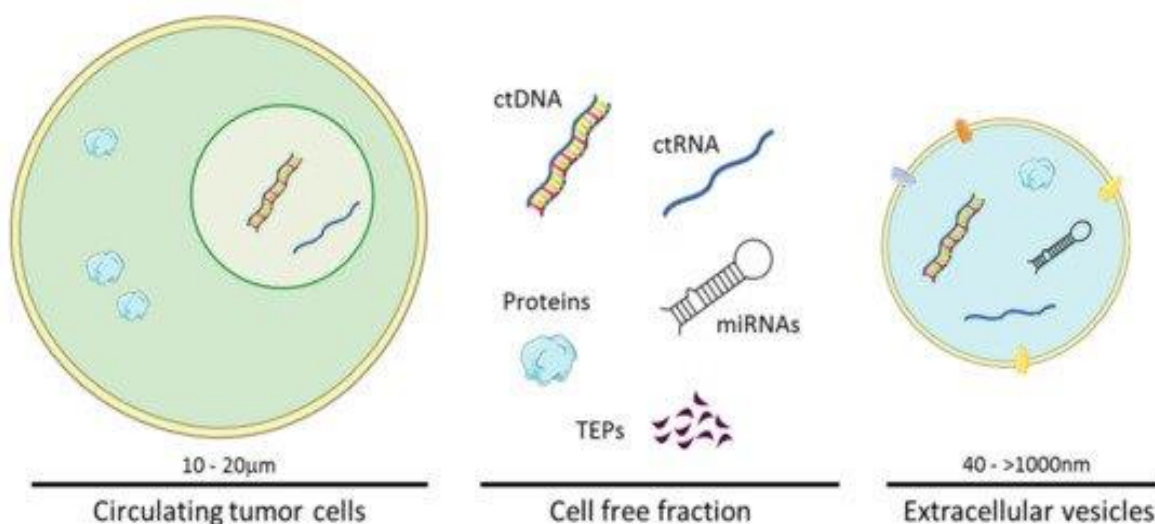
Osnovna studija karakterizirala je profile mRNA trombocita 283 uzorka, uključujući 228 uzorka metastatskih bolesnika koji boluju od šest vrsta tumora, uključujući NSCLC, rak debelog crijeva, glioblastom, rak gušterače, hepatobilijarni karcinom i rak dojke, te 55 uzorka zdravih osoba. Profili mRNA karakterizirani su pomoću SMARTer amplifikacije i sekvenciranja mRNA. Među 5003 RNA otkrivenih u svim uzorcima, pokazalo se da je ukupno 1453 mRNA povećano, a 793 smanjeno u trombocitima oboljelih u usporedbi s uzorcima trombocita zdravih darivatelja (Best i sur., 2015.).

Povećane TEP mRNA bile su uključene u biološke procese poput prijenosa mjehurića i vezanja citoskeletnih proteina, dok su smanjene mRNA bile snažno uključene u obradu i spajanje RNA. Profili mRNA uspjeli su razlikovati pacijente s lokaliziranim i metastaziranim tumorima od zdravih osoba s 96 % točnosti. Također je otkriveno da trombociti mogu pružiti dijagnostičke informacije i snažnu indikaciju o vrsti tumora i molekularnoj podklasi. Međutim, nisu izmjerene značajne razlike između nemetastaziranog i metastaziranog tumora, sugerirajući tako da TEP mRNA profili nemaju moć razlikovanja između određenih stadija karcinoma (Best i sur., 2015.).

#### **4.5. Koncept tekuće biopsije u dijagnozi glioblastoma**

Glioblastom je najčešći zloćudni i smrtonosni primarni tumor mozga u odraslih. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) klasificirala ga je kao astroцитom IV stupnja što predstavlja najviši stupanj malignosti prema histopatološkim, molekularnim i kliničkim značajkama ovih tumora (Louis i sur., 2016.). Predstavlja približno 15 % svih tumora na mozgu i čini 50 % glioma, a njegova učestalost kreće se od 1 do 5 slučajeva na 100 000 jedinki godišnje (Ostrom i sur., 2014.). Prosječno preživljavanje iznosi 12–15 mjeseci od trenutka dijagnoze, zbog čega glioblastom predstavlja agresivan tumor s pridruženim petogodišnjim preživljavanjem manjim od 5 %. Trenutni terapijski pristup je kirurška resekcija, praćena istodobnom radioterapijom i kemoterapijom temozolomidom (Stupp i sur., 2009.). Proliferativna, heterogena i kemorezistentna priroda glioblastoma vrlo kompromitira dostupne terapijske mogućnosti, što dovodi do recidiva i smrti (Louis i sur., 2016.).

Postupci vađenja tumorskog tkiva invazivni su, skupi i rizični za pacijenta. Biopsije tkiva predstavljaju malo i lokalizirano područje tumora i stoga ne mogu u potpunosti zahvatiti intratumoralnu heterogenost. Budući da se molekularni krajolik tumora dinamički razvija s vremenom, biopsije tkiva neće predstavljati reprezentativne uzorke tumora, jer se pacijenti ne mogu opetovano podvrgavati invazivnom postupku. Tekuća biopsija pojavila se kao obećavajući izvor biljega za dijagnostičke i prognostičke svrhe (Siravegna i sur., 2017.).



**Slika 21:** Biljezi u otkrivanju glioblastoma primjenom tekuće biopsije (Saenz-Antoñanzas i sur., 2019.)

#### 4.5.1. Identifikacija biljega u cerebrospinalnoj tekućini (CSF)

Cerebrospinalna tekućina je bezbojna biološka tekućina koju proizvode specijalizirane endodimske stanice unutar horoidnih pleksusa moždanih komora. Dobiva se lumbalnom punkcijom, invazivnim postupkom koji se može provesti kod pacijenata koji imaju tumore mozga, uključujući glioblastom. Budući da je likvor u izravnom kontaktu sa središnjim živčanim sustavom, tekuća biopsija likvora može se koristiti za profiliranje biljega u cirkulaciji poput ctDNA, proteina, egzosoma ili CTC-a u bolesnika s glioblastomom. Identifikacija biljega u likvoru prvi je put postignuta otkrivanjem visoke razine tenascina, glikoproteina izvanstaničnog matriksa, u bolesnika s tumorom mozga u usporedbi s kontrolnim bolesnicima (Saenz-Antoñanzas i sur., 2019.). Povišene razine osteopontina (OPN) zabilježene su u uzorcima likvora kod pacijenata s glioblastomom u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom (Schumann i sur., 2010.).

Razine vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i faktora rasta fibroblasta 2 (FGF2) značajno su više u bolesnika s glioblastomom te su povezane s kraćom ukupnom stopom preživljavanja, što pokazuje korisnost ovih proteina kao potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega (Peles i sur., 2004.). Utvrđeno je da je ekspresija faktora rasta živca (NGF) u likvoru povišena kako se povećava malignost glioma (Li i sur., 2011.).

#### **4.5.2. Biljezi glioblastoma u urinu**

Urin predstavlja koristan izvor biljega jer je njegovo prikupljanje neinvazivno, jednostavno i lako ponavljajuće. CftDNA može se otkriti u mokraći nakon bubrežne filtracije i naziva se transrenalna DNA (trDNA). Pojavljuje se u mokraći kao rezultat bubrežnog klirensa cftDNA prisutne u krvotoku (Botezatu i sur., 2000.). Urinarne biljege čine matrične metaloproteinaze (MMP) i VEGF te posjeduju prediktivnu sposobnost u otkrivanju primarnih tumora mozga, uključujući glioblastom s velikom osjetljivošću (95,2 %), specifičnošću (95,7 %) i ukupnom točnošću (92,5 %) (Smith i sur., 2008.). Biljezi MMP-2, MMP-9, NGAL i VEGF povišeni su u uzorcima bolesnika s glioblastomom u usporedbi s kontrolnim skupinama. Povišena ekspresija u urinu korelirala je s povećanom ekspresijom biljega u tkivu tumora. Međutim, dijagnostička sposobnost biljega bila je smanjena budući da je razvijena za širok spektar tumora mozga, a ne posebno za glioblastom (Saenz-Antoñanzas i sur., 2019.).

#### **4.5.3. CftDNA u uzorcima krvi pacijenata oboljelih od glioblastoma**

Povećana količina cftDNA utvrđena je u uzorcima krvi pacijenata s karcinomom, uključujući glioblastom, u usporedbi s kontrolnim skupinama ili osobama s benignim tumorom ili tumorom niskog stupnja. Razina cftDNA pozitivno korelira sa stadijem tumora (Shankar i sur., 2017.). U glioblastomu je prisutnost cftDNA u plazmi niska u usporedbi s drugim karcinomima, uglavnom zbog prisutnosti krvno-moždane barijere. NGS (*engl. next generation sequencing*) analiza cftDNA iz plazme ukupno 171 bolesnika s različitim karcinomima, uključujući 33 bolesnika s glioblastomom, uspješno je utvrdila najčešće mutacije gena *TP53*, *EGFR*, *MET*, *PIK3CA* i *NOTCH1* (Schwaederle i sur., 2016.).

#### 4.5.4. Egzosomi – prognostički biljezi u dijagnozi glioblastoma

Egzosomi su vezikule koje mogu prelaziti anatomske odjeljke poput krvno-moždane barijere, što ih čini potencijalnim izvorom biljega za glioblastom. Molekularne promjene u različitim genima, kao što su *EGFRvIII*, *IDH1* i *PTEN*, pronađene su u egzosomima proizvedenim iz glioblastoma (Garcia Romero i sur., 2017.).

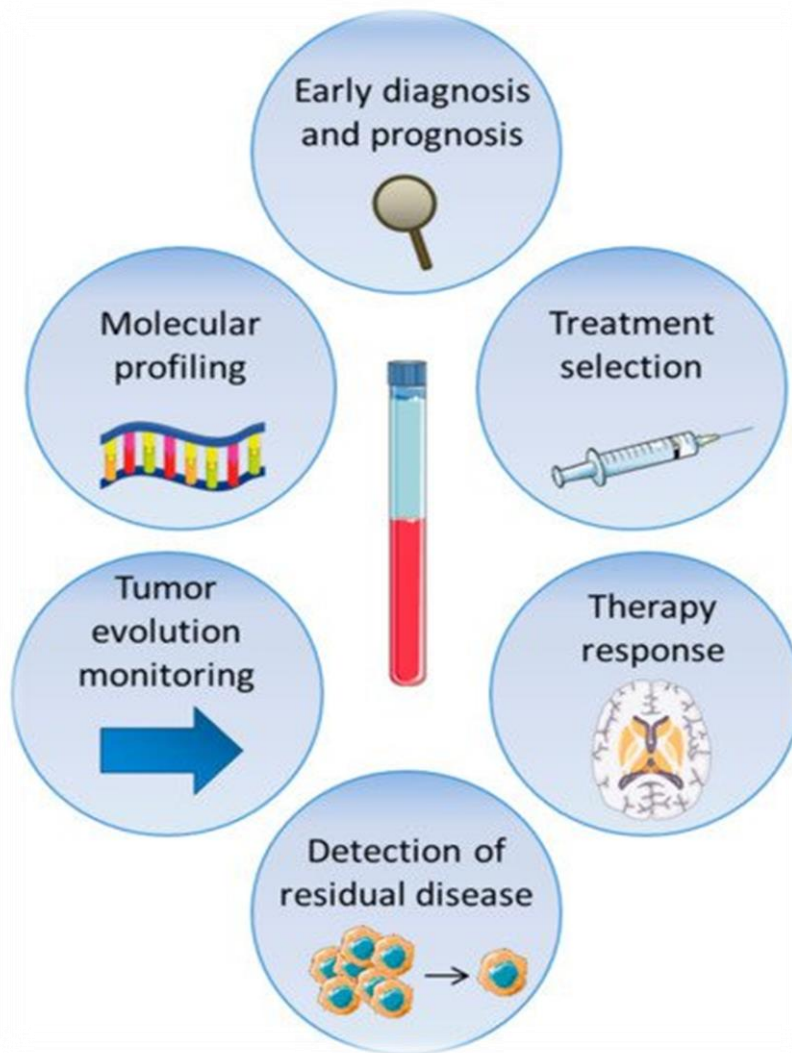
Ekspresija PD-L1 pronađena je na površini egzosoma. Uloga PD-L1 je spriječiti aktivaciju i proliferaciju T stanica izravnim vezanjem, što ukazuje da je ekspresija PD-L1 na egzosomima mehanizam imunološkog biljega za glioblastom (Ricklefs i sur., 2018.). Liječenje temozolomidom može utjecati na oslobađanje egzosoma i pružiti rezistenciju na lijek. Egzosomi, koji su otporni na lijek, imaju deregulirane razine proteina transglutaminaze 2 (TGM2), biljega matičnosti NESTIN-a i glikoproteina CD44 i CD133 (Garnier i sur., 2018.).

**Tablica 4:** Prikaz proteina čija je ekspresija povišena u bolesnika s gliomom

(Saenz-Antoñanzas i sur., 2019.)

Haptoglobin alfa 2
YKL-40
AHSG
Alfa tokoferol
Gama tokoferol





**Slika 22:** Mogućnosti primjene tekuće biopsije kod glioblastoma. Različite molekule u cirkulaciji mogu se primijeniti za usmjeravanje početne dijagnoze, predviđanja prognoze, molekularnog profiliranja tumora, planiranja liječenja, praćenja pacijenta, praćenja evolucije tumora i otkrivanja relapsa glioblastoma (preuzeto i prilagođeno prema Saenz-Antoñanzas i sur., 2019.).

## 4.6. Budućnost tekuće biopsije u prenatalnoj dijagnostici

Klinička primjena cfNA molekula u prenatalnoj dijagnostici započela je 1997., kad je Dennis Lo sa Sveučilišta u Hong Kongu otkrio fetalni spol i RhD grupu u majčinoj plazmi primijenjujući PCR tehniku u stvarnom vremenu. Otkriveno je da majčina krv sadrži molekule cfDNA koje potječu u 90-95 % od majke i u 5-10 % od fetusa (Lo Y.M. i sur., 1997.). Masovno paralelno sekvenciranje (MPS) omogućilo je širu prenatalnu kliničku primjenu od 2011. kada je objavljeno prvo izvješće o određivanju trisomije 21. NGS metode upozorile su na majčine onkološke bolesti, koje još nisu bile dijagnosticirane, i time omogućile kliničku primjenu MPS-a u području onkologije (Palomaki i sur., 2011.).

**Tablica 5:** Prikaz cirkulirajućih izvanstaničnih nukleinskih kiselina koje imaju prenatalni dijagnostički značaj (preuzeto i prilagođeno prema Bálint N., 2019.)

Genomska DNA	gDNA	Trisomija,delecija,mikrodelecija,mutacija
Mitohondrijska DNA	mtDNA	Prijevremena prijelomna ruptura
Micro RNA	miRNA	Preeklampsija, urođena malformacija srca, gestacijski dijabetes
Cirkulirajuća RNA	circRNA	Gestacijski dijabetes, fetalne srčane malformacije
Duga nekodirajuća RNA	lncRNA	Urođena malformacija srca

Urođene malformacije srca uzrokuje ozbiljne zdravstvene probleme koji čine 30-50 % smrtnosti novorođenčadi. Rana prenatalna dijagnoza može smanjiti postnatalni morbiditet i smrtnost. Zhu i sur. usporedili su miRNA profile žena koje imaju fetus s urođenim malformacijama srca i zdravih trudnica te SoLiD sekvenciranjem otkrili povišenu vrijednost miR-19b, miR-22, miR-29c i miR-375. Povišena razina miR-99a predstavlja mogući biljeg za otkrivanje urođenih srčanih malformacija analizom uzoraka majčine plazme (Zhu i sur., 2013.).

Povišena razina mitohondrijske DNA molekule (mtDNA) uočena je u komplikacijama povezanih s trudnoćom poput preeklampsije, ograničenja rasta fetusa te prijevremenih poroda. Kacerovsky i sur. proučavali su razine mtDNA i nDNA molekula u uzorcima amnionske tekućine te dokazali da je povišena razina tih molekula povezana s intraamnijskim upalnim odgovorom (Kacerovsky i sur., 2018.).

Preeklampsija je ozbiljna bolest povezana s trudnoćom i javlja se u oko 3-5% trudnoća. Glavni je uzrok mortaliteta i smrtnosti majki i novorođenčadi. Disfunkcija posteljice smatra se glavnim uzrokom preeklampsije, dok abnormalna ekspresija miRNA u patofiziološkom procesu bolesti predstavlja mogući biljeg u dijagnozi. Skallis i sur. objavili su pregled miRNA u preeklampsiji te ih podijelili prema ulozi u migraciji i invaziji trofoblasta (miR-195, miR-276C, miR-278a-5p, miR-210), angiogenezi (miR-210, miR-21, miR-22) te poremećaju regulacije imunološkog sustava majke (miR-223, miR-148a, miR-152) (Skallis i sur., 2019.).

## 5. ZAKLJUČAK

Temeljem proučavanja problematike, a prema u radu navedenoj literaturi mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Tekuća biopsija je koncept koji omogućava bolju ranu dijagnozu, prognozu kliničkoga ishoda i predviđanje kemoterapijskog odgovora ili razvoja kemorezistencije u bolesnika s karcinomima.
- Tekuća biopsija predstavlja inovaciju na području onkološke medicine te napredak u dijagnostici malignih bolesti.
- Neinvazivna je metoda kojom se iz uzorka krvi ili neku druge tjelesne tekućine izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice, slobodna cirkulirajuća DNA, cirkulirajući egzosomi ili mikroRNA, koji služe, s jedne strane sami kao izvor specifičnih biljega, a s druge strane neki od njih i sami su biljezi za dijagnozu malignih bolesti.
- Dijagnoza malignih oboljenja često je u podmakloj i neoperabilnoj fazi, no primjenom tekuće biopsije postiže se napredak u liječenju i ukupnom preživljavanju.
- Posjeduje izvanredne prednosti u odnosu na tradicionalnu biopsiju tkiva: nema rizika, neinvazivna je i bezbolna, ne zahtijeva operaciju te smanjuje troškove i vrijeme dijagnoze.
- Brzi metabolizam tumorskih stanica predstavlja uzrok stalnog oslobađanja specifičnih biljega: nukleinskih kiselina, vezikula i CTC-a
- Otkrivanjem cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC) u primarnom karcinomu jajnika, dokazano je da su CTC invazivne i da je njihova prisutnost u korelaciji sa smanjenim preživljavanjem.

- Izvanstanične vezikule (egzosomi) pospješuju rast, invaziju i metastaziranje tumora, stoga predstavljaju novi izvor biljega u liječenju karcinoma jajnika i dojke.
- Egzosomi koji sadrže aneksin A3 i miR-1246 induciraju veću otpornost neoplazmi na terapiju cisplatinom, platinom i paklitakselom.
- CftDNA čini mali postotak cfDNA te predstavlja neinvazivno, dijagnostičko, prognostičko i prediktivno sredstvo, jer predstavlja lako dostupan izvor tumorske DNA.
- Promjena u broju CTC-a služi kao rani dijagnostički pokazatelj u dijagnozi gastrointestinalnih karcinoma te omogućuje praćenje recidiva tumora i ukupnog preživljavanja.
- Metilacija cftDNA pridonosi ranoj karcinogenezi te predstavlja biljeg za ranu dijagnozu karcinoma pankreasa i pluća.
- Tekuća biopsija predstavlja inovaciju u dijagnozi i prognozi glioblastoma, agresivnog i zloćudnog tumora središnjeg živčanog sustava. Identifikacija biljega u cerebrospinalnoj tekućini omogućava molekularno profiliranje glioblastoma te praćenje tumorske bolesti.
- Koncept tekuće biopsije pruža nove mogućnosti istraživanja u prenatalnoj dijagnostici. Studije miRNA molekula u majčinoj cirkulaciji poboljšavaju učinkovitost dijagnoze te pružaju nove mogućnosti u otkrivanju fetalnih srčanih malformacija.
- Povišena razina mitohondrijske DNA molekule (mtDNA) predstavlja specifičan biljeg za dijagnozu komplikacija povezanih s trudnoćom poput preeklampsije, ograničenja rasta fetusa te prijevremenih poroda.

## 6. LITERATURA

1. Andrašić Petra. Tekuća biopsija – napredak u dijagnostici karcinoma i potencijal za rana otkrivanja. *Recipe*, 2020.
2. Asante Du Bois, Calapre Leslie, Zimanad Melanie, Meniawy M. Tarek, Gray Elin S. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time? *Cancer Letters*, 2020, 468, 59-71.
3. Bálint Nagy. Cell-free nucleic acids in prenatal diagnosis and pregnancy-associated diseases. *EJIFCC*, 2019, 30(2), 215–223.
4. Best MG, Sol N, Kooi I et al. RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* 2015, 28, 666-76.
5. Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G., Shelepov V., Alechina R., Molyaka Y., Ananev V., Bazin I., Garin A., Narimanov M. et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1078–1084.
6. *CellSearch®*, 2021, <http://www.cellsearch.com>, pristupljeno 5.5.2021.
7. Denis MM., Tolley ND., Bunting M. et al. Escaping the nucleat confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleated platelets. *Cell*, 2005, 122, 379-91.
8. Dhahbi J.M., Spindler S.R., Atamna H., Boffelli D., Martin D.I. Deep sequencing of serum small RNAs identifies patterns of 5'tRNA half and YRNA fragment expression associated with breast cancer. *Biomark. Cancer*, 2014, 6, 37-47.
9. Domínguez-Vigil Irma G, Moreno-Martínez Ana K., Wang Julia, Roehrl Michael H. A. and Barrera-Saldaña Hugo A. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*, 2018, 9, 2912-2922.
10. Dotan E., Alpaugh R.K., Ruth K., Negin B.P., Denlinger C.S., Hall M.J., et al. Prognostic significance of muc-1 in circulating tumor cells in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 2016, 45 (8), 1131-1135.
11. Esteller M., Herman J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*, 2002, 196, 1-7.

12. Fan T., Zhao Q., Chen JJ., Chen WT., Pearl ML. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2009, 112, 185–91.
13. Feifei Cheng, Su Li and Qian Cheng. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 2016, 7(30), 48832–48841.
14. Foss KM., Sima C., Ugolini D., et al. MiR-1254 and miR-574-5p: Serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2011, 6, 482-8.
15. Garcia-Romero N., Carrion-Navarro J., Esteban-Rubio S., Lazaro-Ibanez E., Peris-Celda M., Alonso M.M., Guzman-De-Villoria J., Fernandez-Carballal C., De Mendivil A.O., Garcia-Duque S., et al. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget*, 2017, 8, 1416–1428.
16. Halvaei Sina, Daryani Shiva, Eslami-S Zahra, Tayebbeh Oghabi Bakhshayesh, Keivan Majidzadeh, Rezvan Esmaeili. Exosomes in Cancer Liquid Biopsy: A Focus on Breast Cancer. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.014>, pristupljeno 13.3.2021.
17. Hwa Mi Kang, Gwang Ha Kim, Hye Kyung Jeon, Dae Hwan Kim, Tae Yong Jeon, DoYoun Park, et al. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: Role in early diagnosis of gastric cancer. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180251>, pristupljeno 05.04.2021.
18. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61 (2), 69-90.
19. Judson PL, Geller MA, Bliss RL, Boente MP, Downs LS, Argenta PA, et al. Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2003, 91, 389–94.
20. Kacerovsky M., Vlkova B., Musilova I., Andrys C., Pliskova L., Zemlickova H., Stranik J., Halada P., Jacobsson B., Celec P. Amniotic fluid cell-free DNA in preterm prelabor rupture of membranes. *Prenat Diagn*. 2018, 38(13), 1086-1095.
21. K.E. Poruk, A.L. Blackford, M.J. Weiss, J.L. Cameron, J. He, M. Goggins, et al. Circulating tumor cells expressing markers of tumor-initiating cells predict poor survival and cancer recurrence in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2017, 23 (11), 2681-2690.

22. Kolostova K., Pinkas M., Jakabova A., Pospisilova E., Svobodova P., Spicka J., et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer. *Am J Cancer Res*, 2016, 6, 973–80.
23. Krsić Jure, Sinčić Nino i Samija Ivan. Liquid biopsy for patients with cancer different approaches and clinical applications. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*, 2018, 2, 1-8.
24. L. Giannopoulou et al. RASSF1A promoter methylation in high-grade serous ovarian cancer: a direct comparison study in primary tumors, adjacent morphologically tumor cell-free tissues and paired circulating tumor DNA. *Oncotarget*, 2017, 8 (13), 21429.
25. Li Q.Y., Yang Y., Zhang Y., Zhang Z.J., Gong A.H., Yuan Z.C., Lu P.S., Zhan L.P., Wang P., Feng Y. et al. Nerve growth factor expression in astrocytoma and cerebrospinal fluid: A new biomarker for prognosis of astrocytoma. *Chin. Med. J.*, 2011, 124, 2222–2227.
26. Lo Y. M., Corbetta N., Chamberlain P. F., et al.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350 (9076), 485–487.
27. Louis David N., Perry Arie, Reifenberger Guido, Von Deimling Andreas, Figarella-Branger Dominique, Cavenee Webster K., Ohgaki Hiroko, Wiestler Otmar D., Kleihues Paul, Ellison David W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol*, 2016, 131, 803–820.
28. Marrugo-Ramírez José, Mir Mònica and Samitier Josep. Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(10), 2877.
29. Marth C., Kisic J., Kaern J., Trope C., Fodstad O. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer*, 2002, 94, 707–12.
30. Min Yu, Stott Shannon, Toner Mehmet, Maheswaran Shyamala, Haber Daniel A. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*, 2011, 192 (3), 373–382.
31. *Nanocollect*, 2021, <https://nanocollect.com/blog/how-does-flow-cytometry-work/>, pristupljeno 5.4.2021.



32. Neumann Martin H.D., Bender Sebastian, Krahn Thomas, Schlange Thomas. CtDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Computational and structural biotechnology journal*, 2018, 16, 190-195.
33. Newman AM., Bratman SV., To J., et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 2014, 20, 548-54.
34. Ostrom Q.T., Bauchet L., Davis F.G., Deltour I., Fisher J.L., Langer C.E., Pekmezci M., Schwartzbaum J.A., Turner M.C., Walsh K.M. et al. The epidemiology of glioma in adults: A “state of the science” review. *Neuro Oncol*, 2014, 16, 896–913.
35. Palomaki G. E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G. M., et al.: DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet. Med.*, 2011, 13(11), 913–920.
36. Peles E., Lidar Z., Simon A.J., Grossman R., Nass D., Ram Z. Angiogenic factors in the cerebrospinal fluid of patients with astrocytic brain tumors. *Neurosurgery*, 2004, 55, 562–567.
37. Periša Josipa, Bulić Petra, Špacir Prskalo Zvezdana, Gaće Mihaela i Mayer Ljiljana. Possibilities of liquid biopsy in clinical practice. *Libri Oncol.*, 2017, 45(1), 23–30.
38. Priya Samuel, Mulcahy Laura Ann, Furlong Fiona, McCarthy Helen O., Brooks Susan Ann, Fabbri Muller, Pink Ryan Charles et al. Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells. Dostupno na: <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0065>, pristupljeno 2.04.2021.
39. Ponomaryova AA., Rykova EY., Cherdynseva NV., et al. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2013, 81, 397-403.
40. Qin W., Tsukasaki Y., Dasgupta S., Mukhopadhyay N., Ikebe M., Sauter E.R. Exosomes in human breast milk promote EMT. *Clin. Cancer Res.* 2016, 22, 4517-4524.
41. Redžović Arnela, Pavlović Sanja, Dobrila-Dintinjana Renata. Circulating tumor cells – A window into the near future. *Medicina fluminensis*, 2015, 51(3), 396-400.
42. Ricklefs F.L., Alayo Q., Krenzlin H., Mahmoud A.B., Speranza., M.C., Nakashima H., Hayes J.L., Lee K., Balaj L., Passaro C. et al. Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci. Adv.*, 2018, 4, 2766.

43. Saenz-Antoñanzas Ander, Auzmendi-Iriarte Jaione, Carrasco-Garcia Estefania, Moreno-Cugnon Leire, Ruiz Irune, Villanua Jorge, Egaña Larraitz, Otaegui David, Samprón Nicolás and Matheu Ander. Liquid Biopsy in Glioblastoma: Opportunities, Applications and Challenges. *Cancers*, 2019, 11(7), 950.
44. Santarpia Mariacarmela, Liguori Alessia, D'Aveni Alessandro, Karachaliou Niki, Gonzalez-Cao Maria, Grazia Daffinà Maria, Lazzari Chiara, Altavilla Giuseppe, Rosell Rafael, Liquid biopsy for lung cancer early detection. Dostupno na: <https://jtd.amegroups.com/article/view/20370>, pristupljeno 18.04.2021.
45. Schmidt B., Liebenberg V., Dietrich D. et al. SHOX2 DNA methylation for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*, 2010, 10, 600.
46. Schuhmann M.U., Zucht H.D., Nassimi R., Heine G., Schneekloth C.G., Stuerenburg H.J., Selle H. Peptide screening of cerebrospinal fluid in patients with glioblastoma multiforme. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.*, 2010, 36, 201–207.
47. Schwaederle M., Husain H., Fanta P.T., Piccioni D.E., Kesari S., Schwab R.B., Banks K.C., Lanman R.B., Talasaz A., Parker B.A. et al. Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget*, 2016, 7, 9707–9717.
48. Shankar G.M., Balaj L., Stott S.L., Nahed B., Carter B.S. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2017, 17.
49. Sherman-Samis M., Onallah H., Holth A., Reich R., Davidson B. SOX2 and SOX9 are markers of clinically aggressive disease in metastatic high-grade serous carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 2019, 153, 651-660.
50. Shivapurkar N., Gazdar AF. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Curr Mol Med*, 2010, 10, 123-32.
51. Siravegna G., Marsoni S., Siena S., et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14, 531-48.
52. Siravegna G., Mussolin B., Venesio T., Marsoni S., Seoane J., Dive C., Papadopoulos N., Kopetz S., Corcoran R.B., Siu L.L., Bardelli A. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Annals of Oncology*, 2019, 1580-1590.
53. Skallis G., Katsi V., Miliou A., Georgiopoulos G., Papazachou O., Vamvakou G., Nihoyannopoulos P., Tousoulis D., Makris T. MicroRNAs in Preeclampsia. *MicroRNA*, 2019, 8(1), 28-35.

54. Smith E.R., Zurakowski D., Saad A., Scott R.M., Moses M.A. Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14, 2378–2386.
55. Sozzi G., Roz L., Conte D., et al. Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 179, 69-74.
56. Stupp R., Mason W.P., Van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, 987–996.
57. Tang M.K.S., Yue P.Y.K., Ip P.P., Huang R.L., Lai H.C., Cheung A.N.Y., Tse K.Y., Ngan H.Y.S., Wong A.S.T. Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04695-7>, pristupljeno 10.2.2021.
58. Volik S.V., Annala M., Beja K., McConeghy B., Haegert A., Warner E.W., Mo F., Brahmbhatt S. et al. Genomic alterations in cell-free DNA and enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol.*, 2016, 2, 1598-1606.
59. Wang Lijun, Zhao Fei, Xiao Zhongqing, Yao Liang. Exosomal microRNA-205 is involved in proliferation, migration, invasion, and apoptosis of ovarian cancer cells via regulating VEGFA. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0990-z>, pristupljeno 1.3.2021.
60. Wei T., Zhang X., Zhang Q., Yang J., Chen Q., Wang J., et al. Vimentin-positive circulating tumor cells as a biomarker for diagnosis and treatment monitoring in patients with pancreatic cancer. *Cancer Lett.*, 2019, 452, 237-243.
61. Yin J., Yan X., Yao X., Zhang Y., Shan Y., Mao N., Yang Y., Pan L. Secretion of annexin A3 from ovarian cancer cells and its association with platinum resistance in ovarian cancer patients. *J. Cell. Mol. Med.*, 2012, 16, 337-348.
62. Zhang X., et al. Analysis of circulating tumor cells in ovarian cancer and their clinical value as a biomarker. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018, 45 (8), 1983-1994.
63. Zhou B., Xu K., Zheng X. et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00258-9>, pristupljeno 18.02.2021.

64. Zhu S., Cao L., Zhu J., et al. Identification of maternal serum microRNAs as novel non- invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin Chim Acta*, 2013, 424, 66–72.

## 7. SAŽETAK /SUMMARY

### 7.1. Sažetak

Maligne bolesti predstavljaju glavni uzrok smrtnosti nakon kardiovaskularnih oboljenja. Dijagnoza karcinoma često je u neodgovarajućoj i neoperabilnoj fazi, stoga metastatsko širenje karcinoma predstavlja glavni uzrok smrti pacijenata oboljelih od malignih bolesti. Tekuća biopsija predstavlja inovativni koncept u području onkološke dijagnostike. Neinvazivna je metoda kojom se iz uzorka krvi ili neke druge tjelesne tekućine izoliraju elementi poput cirkulirajuće tumorske stanice (CTC), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA), cirkulirajući egzozomi ili mikroRNA koji sami služe kao biljezi ili sadrže specifične biljege.

Imunocitokemijskim testom je utvrđeno da su CTC invazivne te da je njihova prisutnost u korelaciji sa smanjenim preživljavanjem osoba oboljelih od malignih bolesti. Egzozomi kao izvanstanične vezikulske strukture također predstavljaju specifičan biljeg koji pospješuje rast, invaziju, metastaziranje i angiogenezu tumora. Reprezentativniji su u odnosu na ostale biljege, jer sadrže biološki materijal iz roditeljskih stanica. Također, na površini mogu imati eksprimirane specifične tumorske biljege, poput proteina, koji povećavaju kemorezistenciju.

Tekuća biopsija obuhvaća izoliranje CTC-a, egzozoma, cfDNA te njihovu daljnju analizu. Može se primijeniti za dijagnozu, predviđanje prognoze, molekularno profiliranje tumora, planiranje liječenja, praćenja pacijenta, praćenja evolucije tumora i otkrivanja relapsa.

**Ključne riječi:** tekuća biopsija, cirkulirajuća tumorska DNA, egzozomi te cirkulirajuća izvanstanična DNA (cfDNA)

## 7.2. Summary

Malignant diseases are the leading cause of death after cardiovascular disease. The diagnosis of cancer is often in an insidious and inoperable phase, so metastatic spread of cancer is the leading cause of death in patients with malignant diseases. Liquid biopsy is an innovative concept in the field of oncology diagnostics. It is a non-invasive method of isolating elements such as circulating tumor cells (CTC), free circulating DNA (cfDNA), circulating exosomes or microRNAs that themselves serve as markers or contain specific markers from a blood sample or some other body fluids.

Immunocytochemical test revealed that CTC were invasive and that their presence correlated with reduced survival of persons with malignant diseases. Extracellular vesicles also represent a specific marker that promotes tumor growth, invasion, metastasis, and angiogenesis. They are more representative compared to other markers because they contain biological material from the parent cells. Also, they may have specific tumor markers, such as proteins, expressed on the surface, which increase chemoresistance.

Liquid biopsy involves the isolation of CTCs, exosomes, cfDNA, and their further analysis. It can be used for diagnosis, prognosis prediction, molecular tumor profiling, treatment planning, patient monitoring, tumor evolution monitoring, and relapse detection.

**Key words:** liquid biopsy, circulating tumor DNA, exosomes, and circulating extracellular DNA (cfDNA)

## 8. PRILOZI

### 8.1. Popis kratica

ALIX- ALG-2-interakcijski protein X (engl. *apoptosis-linked gene 2–interacting protein X*)

APC- adenomatozna polipoza koli (engl. *adenomatous polyposis coli*)

CA-125- tumorski antigen 125 (engl. *cancer antigen 125*)

CAPP-Seq-personalizirano profiliranje raka dubokim sekvenciranjem (engl. *Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing*)

CD64- klaster diferencijacije 64 (engl. *cluster of differentiation 64*)

CDH13- kadherin 13 (engl. *cadherin-13*)

cf DNA- cirkulirajuća izvanstanična DNA (engl. *cell-free DNA*)

CSF- cerebrospinalna tekućina (engl. *cerebrospinal fluid*)

CTC- cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulant tumour cells*)

DLEC1- izbrisani protein u karcinomu pluća i ezofagusa (engl. *deleted in lung and esophageal cancer protein 1*)

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

EFEMP1- izvanstanični matriksni protein sličan fibulinu koji sadrži EGF (engl. *EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*)

EpCAM- adhezivna molekula epitelnih stanica (engl. *epithelial cell adhesion molecule*)

ESA- epitelni specifični antigen (engl. *epithelial specific antigen*)

FGF2-faktor rasta fibroblasta 2 (engl. *fibroblast growth factor 2*)

GE11- glikoprotein ovojnice (engl. *envelope glycoprotein 11*)

GPC1- glipikan 1 (engl. *glypican-1*)

HE4- humani epididimalni protein 4 (engl. *human epididymal protein*)

HEK 293- ljudske embrionalne stanice bubrega (engl. *human embryonic kidney cells*)

HSP70,20- proteini toplinskog šoka 70,20 (engl. *heat shock protein*)

hTERT- ljudski gen za telomerazu (engl. *human telomerase reverse transcriptase*)

HUVE- humana umbilikalna vena (engl. *human umbilical vein*)

IDH1-izocitrat dehidrogenaza 1 (engl. *isocitrate dehydrogenase 1*)

KLK10- kalikrein 10 (engl. *kallikrein-10*)

KRT 18,19- keratin (engl. *keratin 18,19*)

LB- tekuća biopsija (engl. *liquid biopsy*)

lncRNA- duga nekodirajuća ribonukleinska kiselina (engl. *long non-coding RNA*)

MMP- matriksna metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases*)

MPS- masovno paralelno sekvenciranje (engl. *massive parallel sequencing*)

mRISC- miRNA inducirani kompleks za utišavanje (engl. *microRNA induced silencing complex*)

mRNA-glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

MUC 1,16 -mucin (engl. *mucin 1,16*)

NESTIN- marker neuroektodermalnih matičnih stanica (engl. *neuroectodermal stem cell marker*)

NGAL- lipokalin povezan s neutrofilnom želatinazom (engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*)

NGF –faktor rasta živca (engl. *nerve growth factor*)

NOTCH protein (engl. *neurogenic locus notch homolog protein*)

NSLC- karcinom pluća koji nema male stanice (engl. *non small lung cell cancer*)

OPN- osteopontin (engl. *osteopontin*)

OVCAR- karcinom jajnika (engl. *ovarian carcinoma*)



PDL-1- ligand programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed death-ligand 1*)

PIK3CA- katalitička podjedinica alfa fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat-3-kinaze (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase catalytic subunit alpha*)

PTEN- fosfataza i tenzin homolog (engl. *phosphatase and tensin homolog*)

RAR- $\beta$ - receptor beta retinoične kiseline (engl. *retinoic acid receptor beta*)

RASSF1A- gen za domenu 1A obitelji asocijacije RAS (engl. *ras association domain family 1 isoform A*)

SFRP1- izlučeni kovrdžavi protein (engl. *secreted frizzled-related protein*)

SHOX2 (engl. *short-stature homeobox 2*)

STAT- transduktor signala i aktivator transkripcije (engl. *signal transducer and activator of transcription*)

TEPs- trombociti obrazovani tumorom (engl. *tumor-educated platelets*)-

TGF- $\beta$ 2- transformirajući faktor rasta beta 2 (engl. *transforming growth factor beta 2*)

TGM2- transglutaminaza 2 (engl. *transglutaminase*)

TNBC- trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple negative breast cancer*)

TP53- tumor supresorski protein (engl. *tumor suppressor protein P53*)

trDNA-transrenalna DNA (engl. *transrenal DNA*)

TS101- timidilat sintaza 101 (engl. *thymidylate synthase 101*)

TVU- transvaginani ultrazvuk (engl. *transvaginal ultrasound*)

UCA1- gen povezan s karcinomom mokraćnog mjehura (engl. *urothelial cancer associated 1 gene*)

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

# 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Samostalni kolegij : Biokemija  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## TEKUĆA BIOPSIJA U DIJAGNOSTICI MALIGNIH BOLESTI

**Tea Klarin**

### SAŽETAK

Maligne bolesti predstavljaju glavni uzrok smrtnosti nakon kardiovaskularnih oboljenja. Dijagnoza karcinoma često je u poodmakloj i neoperabilnoj fazi, stoga metastatsko širenje karcinoma predstavlja glavni uzrok smrti pacijenata oboljelih od malignih bolesti. Tekuća biopsija predstavlja inovativni koncept na području onkološke dijagnostike. Neinvazivna je metoda kojom se iz uzorka krvi ili neke druge tjelesne tekućine izoliraju elementi poput cirkulirajuće tumorske stanice (CTC), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA), cirkulirajući egzozomi ili mikroRNA koji sami služe kao biljezi ili sadrže specifične biljege. Imunocitokemijskim testom je utvrđeno da su CTC invazivne te da je njihova prisutnost u korelaciji sa smanjenim preživljavanjem osoba oboljelih od malignih bolesti. Egzozomi kao izvanstanične vezikulne strukture također predstavljaju specifičan biljeg koji pospješuje rast, invaziju, metastaziranje i angiogenezu tumora. Reprezentativniji su u odnosu na ostale biljege, jer sadrže biološki materijal iz roditeljskih stanica. Također, na površini mogu imati ekspimirane specifične tumorske biljege, poput proteina, koji povećavaju kemorezistenciju. Tekuća biopsija obuhvaća izoliranje CTC-a, egzozoma, cfDNA te njihovu daljnju analizu. Može se primijeniti za dijagnozu, predviđanje prognoze, molekularno profiliranje tumora, planiranje liječenja, praćenja pacijenta, praćenja evolucije tumora i otkrivanja relapsa.

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

Rad sadrži: 54 stranica, 22 grafičkih prikaza, 5 tablica i 64 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tekuća biopsija, cirkulirajuća tumorska DNA, egzozomi te cirkulirajuća izvanstanična DNA (cfDNA)

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

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

**Dr. sc. Donatella Verbanac**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Independent course: Biochemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### LIQUID BIOPSY IN THE DIAGNOSIS OF MALIGNANT DISEASES

Tea Klarin

#### SUMMARY

Malignant diseases are the leading cause of death after cardiovascular disease. The diagnosis of cancer is often in an insidious and inoperable phase, so metastatic spread of cancer is the leading cause of death in patients with malignant diseases. Liquid biopsy is an innovative concept in the field of oncology diagnostics. It is a non-invasive method of isolating elements such as circulating tumor cells (CTC), free circulating DNA (cfDNA), circulating exosomes or microRNAs that themselves serve as markers or contain specific markers from a blood sample or some other body fluids. Immunocytochemical test revealed that CTC were invasive and that their presence correlated with reduced survival of persons with malignant diseases. Extracellular vesicles also represent a specific marker that promotes tumor growth, invasion, metastasis, and angiogenesis. They are more representative compared to other markers because they contain biological material from the parent cells. Also, they may have specific tumor markers, such as proteins, expressed on the surface, which increase chemoresistance. Liquid biopsy involves the isolation of CTCs, exosomes, cfDNA, and their further analysis. It can be used for diagnosis, prognosis prediction, molecular tumor profiling, treatment planning, patient monitoring, tumor evolution monitoring, and relapse detection.

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

Thesis includes: 54 pages, 22 figures, 5 tables and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: liquid biopsy, circulating tumor DNA, exosomes, and circulating extracellular DNA (cfDNA)

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

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Donatella Verbanac, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021..