

Personalizirani pristup liječenju raka

Struški, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:900389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petra Struški

Personalizirani pristup liječenju raka

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Petra Struški

**A personalized approach to cancer
treatment**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlič.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Personalizirani pristup liječenju raka

Petra Struški

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tumori su vrlo kompleksne i heterogene bolesti čije liječenje je vrlo zahtjevno. U konvencionalnom pristupu liječenja svi pacijenti s istom vrstom tumora primaju sličnu terapiju. Napretkom istraživanja i tehnologije produbljeno je znanje o tumorima te takav pristup liječenju više nije zadovoljavajući. Međutim, novootkriveno znanje nije lako prenijeti u kliničku primjenu. Probleme uzrokuje adaptabilnost tumora te velika količina informacija prekompleksnih za interpretaciju. U ovom radu prezentirane su metode istraživanja te personaliziranog tretmana tumora. Sve metode se prvenstveno temelje na biopsiji, metodama molekularnog profiliranja, kulturi stanica te biomarkerima. Iz toga proizlaze modeli ksenografta i organoida te adoptivna stanična terapija i cjepivo protiv raka. Važnost ksenografta i organoida je pružanje što vjernijeg modela tumora *ex vivo* da bi se determinirala najbolja moguća terapija za pojedinog pacijenta. S druge strane, metode cjepiva i adoptivne stanične terapije omogućuju imunološkom sustavu pacijenta da napada tumor. Rezultati spomenutih metoda su vrlo obećavajući, ali imaju i određene nedostatke kojih moramo biti svjesni. Za dobivanje najboljih rezultata u istraživanju i tretmanu raka trebamo kombinirati dostupne metode i pažljivo interpretirati rezultate. U svakom slučaju, personalizirani tretman raka je iznimno djelotvoran za pojedine pacijente. Unatoč tome, takav pristup još uvijek nije spreman za primjenu u generalnoj populaciji.

Ključne riječi: tumor, ksenografti, organoidi, stanična terapija, biomarkeri

(37 stranica, 9 slika, 1 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

A personalized approach to cancer treatment

Petra Struški

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Tumors are extremely complex and heterogeneous diseases whose treatment is very demanding. Conventional approach treats all patients with the same type of tumor with similar therapy. Advances in tumor research and new technology made conventional approaches obsolete. However, newly discovered knowledge is not readily transferable to clinical application. Challenges include adaptability of the tumor and the large amount of information too complex to interpret. In this paper, research methods and personalized tumor treatments are introduced. All methods are founded on biopsy, molecular profiling methods, cell culture and biomarkers. From those base methods emerge xenograft and organoid models, as well as adoptive cell therapy and cancer vaccine. Xenografts and organoids provide us with the most accurate tumor model possible *ex vivo* to determine the best therapy for the patient. On the other hand, cancer vaccines and adoptive cell therapies enable the patient's immune system to attack the tumor. These methods give promising results, but they come with certain shortcomings. The best results in cancer research and treatment are obtained by utilizing the mix of available methods and carefully interpreting results. In large, personalized cancer treatment is very successful for singular patients. Nevertheless, it still is not ready for application in the general population.

Keywords: tumor, xenografts, organoids, cell therapy, biomarkers

(37 pages, 9 figures, 1 table, 77 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

SADRŽAJ

1	UVOD	- 1 -
2	METODE ISTRAŽIVANJA I LIJEČENJA RAKA U PERSONALIZIRANOJ MEDICINI. - 3 -	
2.1	BIOPSIJA TUMORA	- 3 -
2.2	METODE MOLEKULARNOG PROFILIRANJA TUMORA	- 4 -
2.2.1	SEKVENCIJANJE NOVE GENERACIJE (NGS)	- 4 -
2.2.2	POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA (PCR)	- 6 -
2.2.3	KROMOSOMSKI MIKROČIP (CMA)	- 8 -
2.2.4	IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE (IHS)	- 9 -
2.2.5	FLUORESCENCIJSKA HIBRIDIZACIJA <i>IN-SITU</i> (FISH)	- 9 -
2.3	BIOMARKERI	- 10 -
2.3.1	DIJAGNOSTIČKI BIOMARKERI	- 11 -
2.3.2	BIOMARKERI PROCJENE RIZIKA	- 12 -
2.3.3	BIOMARKERI PROGNOZIRANJA	- 12 -
2.3.4	BIOMARKERI ODGOVORA (FARMAKODINAMIČKI)	- 12 -
2.3.5	PREDIKTIVNI BIOMARKERI	- 13 -
2.4	KULTURA STANICA <i>IN VITRO</i>	- 13 -
2.4.1	MATIČNE STANICE	- 14 -
2.4.2	INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE (iPSC)	- 14 -
2.4.3	UVJETOVANO REPROGRAMIRANE STANICE	- 15 -
2.5	KSENOGRAFTI	- 16 -
2.6	ORGANOIDI	- 19 -
2.7	ADOPTIVNA STANIČNA TERAPIJA	- 22 -
2.8	CJEPIVO PROTIV RAKA	- 23 -
3	PERSONALIZIRANI TRETMANI TUMORA U KLINIČKOJ PRIMJENI	- 25 -
3.1	RAK DOJKE	- 25 -
3.2	MELANOM	- 26 -
3.3	RAK PLUĆA	- 26 -
3.4	RAK DEBELOG CRIJEVA	- 27 -
3.5	RAK PROSTATE	- 27 -
4	LIMITI PERSONALIZIRANE MEDICINE	- 28 -
5	LITERATURA	- 31 -
6	ŽIVOTOPIS	- 37 -

POPIS KRATICA

KRATICA	ZNAČENJE	PUNO IME NA ENGLISKOM JEZIKU
3D	Trodimenzionalno	<i>Three-dimensional</i>
CAR	Kimerni antigenski receptor	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CMA	Kromosomski mikročip	<i>Chromosomal microarray</i>
CRC	Uvjetovano reprogramirane stanice	<i>Conditional reprogrammed cells</i>
CRISPR/Cas9 sustav	Sustav za uređivanje genoma dobiven iz bakterija	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/crispr associated protein 9</i>
CT	Računalna tomografija	<i>Computed tomography</i>
CTC	Cirkulirajuće tumorske stanice	<i>Circulating tumor cells</i>
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove	<i>. U.S. Food And Drug Administration</i>
FISH	Fluorescencijska hibridizacija <i>in-situ</i>	<i>Fluorescence in-situ hybridization</i>
GENIE	Javno dostupan internacionalni registar tumora	<i>Genomics evidence neoplasia information exchange</i>
HeLa stanice	Stanice karcinoma Henriette Lacks	<i>Henrietta Lacks' cells</i>
HPV	Humani papilomavirus	<i>Human papillomavirus</i>
IHS	Imunohistokemijsko bojanje	<i>Immunohistochemical studies</i>
iPSC	Inducirane pluripotentne matične stanice	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
MAPK signalni put	Niz proteina u stanici koji informaciju od signalnog receptora prenose do DNA u jezgri stanice.	<i>The MAPK/ERK pathway</i>
MRI	Magnetska rezonancija	<i>Magnetic resonance imaging</i>
NGS	Sekvenciranje nove generacije	<i>Next-generation sequencing</i>
PCR	Polimerazna lančana reakcija	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDX	Ksenografti stvoreni iz tumora pacijenta	<i>Patient-derived xenograft</i>
PSA test	Krvni test za detektiranje tumora prostate	<i>Prostate-specific antigen test</i>
RNA	Ribonukleinska kiselina	<i>Ribonucleic acid</i>
SCID miševi	Miševi s teškom kombiniranom imunodeficijencijom	<i>Severe combined immunodeficient mice</i>

TCR	T-stanični receptor	<i>T cell receptor</i>
TIL	Tumor infiltrirajuće T-stanice	<i>Tumor-infiltrating T cells</i>
TK gen	Gen za timidin kinazu	<i>Thymidine kinase gen</i>
WES	Sekvenciranje svih eksona	<i>Whole exome sequencing</i>

1 UVOD

Tumori su abnormalno tkivo koje se formira prekomjernim rastom i diobom stanica. Mogu biti benigni (dobročudni) ili maligni (zloćudni). Samo maligni tumori se šire u okolna tkiva ili druge dijelove tijela (National Cancer Institute, 2021). Tumori nastaju transformacijom normalnih stanica u tumorske procesom neoplastične preobrazbe. Nekim tumorima je uzrok poznat (nasljedne promjene gena, virusi, kancerogene tvari) dok za druge znamo samo čimbenike rizika (spol, okoliš, infekcije, lijekovi, zračenje). Benigni tumori ne zahtijevaju liječenje, ali se mogu ukloniti operacijom. Ako se ne uklone, neki benigni tumori mogu postati maligni (Leksikografski zavod Miroslav Krleža 2021). Hanahan i Weinberg (2000) su inicijalno kategorizirali biološke mehanizme za razvoj tumora u 6 procesa: proliferacijska signalizacija, izbjegavanje supresora rasta, imortalizacija, uspostavljanje vlastitog krvotoka te aktivacija invazije i metastaziranja. Danas postoje dodatni dokazi da pokretači razvoja tumora mogu biti i epigenetičke promjene kao što su modifikacije histona i promjene metilacije DNA koje pak uzrokuju promjene u kondenziranosti kromatina (Baylin i Ohm 2006). U konvencionalnom pristupu terapije tumora, svi pacijenti s određenom vrstom tumora primaju jednak ili vrlo sličan tretman lijekovima (Aboulkheyr i sur. 2018). Klasični antitumorski tretmani su kemoterapija, radijacijska terapija te operacija (Esmaeilzadeh i Khosh 2021). Konvencionalni tretmani tumora su učinkoviti, ali kao i svaki antitumorski tretman nose neke nuspojave i posljedice. Za primjer možemo uzeti kemoterapiju. Ona djeluje na stanice koje se brzo dijele. To je osobina tumorskih stanica, ali i pojedinih normalnih stanica. Kemoterapijom se najčešće oštećuju normalne stanice koštane srži, probavnog sustava te folikuli kose. Te promjene će biti privremene jer će se normalne stanice kasnije regenerirati. Međutim, pacijenti koji su primali kemoterapiju mogu imati ozbiljne posljedice te povećan rizik od drugih malignih bolesti. Naravno, kemoterapija ne djeluje kod svakog pacijenta, a brojni pacijenti nakon tretmana dožive regresiju bolesti. Problem konvencionalnih tretmana je nespecifičnost i nedostatak prilagodbe za potrebe individualnog pacijenta. To je osobito problematično jer tumori pokazuju veliku heterogenost između pacijenata s istim tipom tumora te između metastaza pojedinog pacijenta. Unatoč tome, konvencionalni tretmani se i dalje koriste, osobito kod tumora za koji nemamo efikasnu terapiju. Također, koriste se i kao dio personaliziranog tretmana tumora, najčešće uz neki lijek koji ima ciljano djelovanje.

Konvencionalne terapije tumora danas više nisu zadovoljavajuće jer puno bolje razumijemo biokemijske procese nastanka i rasta tumora.

Klasična klasifikacija tumora se temelji na staničnom podrijetlu te tumorskoj histologiji, no to ne može objasniti heterogene karakteristike tumora (Cho i sur. 2016). Svaki tumor je okružen heterogenim mikrookolišom koji značajno može utjecati na odgovor na terapiju i klinički ishod (Aboulkheyr i sur. 2018). Heterogenost je uzrok zašto pojedini pacijenti različito reagiraju na terapiju iako imaju isti tip

tumora. Odvajanje pacijenata u subpopulacije na temelju genetičkog profiliranja omogućuje razvoj terapija dizajniranih da specifično ciljaju jedinstvena obilježja tumora te subgrupe pacijenata (Cho i sur. 2016).

Bitan proboj se dogodio u kliničkom ispitivanju trastuzumaba kada su u kliničko ispitivanje uključili samo pacijente s HER-2 pozitivnim rakom dojke. Ta odluka je omogućila dokaz o povoljnom učinku tog lijeka. Naime, on djeluje najbolje na upravo taj podtip raka dojke. U kliničkom ispitivanju neselektiranih sudionika s rakom dojke, prosječni odgovor na tretman ne bi bio dovoljan da dođe do komercijalizacije lijeka (Syn i sur. 2016).

Takav moderan pristup liječenja bolesti je dio personalizirane medicine. Cilj personalizirane medicine u cjelini je prevencija, dijagnostika i tretman bolesti, u ovom slučaju, tumora (Kalia 2015).

Cilj ovog rada je prikazati ključne metode u znanstvenom istraživanju i personaliziranom liječenju tumora.

2 METODE ISTRAŽIVANJA I LIJEČENJA RAKA U PERSONALIZIRANOJ MEDICINI

Metode koje se koriste tijekom proučavanja tumora, otkrivanja i ispitivanja lijekova te tretmana pacijenata se trude osigurati što vjerniji model tumora *ex vivo*.

Da bi se to postiglo, nužne su i neke osnovne metode koje se koriste u klasičnoj medicini. Pojedine, poput sekvenciranja nove generacije, su napredovale razvojem tehnologije te omogućile ubrzani razvoj personalizirane medicine.

Svaka opisana metoda ima svoje prednosti i nedostatke. Najtočniji i najprecizniji rezultati se postižu kombiniranim korištenjem metoda.

Prije korištenja bilo koje metode personalizirane medicine moramo dobiti uzorak samog tumora. Uzorkovanje tumora se naziva biopsijom.

2.1 BIOPSIJA TUMORA

Postoji više vrsta biopsija tumora ovisno o lokaciji, odnosno dostupnosti tumora.

Najčešće biopsije su:

- a) Endoskopska biopsija – biopsija pomoću tanke, fleksibilne cijevi sa svjetlom na kraju za vizualizaciju struktura u tijelu
- b) Biopsija iglom – često za tumore koji se mogu osjetiti kroz kožu, može se koristiti uz pomoć MRI, CT ili drugih metoda vizualizacije
- c) Biopsija kože
- d) Biopsija operacijom – uklanja se dio ili cijeli tumor

(Mayo clinic 2020).

Osim navedenih, postoji još i tekuća biopsija. Koristi se za analiziranje tumorskih stanica koje cirkuliraju u krvi (National Cancer Institute 2021).

Cirkulirajuće stanice raka (CTC, *Circulating tumor cells*) su vrlo rijetke stanice raka koje su otpuštene u krvni sustav pacijenta iz primarnog tumora ili iz formiranih metastaza. Takve stanice se šire tijelom i formiraju (nove) metastaze (Plaks i sur. 2013).

Takve stanice su iznimno korisne u istraživanju s obzirom na dugi vremenski period liječenja raka. Primarni tumor je vrlo često davno uklonjen iz tijela pacijenta te molekularne informacije više nisu relevantne s obzirom na napredak tumora (Polzer i sur. 2014).

Cirkulirajuće tumorske stanice omogućuju predviđanje učinkovite terapije za pacijenta samo jednostavnim vađenjem krvi umjesto invazivne biopsije. Iz njih se mogu formirati organoidi, ksenografti te drugi modeli tumora, a koriste se i za molekularno profiliranje.

Međutim, dijametar takvih stanica je uglavnom veći od kapilara te one često ostaju zarobljene u njima. Iz tog razloga, samo male ili izrazito plastične tumorske stanice mogu nastaviti cirkulirati u tijelu i takve stanice su dostupne (ali rijetke) (Plaks i sur. 2013).

Nakon biopsije tumora, tumor možemo molekularno profilirati. Dobivene informacije nas mogu uputiti na neki postojeći tretman, na testiranje tumora, stvaranje modela ili se tumor može determinirati kao benignan te (trenutno) bezopasan za pacijenta.

U nastavku su opisane neke od metoda molekularnog profiliranja koje su omogućile početak personalizirane medicine u tretmanu tumora te imaju veliki potencijal pridonijeti budućim istraživanjima.

2.2 METODE MOLEKULARNOG PROFILIRANJA TUMORA

Molekularno profiliranje tumora je neizbježno u primjeni svih metoda personalizirane medicine. Ono čini osnovu razumijevanja o promjenama između tumorskih i normalnih stanica na molekularnoj razini. Molekularna dijagnostika, profiliranje i sekvenciranje genoma se sve više koristi u kliničkim studijama za ciljane terapije.

Molekularno profiliranje pacijenata u svrhu identifikacije potencijalne mete lijekova dovodi do duljeg vremenskog perioda bez regresije tumora kod 27% pacijenata u usporedbi s terapijom bez profiliranja (Syn i sur. 2016).

Najkorištenije metode molekularnog profiliranja su:

- a) Sekvenciranje nove generacije (NGS)
- b) Polimerazna lančana reakcija (PCR)
- c) Kromosomski mikročip (CMA)
- d) Imunohistokemijska ispitivanja (IHS)
- e) Fluorescencijska hibridizacija *in-situ* (FISH)

(Erlanger Health System 2021).

U nastavku je ukratko objašnjena važnost te nedostaci svake metode u dijagnozi i tretmanu raka. Metode molekularnog profiliranja su osnova personaliziranog tretmana raka.

2.2.1 SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE (NGS)

Starije metode sekvenciranja su podrazumijevale sekvenciranje ciljanih skupina gena unutar tumora. Naravno, takvo sekvenciranje ne detektira neke mutacije koje bi se potencijalno mogle iskoristiti u

planiranju strategije tretmana. Iz tog razloga se sve više koriste sekvenciranja cijelog genoma sekvenciranjem nove generacije. Dostupnost takvog sekvenciranja postaje sve veća za znanstvenu i medicinsku zajednicu zbog postepenog snižavanja cijene tih metoda što se one više koriste (BC Cancer Research Institute 2020).

Nekoliko studija je pokazalo korist sekvenciranja nove generacije u identifikaciji mutacija tumora na koje se može djelovati (eng. *actionable mutations*). Prema GENIE konzorciju, oko 30% sekvenciranih tumora je imalo mutaciju na koju se moglo djelovati već postojećom ciljanom terapijom (Morash i sur. 2018).

Tsimberidou i suradnici (2012) su proveli kliničku studiju u kojoj su pacijentima u naprednom stadiju raka dali terapiju određenu prema njihovim tumorskim mutacijama. Takvi pacijenti su pokazali bolji odgovor od pacijenata koji nisu primili terapiju određenu sekvenciranjem.

Usporedba je pokazala da su pacijenti s ciljanom terapijom imali općenito bolji odgovor na terapiju (27% u odnosu na 5%), više vremena je proteklo prije prestanka djelovanja terapije (medijan 5.2 u odnosu na 2.2 mjeseca) te dulje preživljavanje (medijan od 13.4 u odnosu na 9 mjeseci).

To je samo jedna od više provedenih studija koje pokazuju takvo poboljšanje.

Problem sekvenciranja cijelog genoma je otkrivanje iznimne genetske heterogenosti tumora istog tipa ili između metastaza tumora istog pacijenta. Uobičajeno, sekvenciranje tumora pokazuje 30-65 somatskih varijanata. Većina takvih varijanata je fenotipski neutralna i to su samo usputne (eng. *passenger mutations*) mutacije i njih ne ciljamo tretmanom. Dakle, podatke sekvenciranja moraju interpretirati interdisciplinarni timovi da bi se točno odredilo koje mutacije su pokretačke (eng. *driver mutations*) (Khotskaya i sur. 2017). Taj postupak je vrlo zahtjevan te je potrebno mnogo istraživanja u budućnosti da bi se stvorila baza informacija potrebna za identifikaciju takvih mutacija samo pomoću podataka sekvenciranja.

Problem vezan uz inkorporaciju sekvenciranja nove generacije u tretman raka je nemogućnost postojanja randomiziranih kliničkih studija. Naime, sekvenciranje može identificirati mnogo dijagnostičkih subkategorija raka, međutim iznimno je teško pronaći dovoljno pacijenata za randomiziranu studiju svakog identificiranog podtipa. Iz tog razloga je FDA odobrila prvu terapiju precizne medicine, pembrolizumab, bez dokaza randomiziranog kliničkog ispitivanja (Morash i sur. 2018).

Morash i suradnici (2018) su napomenuli da jedina takva randomizirana studija koja se provela nije pokazala nikakvo kliničko poboljšanje pacijenata korištenjem sekvenciranja nove generacije bez obzira na tip raka. U studiju je bilo uključeno 195 pacijenata s naprednom fazom raka te nije bilo razlike između pacijenata koji su se liječili tretmanom koji je odredio njihov osobni liječnik i testne grupe koja je dobila tretman na temelju molekularnog profiliranja.

Međutim, ranije spomenuti pembrolizumab je danas odobren za rak jednjaka, rak želuca, metastazirani rak pluća i druge. Zadnje je odobren 2021. godine za trostruko negativni rak dojke. U tom slučaju je

bilo provedeno randomizirano, dvostruko-slijepo, placebo-kontrolirano ispitivanje sa 1174 pacijenata. Placebo takvog ispitivanja je kemoterapija, a testirana terapija je pembrolizumab uz kemoterapiju (U.S. Food and Drug Administration 2021).

Bitno je napomenuti i probleme interpretacije sekvenciranih rezultata. U neformalnom istraživanju u kojem je sudjelovalo 46 onkoloških stručnjaka, 52% ih se osjećalo u neku mjeru neugodno prilikom interpretacije genomskog testa. Uz to 2/3 ih često nije znalo što da rade s genomskim rezultatima i pri tome ih se većina obraćala kolegama (78%) ili su tražili informacije u literaturi (50%) (Bryce i sur. 2017).

Općenito u personaliziranoj medicini, kao moguća rješenja predlažu se dodatne edukacije zdravstvenih djelatnika ili uvođenje novih zdravstvenih radnika, odnosno genetičkih stručnjaka koji bi radili na interpretaciji rezultata u zdravstvene svrhe.

Bryce i suradnici (2017) su istaknuli vremenski problem sekvenciranja koji se događa u kliničkom ispitivanju, a relevantan je i kasnije u tretmanima tumora. Naime, 65% pacijenata (22 od 34) je umrlo ili su odabrali prekid liječenja te palijativnu skrb prije nego su rezultati sekvenciranja tumora bili dostupni. Moguća rješenja su ranija implementacija sekvenciranja ili preventivno sekvenciranje.

Također, s obzirom na visoku cijenu te činjenicu da zdravstvena osiguranja uglavnom ne pokrivaju cijenu sekvenciranja, tretmani određeni sekvenciranjem mnogima trenutno nisu opcija van kliničkog ispitivanja.

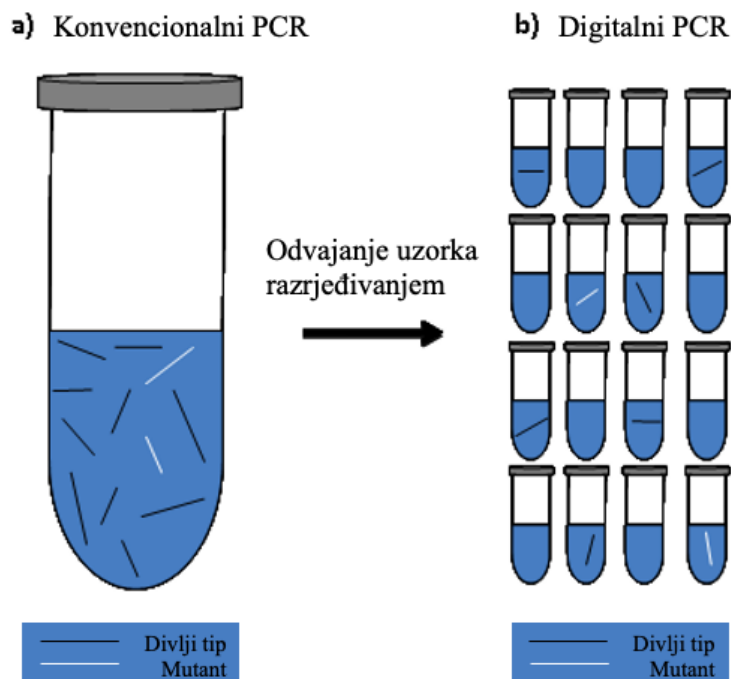
2.2.2 POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA (PCR)

Polimerazna lančana reakcija je laboratorijska metoda koja se koristi za stvaranje brojnih kopija specifičnog dijela DNA iz ishodnog uzorka tumora. PCR omogućuje umnažanje i time detekciju molekula DNA što je vrlo važno jer je biopsijom tumora ponekad teško dobiti veću količinu uzorka. Dobivene umnožene molekule se mogu koristiti za dijagnostiku ili praćenje progresije tumora (National Cancer Institute 2021).

Danas postoji iznimno mnogo različitih vrsta polimerazne lančane reakcije. U nastavku navodim samo jedan primjer korištenja PCR-a u personaliziranom tretmanu tumora.

Wood-Bouwens i suradnici (2019) su longitudinalno pratili pacijente s metastaziranim tumorom pomoću jednobojnog digitalnog PCR-a (eng. *single-color digital PCR*).

Razlika u manipuliranju uzoraka korištenih u konvencionalnom i digitalnom PCR-u je naznačena na slici 1.



Slika 1: Usporedba uzorka korištenih u konvencionalnom i digitalnom PCR-u

- Uzorak za konvencionalni PCR sadržava heterogenu smjesu DNA molekula gdje su željene, mutirane DNA molekule, sadržane u vrlo malim količinama u odnosu na divlji tip DNA molekula.
- Kod digitalnog PCR-a uzorak je razrjeđenjem razdvojen u mnogo manjih frakcija. Razrjeđenje je takvo da se u jednoj frakciji nalazi samo jedna ili nijedna kopija DNA molekule. Nakon provedene PCR reakcije, mutirane DNA molekule su obogaćene u individualnim frakcijama.

Prilagođeno prema Gene Quantification 2021.

Digitalni PCR (dPCR) je visoko osjetljiv za detekciju mutiranih alela. Može detektirati tri mutirane sekvence DNA između 3000 genomskih ekvivalenata.

Wood-Bouwens i suradnici (2019) su pratili cirkulirajuću tumorsku DNA (ctDNA) koju u krvotok otpuštaju tumorske stanice u stanju apoptoze ili nekroze. Poznato je da pacijenti s metastatskim tumorom imaju povećanu količinu ctDNA u krvotoku. Razlikovanje ctDNA od normalne DNA u krvi je posebno problematično.

Korištenjem dPCR-a na ctDNA uzorcima se mogu odabrati mutacije specifične za primarni tumor pacijenta te se mogu pratiti promjene u količini tijekom dužeg vremenskog perioda. Detekcija takvih molekula daje vrlo korisnu, personaliziranu i specifičnu kliničku informaciju.

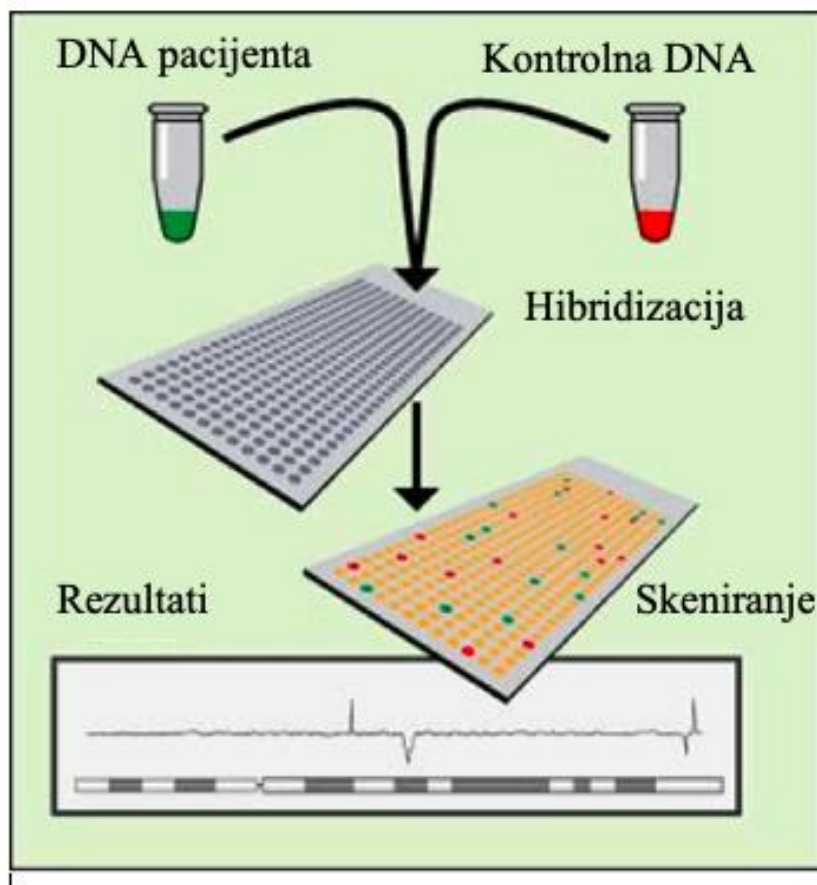
dPCR se može koristiti za genotipizaciju samo malog broja mutacija. Međutim, on je jeftin, daje veliki broj rezultata u samo par sati i visoko je osjetljiv na mutacije. To je idealna metoda za rutinsko kliničko praćenje progresije raka, odgovora na tretman ili evaluacije rezidualnog raka nakon tretmana.

Neki od problema kojima se istraživanja trebaju baviti u budućnosti su povećanje brzine i količine testiranih uzoraka te razvoj novih, uspješnijih procesa stvaranja početnica specifičnih za mutacije.

2.2.3 KROMOSOMSKI MIKROČIP (CMA)

Kromosomski mikročip (CMA, *chromosomal microarray*) je dijagnostička metoda identifikacije genetičkih uzroka nastanka ili održavanja tumora. Koristi se za simultano mjerenje ekspresije mnogo gena. CMA može identificirati varijante broja kopija u DNA. Varijante broja kopija (eng. *copy number variants*) mogu biti normalne varijante ili mogu biti povezane s nastankom tumora (ili neke druge bolesti). U takve varijacije se ubrajaju mikrodelecije ili mikroduplikacije kromosomskih segmenata, abnormalni broj kromosoma ili rearanžmani kromosomske strukture (The Jackson Laboratory 2021). CMA služi za identifikaciju biomarkera raka, gena povezanih uz kemorezistenciju te otkriće novih lijekova (Kaliyappan i sur. 2012).

Na slici 2 je prikazan način na koji se dobivaju genetičke informacije korištenjem kromosomskog mikročipa.



Slika 2: Prikaz mehanizma funkcioniranja kromosomskog mikročipa. Genomska DNA pacijenta se fluorescentno označava. Hibridizacijom s kontrolnom DNA se determinira postoji li eventualni gubitak ili amplifikacija nekog gena. Skeniranjem uzoraka na mikročipu dobivamo rezultate u obliku signala koji se zatim interpretiraju.

Prilagođeno prema The Jackson Laboratory 2021, Kaliyappan i suradnici 2012.

CMA se koristi umjesto tradicionalne kariotipizacije jer može detektirati puno manje varijacije te osigurava puno veću količinu dijagnostičkih podataka (The Royal Australian College of General Practitioners 2021).

Jedna od primjena kromosomskog mikročipa je praćenje transformacije benignog tumora u maligni. Također, može se koristiti za identifikaciju genskih obitelji i bitnih molekularnih i staničnih događaja koji mogu biti bitni u procesu metastaziranja (Kaliyappan i sur. 2012).

2.2.4 IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE (IHS)

Imunohistokemijsko bojanje (IHS, *immunohistochemical studies*) je metoda vezanja laboratorijski stvorenih antitijela za antigene tumora i tumorskog mikrookoliša. Vezanje antigen-antitijelo može biti specifično za tumor ili specifično za više od jednog tumora. Da bismo otkrili je li došlo do vezanja antitijela i antigena, uzorak kemijski bojimo. Uzorak će se obojiti samo ako je određeno antitijelo (a time i antigen) prisutno u uzorku.

Imunohistokemijsko bojanje služi za vizualizaciju tumorskog tkiva, dijagnozu tumora te određivanje odgovarajuće terapije.

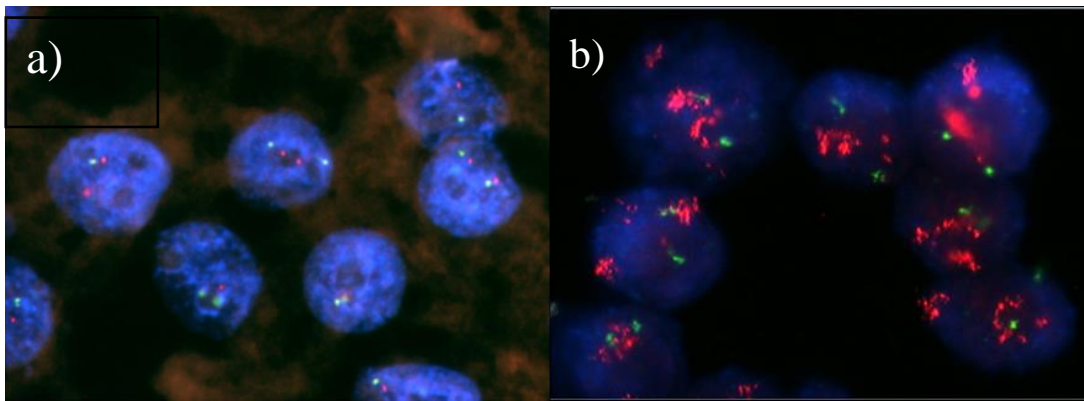
Primjer dijagnoze tumora je rutinsko korištenje IHS-a u biopsiji limfnog čvora. Limfni čvor u tom slučaju ima tkivo tumorskog izgleda, ali patolog bez imunohistokemijskog bojanja ne može utvrditi je li rak počeo u limfnom čvoru ili je tu metastazirao.

To je vrlo bitno za utvrditi jer će se tretman tumora razlikovati ovisno o njegovom podrijetlu/vrsti.

Također, IHS se može koristiti za razlikovanje benignog i malignog tumorskog tkiva (American Cancer Society 2015).

2.2.5 FLUORESCENCIJSKA HIBRIDIZACIJA *IN-SITU* (FISH)

Fluorescencijska hibridizacija *in-situ* (FISH) je metoda koja može detektirati većinu kromosomskih promjena. Od velike je važnosti da može detektirati i promjene koje su premale da bi bile vidljive ispod mikroskopa u uobičajenom citogenetičkom testiranju. FISH koristi posebne fluorescentne boje vezane za dijelove DNA koji se mogu vezati samo za specifične dijelove kromosoma. Primjer rutinskog korištenja je detekcija translokacije između kromosoma 9 i 22 što se zbiva kod jednog tipa leukemije. Još jedan primjer je detekcija prekomjerne ekspresije proteina HER2. Najčešće se koristi prilikom dijagnosticiranja podtipa raka dojke, a na slici 3 je prikazana prekomjerna ekspresija proteina HER2 u metastazama limfnih čvorova.



Slika 3: Analiza fluorescencijske hibridizacije metastaza limfnih čvorova *in-situ*.

Zelenom bojom je označena proba za centromeru kromosoma (*CEP17*), a crvenom bojom je označena proba za gen *HER2*. Oba gena se nalaze na kromosomu 17. Kod dijagnoze je bitan omjer signala *HER2/CEP17*.

- a) Slika prikazuje izostanak amplifikacije gena *HER2*. Omjer signala je 1.1.
- b) Slika prikazuje jaku amplifikaciju gena *HER2*. Omjer signala je 5.6.

Prilagođeno prema Shigematsu 2011.

2.3 BIOMARKERI

Korištenje biomarkera je od iznimne važnosti i u klasičnoj i u personaliziranoj medicini. Najjednostavniji primjeri su opće poznati i pacijenti ih svakodnevno koriste kada prate vlastito zdravstveno stanje. To su biomarkeri povišene temperature pri bakterijskoj infekciji te povišeni krvni tlak kod srčanih problema.

Biomarkeri su zapravo fenotipske promjene i/ili biomolekule koje možemo detektirati. Takve biomolekule stvaraju ili same tumorske stanice ili druge stanice tijela kao odgovor na tumor. Svaki tip stanice ima jedinstvene molekularne karakteristike kao što je aktivnost određenih gena, proteina ili drugih molekularnih svojstava.

Različiti biomarkeri se mogu koristiti u svim stadijima personaliziranog tretmana – od dijagnostike preko pribora pacijenata te kontrole sigurnosti tretmana za određenog pacijenta (Kamel i Al-Amodi 2016).

Savršeni biomarker je lako mjerljiv sa jednostavnim, jeftinim i minimalno invazivnim testom (National Center for Biotechnology Information 2021).

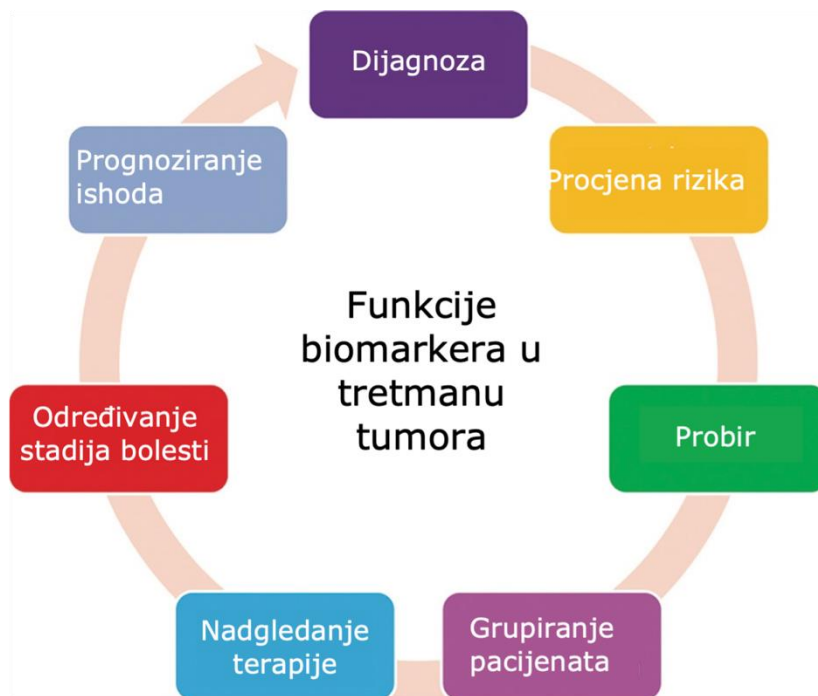
Zanimljivo je da unatoč trenutnoj atraktivnosti u znanosti, biomarkeri nisu moderno otkriće. Prije dvije tisuće godina Egipćani su bili prvi koji su pokušavali odrediti markere za malignost – da bi razlikovali rak dojke od mastitisa.

Prvi tumorski biomarker otkriven 1847. godine je Bence-Jones protein. To je antitijelo imunoglobulina G građeno od „lakih lanaca“, a stvara ga tumor kod pacijenata s multiplom mijelomom (rak plazma stanica). Antitijelo se izlučuje urinom u suvišku te se moglo identificirati toplinskom denaturacijom.

Od tada do danas, usprkos ekstenzivnom proučavanju, vrlo malo tumorskih biomarkera je odobreno kao dijagnostička ili prognostička metoda (Kamel i Al-Amodi 2016).

Prema metodi detekcije možemo definirati dvije grupe biomarkera: one dobivene vizualizacijom (rengen, MRI, CT) te molekularni biomarkeri (proteini, drugi metaboliti ili genetičke varijante i mutacije) (National Center for Biotechnology Information 2021).

Na slici 4 su nabrojene funkcije koje biomarkeri mogu služiti u raznim fazama tretmana tumora. Pomoću biomarkera se mogu izdvojiti osobe koje su pod povećanim rizikom od određenih tumora te se tumor može dijagnosticirati u ranijoj fazi. Oni također mogu pomoći pri određivanju tretmana te praćenju uspjeha liječenja odnosno moguće regresije bolesti.



Slika 4: Klinička koristi te funkcije biomarkera u tretmanu tumora. Prilagođeno prema Kamel i Al-Amodi 2016.

Molekularni biomarkeri pokazuju veliki potencijal.

Bitnu ulogu u razvoju i primjeni molekularnih biomarkera ima sekvenciranje nove generacije i tehnologija koja omogućava detektiranje tumorskih molekularnih alteracija u velikom broju gena koristeći jednostavne testove (Schmidt i sur. 2016).

U nastavku su detaljnije opisani načini na koje se biomarkeri koriste u personaliziranom tretmanu raka. Bitno je napomenuti da se pojedini biomarkeri mogu koristiti za više funkcija (npr. isti biomarker može služiti kao dijagnostički biomarker i istovremeno nam dati informaciju o vjerojatnom kliničkom ishodu).

2.3.1 DIJAGNOSTIČKI BIOMARKERI

Dijagnostički biomarkeri se koriste za detekciju ili potvrdu postojanja određenog tumora kod pacijenta ili određivanja podvrste nekog tumora.

Primjer dijagnostičkog biomarkera je segregacija pacijenata s difuznim limfomom B-stanica u podgrupe bazirane na temelju različitog staničnog podrijetla tumora. Segregacija se temelji na profiliranju genske ekspresije pojedinih stanica (National Center for Biotechnology Information 2021).

2.3.2 BIOMARKERI PROCJENE RIZIKA

Biomarkeri procjene rizika ukazuju ukoliko pacijent ima predispoziciju za razvoj nekog tumora iako pacijent trenutno ne pokazuje nikakve znakove bolesti (National Center for Biotechnology Information 2021).

Primjer biomarkera procjene rizika je detekcija određenih subtipova HPV-a koji uzrokuju različite vrste raka, najčešće raka grlića maternice i raka usne šupljine. Detekcija tih subtipova HPV-a indicira da pacijent ima veću predispoziciju obolijevanja od raka (Crews i sur. 2021). Takvi pacijenti trebaju češće preventivne kontrole da bi se eventualni tumor počeo tretirati u što ranijem stadiju.

2.3.3 BIOMARKERI PROGNOZIRANJA

Biomarkeri prognoziranja se koriste za određivanje vjerojatnosti regresije tumora, progresije bolesti ili drugog kliničkog događanja (National Center for Biotechnology Information 2021). Oni uključuju genetičke polimorfizme, mutacije i alteracije u ekspresiji proteina (Maruvada i sur. 2005).

Primjer biomarkera prognoziranja je pojava *BRCA1* ili *BRCA2* mutacije kod pacijenata s rakom dojke. Mutacije se utvrđuju sekvenciranjem DNA, a ispoljavaju se i različitim fenotipom. *BRCA1* mutacije su karakterizirane slabom diferencijacijom, visokim indeksom proliferacije, čestim aneuploidijama i negativnim estrogenskim receptorima dok su tumori s *BRCA2* mutacijama sličniji sporadičnim tumorima dojke (tumori koji nisu vezani za genetsku predispoziciju).

Što je najbitnije, pacijenti koji imaju *BRCA1* mutacije imaju dobru kliničku prognozu za razliku od *BRCA2* nosioca (Maruvada i sur. 2005).

2.3.4 BIOMARKERI ODGOVORA (FARMAKODINAMIČKI)

Biomarkeri koji se koriste u svrhu dokazivanja da je u pacijentu došlo do biološkog odgovora na tretman tumora (National Center for Biotechnology Information 2021).

Primjer biomarkera odgovora je difuzijski ponderirana magnetska rezonancija koja se može koristiti kao biomarker odgovora u onkologiji. Naime, nove molekularne terapije mogu biti učinkovite bez da značajno mijenjaju dimenzije tumora. Iz tog razloga klasično korištenje radiografskih metoda nije uvijek dostatno. Difuzijski ponderirana magnetska rezonancija mjeri (indirektno) mobilnost vode unutar tkiva uz tumorsku veličinu i oblik. Iz mobilnosti tekućine se može odrediti nalazi li se ona unutar ili izvan stanica. To je vrlo bitno pri određivanju veličine i broja stanica da bi se odredila njihova eventualna nekroza ili apoptoza (Hamstra i sur. 2007).

2.3.5 PREDIKTIVNI BIOMARKERI

Biomarker koji se koristi za identifikaciju pacijenata kod kojih su povećane šanse za povoljnim ili nepovoljnim kliničkim ishodom neke tumorske terapije (National Center for Biotechnology Information 2021).

Primjer prediktivnog biomarkera je skvamozna diferencijacija u karcinomu ne-malih stanica pluća. Takva diferencijacija se može koristiti kao prediktivni biomarker da se identificiraju pacijenti koji imaju veću šansu za regresiju bolesti ili slabiji postotak preživljavanja pri tretmanu premetreksedom. Takve pacijente se tretira standardnim kemoterapijama. Odnosno, za pacijente koji imaju ne-skvamoznu histologiju, tretman premetreksedom je poželjan (Scagliotti i sur. 2009).

Osim navedenih biomarkera, neki autori definiraju još vrsta na temelju specifičnih funkcija. Bitno je napomenuti da se na temelju jednog biomarkera gotovo nikad ne može precizno odrediti prognoza bolesti, rizik od obolijevanja niti bilo koja druga specifična funkcija biomarkera.

Postoje određeni pacijenti kojima će razina nekog biomarkera biti visoka u normalnim uvjetima. To se često događa kod PSA proteina za dijagnozu raka prostate. Znanstvenici i liječnici moraju vrlo pažljivo i kritički razmotriti analitičke podatke prilikom korištenja biomarkera da ne bi pacijentu nanijeli zdravstvenu štetu. Za najoptimalniji personalizirani tretman tumora istovremeno treba koristiti biomarkere, imuno-genetičke podatke pacijenta te farmakogenetičke analize (Esmailzadeh i Khosh 2021).

2.4 KULTURA STANICA *IN VITRO*

HeLa stanice su prve humane stanične linije koje su uspostavljene u kulturi. HeLa stanice su tumorske stanice raka grlića maternice. One su najčešće korištene humane stanične linije u biološkim istraživanjima i bile su ključne za mnoge biomedicinska otkrića (British Society for Immunology 2021). Sve od uspješnog kultiviranja HeLa stanica – tumorske stanične linije su bile neprocjenjivo važne za proučavanje mehanizma tumorigeneze, kao i identifikaciji markera terapijskog odgovora. Prednosti korištenja tumorskih staničnih linija su beskonačan rast, jednostavno održavanje kulture te probir velikog repertoara staničnih linija.

Međutim, postoje i određeni limiti kulture stanica *in vitro*. Kao prvo, većina vrsta tumora generira stanične linije s jako niskom učinkovitošću rasta. Također, stanične linije *in vitro* nisu reprezentativne raznolikosti ljudskih tumora. Te linije su zapravo selekcija izdvojenih subsetova tumora koji mogu rasti *in vitro*. Dakle, prilikom adaptacije na uvjete *in vitro* se gubi heterogenost ishodne kulture tumora (Gao i Chen 2015).

Iz tog razloga kultura tkiva *in vitro* nije povoljna za učinkovito testiranje odgovora na lijek niti ne služi izravno u testiranju u personaliziranoj medicini. Međutim, koristi se prije uspostave nekog drugog modela tumora ili uspostavljanjem nekih specifičnih kultura stanica i tkiva koje su navedene u nastavku.

2.4.1 MATIČNE STANICE

Matične stanice su nediferencirane ili djelomično diferencirane stanice koje se mogu diferencirati u različite vrste stanica i neograničeno se dijeliti da bi stvorile još istih matičnih stanica. Razlikujemo embrionalne i adultne matične stanice. Embrionalne matične stanice su pluripotentne. One se s vremenom diferenciraju u sve stanice ljudskog tijela te jedino pojedine stanice ostaju nediferencirane u obliku multipotentnih matičnih stanica. Multipotentne stanice pronalazimo samo na nekoliko mjesta u tijelu odraslog čovjeka, između ostalog u koštanoj srži te spolnim žlijezdama (Trounson 2013).

U personaliziranoj terapiji obećavajuće djelovanje pokazuju mezenhimske matične stanice. One mogu biti genetički modificirane ili stvorene kao ciljni antitumorski agenti koji mogu inhibirati rast tumora blokiranjem različitih procesa. U istraživanjima se najčešće koriste stanice dobivene iz koštane srži i pupčane vrpce.

Ekperimenti su pokazali da su mezenhimske matične stanice sposobne migrirati u smjeru određenih tkiva- uključujući mjesta ozljeda i tumora. Ta sposobnost ih čini idealnim vektorom za ciljanu tumorsku terapiju. Mezenhimske matične stanice mogu biti genetički modificirane da ekspresiraju suicidalne gene kao što su geni TK. Takve stanice uspješno induciraju staničnu smrt *in vitro* i *in vivo*. Dodatno, stanice mogu biti inducirane da ekspresiraju i antitumorske proteine poput IL-2 ili IFN-B. Takvi proteini mogu aktivirati enzime koji pretvaraju inaktivne molekule u lijek. Alternativno, matične stanice mogu donijeti onkolitičke viruse ili aktivni oblik lijeka do tumora (Lin i sur. 2019).

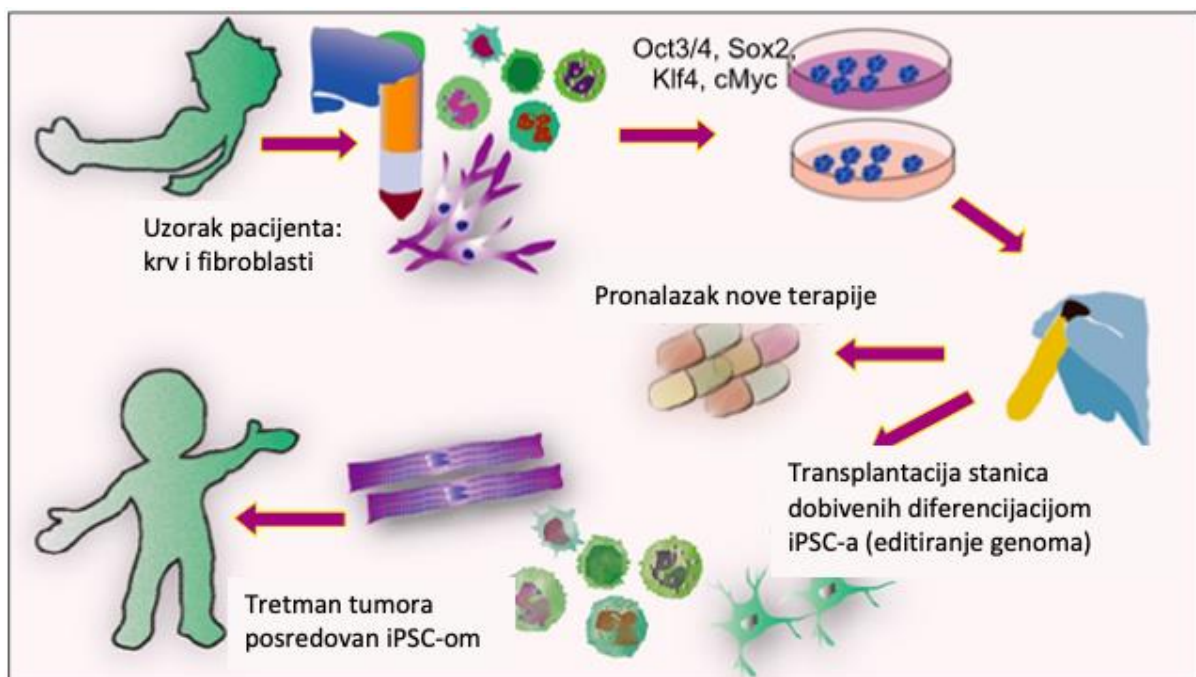
2.4.2 INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE (iPSC)

Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) su morfološki vrlo slične embrionalnim matičnim stanicama te imaju potencijal da stvore gotovo sve stanice ljudskog organizma *in vitro*. iPSC se mogu stvoriti iz gotovo svakog staničnog tipa odrasle osobe ili embrija bez da se embriju nanese šteta. Time su izbjegnuta mnoga etička pitanja koja se javljaju pri korištenju embrionalnih matičnih stanica.

Kao i matične stanice, iPSC imaju veliki potencijal za stanične terapije ili kao model za otkrivanje novih terapija. Također, mogu se sakupiti neinvazivnim metodama te su autologne pacijentu i time se limitira problem imunološkog odbacivanja stanica.

Reprogramiranje diferenciranih stanica u inducirane pluripotentne matične stanice je prikazano na slici 5. Mana reprogramiranja je vrlo slaba efikasnost, često manja od 1%. Također, tijekom reprogramiranja moguće je nastajanje mutacija *de novo* u stanicama.

Jedna od mogućnosti korištenja iPSC-a je generiranje organoida i drugih modela tumora iz takvih stanica. Samostalno iPSC može modelirati tumore koji se pojavljuju kod djece u ranoj dobi ili obiteljski nasljednih karakteristika. To je vrlo obećavajuća mogućnost jer takvi tumori nastupaju vrlo rano, a iPSC u velikoj mjeri modelira diferencijaciju stanica koja se odvija u embrionalnom razvojnom procesu. Problem takvog modeliranja je nedostatak okolišnih utjecaja (virusne infekcije, pušenje) u laboratorijskim uvjetima (Bragança i sur. 2019).



Slika 5: Prikaz tijeka personaliziranog modeliranja tumora pomoću pacijentovih stanica te stvaranje stanično bazirane transplantacijske terapije.

Procedura počinje uzimanjem pacijentovih stanica te generiranje iPSC-a pomoću transkripcijskih faktora, regulatora proliferacije, transkripcije i slično. Iz takvih iPSC stanica se mogu diferencirati željene stanice (stanice mišića, neurona) te se mogu koristiti u terapiji pacijenta. U tom postupku se može koristiti i tehnologija editiranja genoma da bi se popravile genetičke pogreške. Nadalje, iPSC se mogu koristiti da bi se determinirale odgovarajuće doze lijekova ili da bi se testirali novi terapijski agenti. Prilagođeno prema Kim 2014.

2.4.3 UVJETOVANO REPROGRAMIRANE STANICE

Normalne stanice su kultivirane u tradicionalnom mediju koji sadrži serum. Stanice se dijele do limitiranog broja pasaža prije nego dođe do 'starenja'. Taj fenomen nazivamo 'Hayflickov limit' (Hayflick i Moorhead 1961).

Liu i suradnici (2012) su razvili uvjete za rast bez seruma za koje je potrebna kombinacija kinaznog inhibitora Rho (ROCK) te hranidbenog sloja. Demonstrirali su da inhibitor kinaze Rho u kombinaciji s hranidbenim slojem fibroblasta inducira normalne i tumorske epitelne stanice iz raznih tkiva (stanice prostate, dojke, pluća...). Takve stanice *in vitro* mogu neograničeno proliferirati bez stjecanja genetičkih defekata. Do neograničene proliferacije dolazi zbog aktivacije endogene telomeraze. Te stanice posjeduju fenotip poput matičnih stanica *in vitro*, ali zadržavaju sposobnost diferenciranja imitacijom uvjeta *in vivo* te su zato nazvane uvjetovano reprogramirane stanice (CRC, *conditional reprogrammed cells*). CRC imaju mnoge potencijalno važne funkcije. Teoretski, CRC se mogu izolirati iz pacijenta da bi se defektni gen ispravio *in vitro* te bi se takve stanice mogle ponovno uvesti u pacijenta. Danas takve stanice možemo koristiti za uzgoj tkiva te određivanje personalizirane antitumorske terapije. Yuan i suradnici (2012) su iz pacijenta izolirali normalne i tumorske stanice respiratorne papilomatoze te uvjetovano reprogramirali stanice da bi ih koristili za utvrđivanje odgovarajuće terapije. Pacijent je bio proglašen kemorezistentan s obzirom da do tada niti jedan tretman nije usporio rast tumora, a s obzirom na progresiju bolesti do tada je prošao preko 350 operacija. Pomoću uvjetovano reprogramiranih stanica Yuan i suradnici su identificirali da su stanice osjetljive na inhibitor histonske deacetilaze – vorinostat. Nakon tretmana, kod pacijenta je došlo do stabilizacije bolesti u trajanju od 15 mjeseci.

2.5 KSENOGRAFTI

Zbog fenomena intratumorske heterogenosti, reakcija tumora na tretman se ne može potpuno predvidjeti jednostavnim genetičkim testiranjem. Tumori su vrlo genomski nestabilni te zbog toga imaju kompleksan fenotip (Cho i sur. 2016). Jedno od dostupnih rješenja su ksenografti derivirani od pacijenata. Ksenografti su transplantati organa, tkiva ili stanica u individuu druge vrste (National Cancer Institute 2021).

U slučaju tretmana tumora, pacijentov tumor se transplantira u imunodeficijentne miševе koji su dizajnirani u tu svrhu. Ti miševi nude klinički prediktivni model ljudskih tumora (Cho i sur. 2016). Iako postoje opcije stanične kulture *in vitro* i organoidnih kultura, one su pokazale jaku selektivnu proliferaciju, adaptaciju uvjetima kulture i gubitak tumorske heterogenosti.

Bitna prednost ksenograftskih modela je očuvanje ključnih karakteristika pacijentovog tumora i stabilnost kroz različite pasaže *in vivo* (Gao i Chen 2015). Ksenografti se mogu koristiti u pretkliničkim i kliničkim studijama, odnosno, mogu se koristiti u istraživanju novih antitumorskih lijekova ili za personalizirani tretman tumora.

Gotovo svaki klinički odobren antitumorski lijek je bio testiran korištenjem ksenograftskih modela u kojima je pokazao obećavajuću aktivnost prije nego se nastavilo s ranim kliničkim testiranjem.

Međutim, zbog neuspjeha koji poneki lijekovi dožive u daljnjem kliničkom testiranju često se zapostavljaju uspjesi ovog modela (Troiani i sur. 2008). Naime, samo 5% antitumorskih lijekova koji pokazuju antitumorsku aktivnost u prekliničkim studijama dobiva dozvolu za kliničku primjenu (Koga i Ochiai 2019).

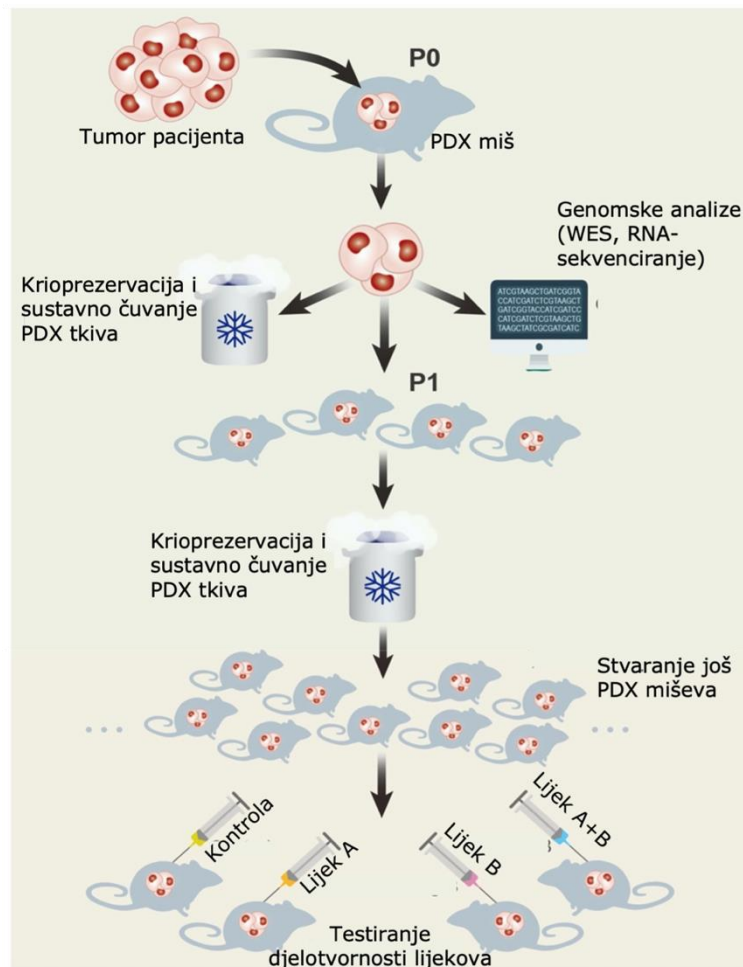
Ksenografti derivirani od pacijenta se generiraju implantacijom tumorskih fragmenata u imunodeficijentnog miša – subkutano ili ortotopski (u organ iz kojeg tumor potječe) (Gao i Chen 2015). Subkutano transplantirani tumori rijetko stvaraju metastaze koje su vrlo često biološka meta nekih ispitivanih lijekova u istraživanjima. Također, takva transplantacija nije reprezentativna stvarnom tumorskom mikrookolišu. S druge strane, ortotopski transplantanti ne pokazuju takve probleme. Međutim, oni su puno složeniji za uspostavljanje od subkutanih modela s obzirom da je potrebna kirurška intervencija (Jin i sur. 2010).

U nekim slučajevima znanstvenici implantiraju tumore u bubrežne kapsule. To dovodi do učinkovitog toka krvi te opskrbe tumora nutrijentima da bi mogli dalje rasti kao što se to događa u tijelu čovjeka (Cho i sur. 2016). Također, kod takvih implantacija dolazi do vrlo visoke stope uspješnosti, preko 95%, a tumorske osobine su očuvane. Na taj način ksenograft može biti konstantan izvor tumorskog tkiva dobiven iz minimalnog uzorka biopsije (Jin i sur. 2010).

Značajna povezanost odgovora na lijekove kod pacijenata i odgovarajućih ksenograftskih modela je otkrivena u 87% terapijskih ishoda. Zato koristimo ksenografte kao precizne i klinički relevantne modele (Koga i Ochiai 2019).

Hidalgo i suradnici su već 2011. godine proveli kliničku studiju tijekom koje su izdvojili pacijente s rakom u naprednom stadiju te su testirali lijekove na personaliziranim ksenograftima svakog pacijenta. Ksenografte od 14 pacijenata su tretirali s 63 lijeka u 232 različita terapijska pristupa. Učinkoviti tretman su identificirani za 12 pacijenata. Jedan pacijent je umro prije početka terapije, a ostatak ih je doživio dugotrajnu djelomičnu remisiju tumora. Bitno je napomenuti da odabrani personalizirani tretmani nisu bili očiti i ne bi se koristili kao prvi izbor konvencionalne terapije. Najbolji primjer je pacijent kojeg su tretirali kombinacijom cetuksimaba i bevacizumaba iako se ta kombinacija ne preporučuje u kliničkoj praksi.

Postupak stvaranja ksenografta u imunodeficijentnim miševima za određivanje personalizirane terapije je prikazan slikom 6. Ksenografte možemo generirati u nekoliko različitih sojeva miševa – biraju se prema stupnju imunosupresije te eksperimentalnim potrebama (Cho i sur. 2016). Najčešće se koriste imunodeficijentni goli miševi ili miševi s teškom kombiniranom imunodeficijencijom (SCID). Prvima nedostaje *Nu* gen te ne mogu stvarati T limfocite dok SCID miševima nedostaju funkcionalne i T i B stanice. Kod oba soja dolazi do određenog postotka odbacivanja ksenografta, ali su ipak pogodni da na njima rastu ljudski tumori (Troiani i sur. 2008). Agresivniji, metastatski tumori imaju veću uspješnost za uspješno stvaranje ksenografta od manje agresivnih tumora (Cho i sur. 2016).



Slika 6: Generiranje ksenografta dobivenih iz tumora pacijenata. Uzorci tumora su dobiveni operativnim zahvatom i podijeljeni na male dijelove te transplantirani u imunodeficientne miševe. Kada tumori narastu u P0 miševima, ksenografti se koriste za genomske analize, uključujući sekvenciranje eksona, RNA te analizu alternacija broja kopija gena. Nakon daljnjeg implantiranja ksenografta u imunodeficientne miševe (P1 i dalje) – testira se odgovor na tretman *in vivo*. Informacije o djelovanju pojedinih lijekova se koriste za određivanje terapije za pacijenta. Prilagođeno prema Cho i sur. 2016.

Postoje i značajni nedostaci korištenja ksenografta u terapiji tumora. Prvi je sama neuspješnost ugradnje tumora u miša, posebice izražena kod tumora prostate i tumora dojke.

Također, za većinu ksenograftskih modela potrebne su velike količine tkiva tumora te su biopsije iglom često nedovoljne.

Ako i dođe do uspješnog stvaranja ksenografta, javlja se problem samog vremena koje je bilo potrebno za stvaranje ksenografta te vrijeme za validaciju tumora. Ti koraci većinom traju više od 6 mjeseca. Taj vremenski odmak uvelike limitira korištenje ksenografta za tretman pacijenta u realnom vremenu.

Konačno, ksenograftski modeli imaju određene limite koji otežavaju eksperimente.

Odgovarajući su za testiranje limitiranog broja kombinacija lijekova, ali nisu povoljni za visoko protočno probiranje lijekova (eng. *high throughput screening*). Sljedeći limit je nemogućnost korištenja ksenografta u svrhu eksperimenata genetičkih manipulacija – poput uvođenja transgena ili „knockout“

gena (Gao i Chen 2015). Te naposljetku, kao što Troiani i suradnici (2008) ističu: „Miševi nisu ljudi. Biološki mehanizmi koji kontroliraju stanični ciklus stanice i apoptozu nisu savršeno konzervirani između te dvije vrste.“

Unatoč nedostacima, prednosti ksenografta ih nadmašuju te ih još uvijek koristimo u istraživanjima. Kao prvo, maligne stanice koje proučavamo u ksenograftima su humane za razliku od nekih prijašnjih modela kada su se koristile životinjske stanice tumora. Također, eksperimenti su većinom reproducibilni što olakšava nova istraživanja i korištenje već uhodanih protokola. Nadalje, mnoge humane tumorske linije su lako dostupne, a i miševi su kao model u eksperimentima dostupni u statistički odgovarajućim brojevima (Troiani i sur. 2008). Naposljetku, mnoge informacije koje dobivamo korištenjem visoko protočnih metoda su izrazito zahtjevne za analiziranje, vizualiziranje te konvergiranje u znanje koje nam je potrebno da bi se klinički ishodi pacijenata poboljšali. Personalizirani ksenografti su jako korisni u interpretaciji genomskih analiza, identifikaciji potencijalnih bioloških meta lijekova te povezivanjem meta s odgovarajućom terapijom (Garralda i sur. 2014).

2.6 ORGANOIDI

Landcaster i Knoblich (2014) definiraju organoide kao trodimenzionalne (3D, three-dimensional) kulture tkiva razvijene iz matičnih stanica. Ranija istraživanja su se fokusirala na populacije pojedinih matičnih stanica koje su derivirane iz jednog tipa stanice. Međutim, takav model nije reprezentativan ljudskom organu s obzirom na njegovu kompleksnost te nam pojedine matične stanice ne mogu biti povoljni modeli ljudskih organa.

S obzirom da razvoj organoida možemo potaknuti iz ljudskih matičnih stanica i iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica dobivenih od pacijenta – postoji veliki potencijal za kvalitetan model ljudskog razvoja i bolesti.

Organoidi mogu služiti za testiranje lijekova, potencijalno za transplantaciju organa te bi mogli bitno smanjiti korištenje laboratorijskih životinja.

Tri osnovne karakteristike organoida su:

- 1) Organoid mora sadržavati više od jednog tipa stanica organa čiji je model.
- 2) Mora pokazivati određene funkcije specifične tom organu.
- 3) Stanice unutar organoida moraju biti organizirane slično samom organu. Unutar toga se podrazumijeva i sličnost u načinu na koji organ uspostavlja svoju karakterističnu organizaciju tijekom razvoja.

Dakle, detaljnija definicija organoida je kolekcija nekoliko staničnih tipova koji se razvijaju iz matičnih ili progenitorskih stanica i samostalno se organiziraju pomoću sortiranja i prostorno ograničenog nasljeđivanja, slično procesu *in vivo*.

Prva uzgojena 3D kultura je uzgojena iz jedne epitelne matične stanice koja je formirala fiziološku arhitekturu organa. Sato i suradnici (2009) su primjetili da za preživljavanje epitelne matične stanice crijeva treba aktivni signalni put WNT te da stanice ekspresiraju receptor LGR5 koji dodatno pojačava to signaliziranje. Korištenjem medija bez seruma, uz dodatak WNT3 te R-spondina (ligand LGR5) – jedna matična stanica je formirala organoid s pravilnom strukturom crijevnih resica koja je sadržavala matične i vrčaste stanice, stanice resica te tranzicijske stanice između matičnih i diferenciranih stanica (eng. *transiently amplifying cells*).

Danas smo u mogućnosti stvoriti organoide za mnoge organe. Najnovija otkrića uključuju organoide retine, unutarnjeg uha, hipofize, bubrega te mozga (Lancaster i Knoblich 2014).

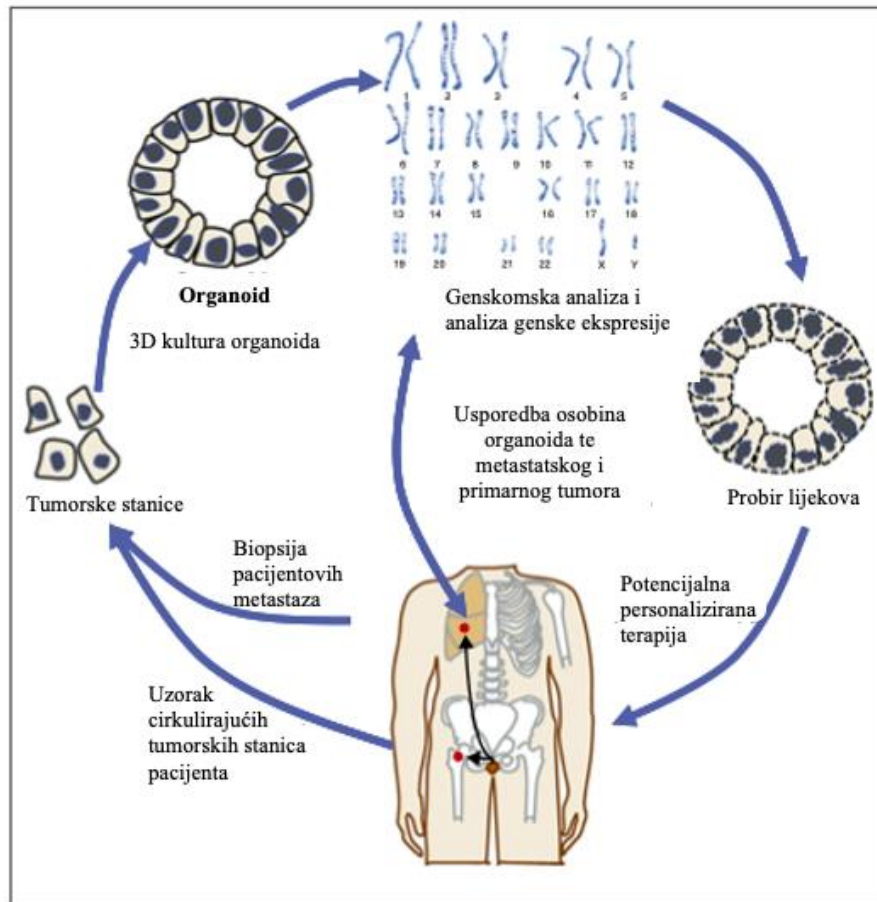
Takva otkrića pružaju mogućnosti uzgoja tumorskih organoida pacijenata *in vitro* (Gao i Chen 2015). Prednost organoida je što rastu bez starenja te mogu biti genetički manipulirani, što je vrlo povoljno za eksperimentalna istraživanja.

Osim toga, iz organoida pacijenata se stvaraju biobanke koje sadrže tkiva očuvana krioprezervacijom i informacije o tumoru te pacijentu. Takve biobanke se koriste za otkrivanje novih antitumorskih molekula. Također, pomoću biobanaka se mogu pretraživati i testirati lijekovi prethodno otkriveni za neke druge patologije da bi se odredilo eventualno antitumorsko djelovanje. Korištenje takvih lijekova u tretmanima se tada naziva „korištenje izvan odobrene indikacije“ (eng. *off-label use*) (Vivarelli i sur. 2020).

Gao i Chen (2015) se fokusiraju na objavljene radove o organoidnim kulturama raka prostate. Rak prostate je teško kultivirati *in vitro*, a jedan od razloga je što postoji samo sedam javno dostupnih staničnih linija. To znači da mnoge mutacije gena specifične za rak prostate (*FOXA1*, *SPOP*...) nisu dostupne kao uzgojene stanične linije. Međutim, korištenjem organoidnih kultura uspješno je uspostavljeno 6 organoidnih kultura iz biopsija metatstatskog raka prostate te jedna iz cirkulirajućih stanica raka. Shema uspostavljanja organoidnih kultura tumora i testiranja na osjetljivost lijekova je prikazana na slici 7.

7 organoidnih linija je bilo molekularno karakterizirano – sekvenciranjem su identificirane somatske mutacije, analiziran je transkriptom te su određene promjene u brojevima kopija pojedinih dijelova genoma. Analize transkriptoma su pokazale veliku raznolikost između sedam linija što odgovara fenotipskoj raznolikosti tumora. Analizama je također potvrđeno da organoidne linije posjeduju jednake somatske mutacije kao i originalni tumor čak i nakon 3 mjeseci uzgoja *in vitro* te je utvrđena velika sličnost transkriptoma.

Dakle, tumorski organoidi raka prostate molekularno predstavljaju tumorsko tkivo *in vivo* te se na njima može testirati osjetljivost na lijekove. Testiranjem je utvrđena visoka osjetljivost na lijekove koji ciljano djeluju na androgene receptore i fosfoinozimid-3-kinazne puteve.



Slika 7: Shematski dijagram organoidne kulture raka i testa osjetljivosti na lijekove.

Izolirane stanice raka prostate su dobivene iz biopsije tkiva ili cirkulirajućih tumorskih stanica i uzgojene u organoidni sustav. Stanice organoida su analizirane na histološkoj, genomskoj i transkriptomskoj razini te uspoređene s izvornim tumorom. Potencijalni lijekovi za terapiju se predviđaju na temelju rezultata analiza te se organoidni modeli zatim koriste za testiranje osjetljivosti na pojedine lijekove. Nakon određivanja pogodnog tretmana, pacijentu se određuje terapija i prati se daljnji odgovor tumora. Prilagođeno prema Gao i Chen 2015.

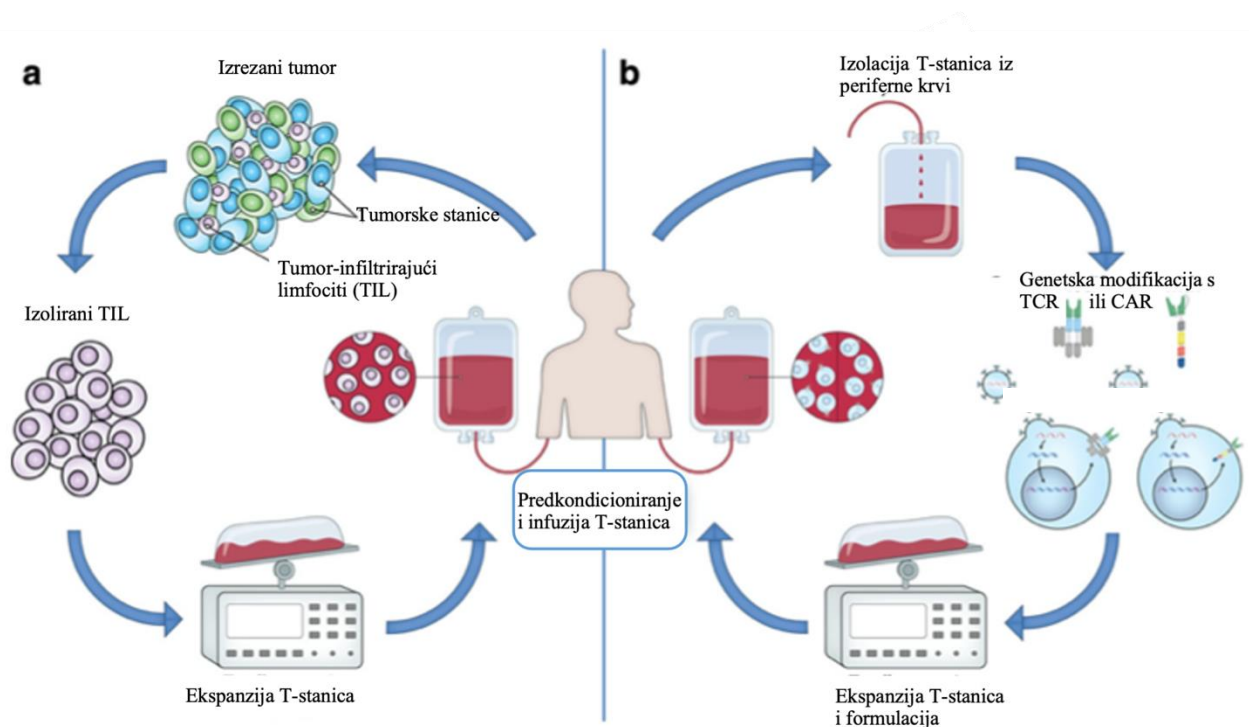
Jedan od limita korištenja organoida je njihov limitirani potencijal za rast zbog teže dostupnosti nutrijenata. Vaskularizacija je uobičajen problem u kulturama tkiva. U slučaju generiranja organoida moguće je korištenje rotirajućih bioreaktora da bi došlo do bolje izmjene nutrijenata. Takvi organoidi mogu narasti do nekoliko milimetara. Druga mogućnost je transplantacija vaskularnog tkiva što stimulira invaziju domaćinske vaskulature (Lancaster i Knoblich 2014).

Ako nema uspješne vaskularizacije, prekomjerni rast tumora uzrokuje smrt stanica u unutrašnjosti organoida. Još jedan nedostatak organoida je nedostatak kompleksnosti modela *in vivo* te potreba rasta organoida u vrlo specifičnim uvjetima.

Unatoč nedostacima, vrlo je bitno što je organoid trodimenzionalan model te se sastoji od više različitih stanica za razliku od nekih drugih modela. Takva kultura stanica je stabilna te se krioprezervacijom može osigurati njeno očuvanje i daljnje proučavanje. Konačno, za moderne metode istraživanja je od velike važnosti da se na organoidima mogu provoditi visokoprotočni probiri (eng. *high throughput screening*) (Vivarelli i sur. 2020).

2.7 ADOPTIVNA STANIČNA TERAPIJA

Adoptivna stanična terapija je imunoterapija tumora koja prikuplja imunološke stanice iz periferne krvi ili samog tumora pacijenta (Esmailzadeh i Khosh 2021). Postoji više metoda ovakve terapije. Postupak ovisi o tome jesu li imunološke stanice pacijenta možda već prepoznale tumor, ali ih nema dovoljno ili nisu uopće prepoznale tumor. Prema tome se takve stanice mogu ili aktivirati i ekspanzirati pa unijeti u tijelo ili se mogu genetički modificirati (Cancer Research Institute 2021). Takav postupak je prikazan na slici 8. T-stanice se mogu genetički modificirati da ekspresiraju kimerni antigenski receptor (CAR) ili T-stanični receptor (TCR) na svojoj staničnoj površini. CAR i TAR su dizajnirani da vežu specifične antigene u tumorskom mikrookolišu (Esmailzadeh i Khosh 2021).



Slika 8: Različiti postupci biopsije i prilagodbe T-stanica imunološkog sustava da bi mogle biti korištene za tretman raka.

- a) Iz pacijenta se biopsijom uzima uzorak ili cijeli tumor. Iz tumorskog tkiva se zatim izoliraju tumor infiltrirajuće T-stanice (TIL). Stanice se ekspandiraju *in vitro* te se infuziraju u pacijenta.
- b) T-stanice se izoliraju iz krvi pacijenta. Ekspandiraju se u kulturi stanice i genetički se modificiraju da ekspresiraju T-stanični receptor (TCR) ili kimerni antigenski receptor (CAR) koji imaju mogućnost specifično prepoznati i uništiti tumorske stanice nakon infuzije u pacijenta. Prilagođeno prema Met i sur. 2019.

Danas su samo dvije adoptivne stanične terapije odobrene i to za tretman limfoma i multiplog mijeloma (Cancer Reserach Institute 2021). Unatoč tome, terapija se dalje testira i za brojne druge tumore.

Rosenberg i Dudley (2009) smatraju da je adoptivna stanična terapija najbolji tretman metastatskog melanoma. Rad je pisan neposredno nakon provođenja tri kliničke studije terapije adoptivnim stanicama pacijenta. Odgovor na terapiju se dogodio kod između 49% i 72% pacijenata. Odgovor je bio zabilježen kod svih metastaza raka i bio je dugotrajan, a kod mnogih pacijenata je trajao više od 3 godine. To je iznimno obećavajuće za takvu agresivnu vrstu tumora.

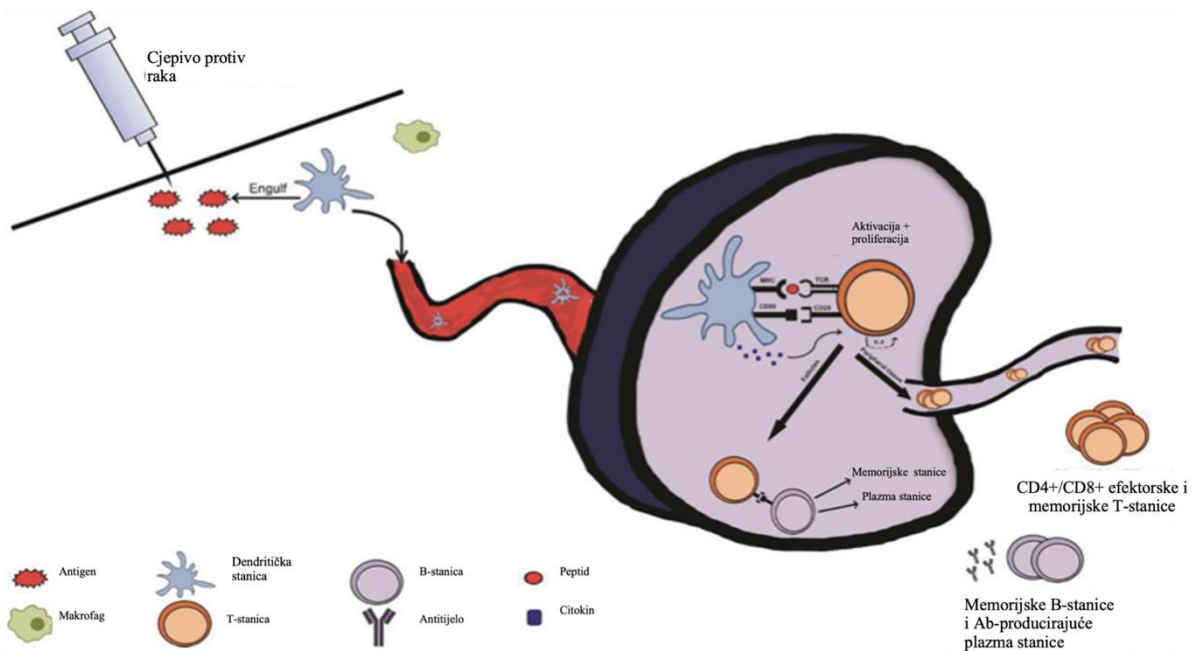
Nedostaci ovakve terapije su izazovi vezani uz stvaranje zasebnog genetički modificiranog produkta za svakog pacijenta, cijena takve terapije te vrijeme potrebno za stvaranje genetičkih modificiranih T-stanica, posebno kod pacijenata s tumorom koji brzo napreduje. Međutim, ova metoda je dosad dovela do iznimno obećavajućih kliničkih rezultata. Kod nekih pacijenata je došlo do potpunog i dugotrajnog odgovora na takvu terapiju. Unatoč tome, postoje mnogi pacijenti na koje terapija uopće ne djeluje. U budućnosti se razmatra daljnji razvitak adoptivne stanične terapije koristeći i druge imunološke stanice poput prirodno ubilačkih stanica (Rezvani 2019, Met i sur. 2019).

2.8 CJEPIVO PROTIV RAKA

Cjepivo protiv raka, u usporedbi sa drugim tretmanima, jedino ima potencijal trajati čitav životni vijek. U teoriji, u cijepljenim pacijentima bi se mogao stvoriti takav imunološki odgovor koji bi u potpunosti izliječio tumor ili bi ga konstantno suzbijao. Glavni nedostatak stvaranja funkcionalnih cjepiva je nedostatak tumorski specifičnih antigena odnosno slabi imunološki odgovor na neke tumorske antigene jer se detektiraju kao antigeni normalnih stanica pacijenta. Eksperimentalno se testiraju razne strategije za pojačavanje slabog imunološkog odgovora protiv tumorski asociranih antigena.

U eksperimentalnim cjepivima se ispituju razne molekule za stvaranje imunološkog odgovora: proteini ili peptidi, tumorske stanice ili njihovi lizati te DNA i RNA molekule.

Kod cjepiva koja sadrže tumorske stanice – tumorske stanice iz cjepiva mogu biti vlastite, pacijentove stanice ili tumorske stanice nekog drugog pacijenta (Vergati i sur. 2010). Način funkcioniranja cjepiva je prikazan na slici 9.



Slika 9: Odgovor imunološkog sustava na preventivno cijepljenje protiv raka.

Nakon cijepljenja, stanice imunološkog sustava (makrofagi, dendritičke stanice) prezentiraju antigene, prepoznaju ih kao strane te ih usvajaju. Zatim ih transportiraju do limfnih čvorova, procesiraju i prezentiraju putem kompleksa histokompatibilnosti. Jednom kada je u limfnom čvoru, imunološka sinapsa će nastati kada stanice prezentiraju antigen naivnim T-stanicama. T-stanice se aktiviraju, proliferiraju i diferenciraju u efektorske T-stanice. One zatim sudjeluju u aktivaciji B-stanica ili odlaze dalje kao efektorske ili memorijske T-stanice. Taj primarni odgovor na cijepljenje uzrokuje stvaranje memorijskih stanica da bi sljedeći odgovor bio brz i snažan. Prilagođeno prema Crews i suradnici 2021.

Jedno od novijih otkrića je korištenje dendritičkih stanica u cjepivima. To je jedna od najperspektivnijih strategija personalizirane imunoterapije te je u budućnosti potrebno detaljnije istražiti subtipove dendritičkih stanica (Esmaeilzadeh i Khosh 2021).

Tanyi i suradnici (2018) su proveli testiranje personaliziranog cjepiva na pacijentima s regresivnim rakom jajnika. Cjepivo je bilo generirano iz dendritičkih stanica pacijentica. Dendritičke stanice su bile pulsirane s oksidiranim autolognim lizatom cijelih tumorskih stanica. Cjepivo je bilo testirano samostalno (5 pacijenata) te u kombinaciji s klasičnim tretmanom raka jajnika (2 različita tretmana, ukupno 20 pacijenata). Testiranje je trajalo do progresije bolesti ili iscrpljivanja cjepiva te su ukupno upotrijebili 392 doza cjepiva.

Cijepljenje je induciralo odgovor T-stanica protiv antigena tumora, kao i protiv novih mutacija antigena koji prethodno nisu bili prepoznati. Cjepivo se pokazalo kao obećavajuća metoda za produljenje preživljenja pacijenata oboljelih od raka.

U budućnosti je potrebno daljnje analiziranje varijacija imunoloških sustava koji postoje kod pacijenata da bi se razvila učinkovita personalizirana cjepiva protiv raka (Esmaeilzadeh i Khosh 2021).

3 PERSONALIZIRANI TRETMANI TUMORA U KLINIČKOJ PRIMJENI

U nastavku su navedeni najčešći humani tumori te kratki opisi personaliziranih tretmana takvih tumora, odnosno odabranih podtipova.

3.1 RAK DOJKE

Rak dojke je najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest u Europskoj uniji (Hrvatski zavod za javno zdravstvo 2020). Preventivne metode poput godišnjeg mamograma su usvojene u širokoj populaciji. Također, testiranje na mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2* je uobičajeno za žene rizične obiteljske povijesti bolesti (Verma 2012). Mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2* su odgovorne za do 5% slučajeva raka dojke. Detekcija tih mutacija je jako bitna jer su žene s tim mutacijama iznimno podložne raku dojke i jajnika te trebaju obavljati redovne kontrole (Kamel i Al-Amodi 2016).

Poznati prognosički marker, *HER2*, je najkorisniji za probir pacijenata s ranim ili metastaziranim rakom dojke koji se može tretirati trastuzumabom (Kamel i Al-Amodi 2016).

Procjena je da 20-25% tumora dojke prekomjerno eksprimira gen *HER2*. Uzrok je gotovo uvijek amplifikacija gena *HER2* i često je pretkazatelj loše kliničke slike (Keefe 2002).

Trastuzumab je bio prvi ciljani tretman dozvoljen za liječenje podtipa nekog tumora (Syn i sur. 2016). Gen *HER2* kodira za proteinski receptor na staničnoj površini koji signalizira normalni stanični rast. Kada je gen *HER2* prekomjerno ekspresiran, dolazi do vrlo nagle diobe stanica. Trastuzumab se veže na receptore *HER2* da bi spriječio diobu stanica te stimulira imunološki sustav (Chemocare 2021). Vrlo je bitno ispravno određivanje *HER2* statusa u donošenju terapijskih odluka iz više razloga. Prvi je da je trastuzumab povezan s visokom kardiotoksičnošću. Drugi razlog je cijena tretmana koja iznosi 42 000 eura po ciklusu liječenja (La Thangue i Kerr 2011).

3.2 MELANOM

Vemurafenib je tretman za melanome koji ekspresiraju mutirani gen *BRAF* (Tannock i sur. 2016).

Takvu mutaciju pronalazimo u otprilike 60% melanoma i rjeđe kod tumora drugih organa (Parkinson i sur. 2012).

Vemurafenib se ciljano veže na ATP-vezno mjesto mutirane kinaze *BRAF* i inhibira njezinu aktivnost. Time se uzrokuje inhibicija prekomjerno aktiviranog signalnog puta MAPK u tumorskim stanicama. Posljedica je smanjena ekspresija mutirane kinaze te smanjenje proliferacije tumorskih stanica (National Library of Medicine 2021).

Iako inhibitori gena *BRAF* povećavaju stopu preživljavanja u pacijenata s tom mutacijom, čak i kada je terapija kombinirana s drugim lijekovima, većina pacijenata razvije rezistenciju nakon 6 do 12 mjeseci. Unatoč tome, situacija je još gora za pacijente koji nemaju *BRAF* mutaciju. Oni imaju manje terapijskih opcija i trenutno su limitirani na kemo- ili imunoterapiju (Girotti i sur. 2016).

3.3 RAK PLUĆA

Rak pluća je najčešći uzrok smrti od zloćudnih bolesti u Europskoj uniji (Hrvatski zavod za javno zdravstvo 2020). Postoje dva glavna tipa raka pluća – karcinom malih stanica (mikrocelularnih) i karcinom ne-malih stanica (nemikrocelularni) (Verma 2012).

Kod karcinoma ne-malih stanica pluća često korištena biološka meta je EGFR.

EGFR je epidermalni receptor faktora rasta. Postoje mutacije specifične za karcinom ne-malih stanica pluća koje aktiviraju EGFR. Takve mutacije uzrokuju aktivaciju EGFR signaliziranja bez potrebe za ligandom. Postoje 3 odobrena tretmana za napredan oblik tog karcinoma – gefitinib, erlotinib te afatinib. Oni su ireverzibilni inhibitori tirozinske kinaze EGFR te pokazuju puno bolje rezultate od klasičnog liječenja kemoterapijom (Kalia 2015). Međutim, zbog čestog razvoja rezistencije na terapiju postoji velika potreba da se identificiraju novi lijekovi koji bi inhibirali mutirani receptor tirozinske kinaze (koji uzrokuje rezistenciju), ali ne i divlji tip (Saraon i sur. 2020).

Nasuprot tome, karcinom malih stanica pluća je vrlo agresivni karcinom. Samo 7% pacijenata preživi 5 godina nakon obolijevanja. Dugo nije bilo personaliziranog tretmana za karcinom malih stanica pluća, ali nedavno se počela koristiti imunoterapija koja pokazuje određeni napredak. Imunoterapija se provodi pomoću lijekova atezolizumab i durvalumab koji blokiraju imunološke kontrolne točke. Također je otkriven obećavajući biomarker, SLFN11. Kod nekih pacijenata on omogućuje predviđanje pozitivnog odgovora na određene lijekove te takvi pacijenti pokazuju dulje preživljenje.

Uz to, otkriveno je 4 podtipova karcinoma malih plućnih stanica koji pokazuju jedinstvenu osjetljivost na neke terapije. Jedan od njih je subtip SCLC-1 koji pozitivno odgovara na imunoterapiju (Zhang i sur. 2021).

3.4 RAK DEBELOG CRIJEVA

Rak debelog crijeva je treći najčešći rak i muškaraca i žena.

Zbog novih testova detekcije te uklanjanja polipa prije razvoja raka i tretmana koji su rezultat korištenja prediktivnih i prognostičkih biomarkera dolazi do pada incidencije raka debelog crijeva (Kalia 2015).

Otprilike 70% rakova debelog crijeva ekspresira transmembralni receptor EGFR.

Anti-EGFR tretman se vrši monoklonalnim antitijelima poput cetuximaba ili panitumumaba. Oni inhibiraju EGFR na način da mu kompetiraju za vezanje na njegove endogene ligande.

Zanimljivo je da se kao predviđanje pozitivnog odgovora na tretman cetuximabom prati pojava osipa, a to je zapravo česta nuspojava tog lijeka (Kalia 2015).

Česta mutacija koja se pojavljuje kod raka debelog crijeva je mutacija gen *KRAS*. Pojavljuje se u otprilike 40% pacijenata s rakom debelog crijeva. Ako se u tumoru javi takva mutacija, on ne odgovara na tretmane za inhibiciju EGFR-a (Verma 2012).

3.5 RAK PROSTATE

Rak prostate je najčešći rak u muškaraca i najčešći uzrok smrti muškaraca od raka.

Kao dijagnostički marker raka prostate se koristi PSA (eng. *prostate specific antigen*) test i rektalni pregled. Introdokcija PSA testa je dovela do naglog porasta pojave raka prostate jer se bolest počela dijagnosticirati u ranijoj fazi te se smanjila smrtnost od raka prostate (Kamel i Al-Amodi 2016). Unatoč tome, metastazirani rak prostate i rezistencija na lijekove uzrokuje većinu smrtnih slučajeva oboljelih pacijenata. S obzirom da rak prostate ne uzrokuje bol te mu treba nekoliko godina da se razvije, izazov je identificirati optimalni tretman za određene stadije. Najčešći tretmani su kemoterapija, hormonalna terapija, operativni zahvat i radijacija (Verma 2012).

Istraživanja pomoću sekvenciranja velikih razmjera otkrivaju neka genetska i epigenetska obilježja pojedinih subtipova raka prostate. Takav pristup omogućuje otkrivanje novih personaliziranih terapija (Wang i sur. 2020).

Ferrari i suradnici (2020) su identificirali gubitak tumorskog supresora *ROBO1* kao uzrok agresivnog tipa raka prostate kojem su posebno podložni pacijenti afroameričkog podrijetla. Gubitak supresora *ROBO1* može služiti kao biomarker koji bi predviđao regresiju raka, početak metastaziranja te neuspješnost terapije kod agresivnog tipa raka prostate.

Međutim, s obzirom da nije moguće vratiti funkciju supresora *ROBO1*, terapeutski se cilja na gen *DOCK1*. Naime, gubitak *ROBO1* može aktivirati *DOCK1* kao promotor rasta. Da bi se to spriječilo, u antitumorskoj terapiji se inhibira gen *DOCK1*.

4 LIMITI PERSONALIZIRANE MEDICINE

Personalizirana medicina u liječenju tumora ima veliki potencijal, ali istraživanje zahtjeva mnogo resursa te je iznimno zahtjevno. Razvojem novih metoda se postigao ogroman napredak u personaliziranoj medicini. Unatoč tome, proći će još mnogo vremena prije nego se otkriju odgovarajući antitumorski tretmani da bi se oni mogli koristiti za potpuno personalizirani tretman generalne populacije. Danas su razvijeni pojedini tretmani koji odlično djeluju kod nekih pacijenata, ali na razini cijele populacije personalizirani pristup je (trenutno) neodrživ i ne daje povoljne rezultate. Naravno, istraživanje i korištenje personaliziranih tretmana se i dalje nastavlja. Stoga je bitno u obzir uzeti limite personalizirane medicine te spriječiti nanošenje nepotrebne štete pacijentima. U nastavku su navedeni neki bitni aspekti nedostataka personalizirane medicine kojih bi i liječnici i pacijenti trebali biti svjesni.

Problem počinje sa samim preventivnim dijelom personalizirane medicine. Doktori se moraju posebno pobrinuti da pacijenti budu svjesni potencijalne opasnosti preventivnih mjera iako je to vrlo kontraintuitivno.

Pacijentima se godinama govorilo da što su proaktivniji oko svojeg zdravlja, bit će sigurniji i zdraviji. Veliki broj organizacija promovira preventivne preglede muškaraca i žena u svrhu otkrivanja raka prostate sa PSA testom odnosno raka dojke pomoću mamografije. Međutim, sve je jasnije da preventivni testovi mogu zapravo načiniti štetu pacijentima.

Cilj preventivnog testiranja je poboljšati rezultate liječenja, a ne jednostavno otkriti bolesno stanje.

Preventivno testiranje može pacijentima nanijeti štetu na nekoliko načina:

- 1) Lažni pozitivni rezultati – Pojava pozitivnog rezultata kod zdravog pacijenta. Takvi rezultati uzrokuju anksioznost, stres te izravne opasnosti (poput infekcije i drugih komplikacija) koje nastaju daljnjim invazivnim testiranjem kojim se na kraju otkrije da je osoba zdrava.
- 2) Prekomjerna dijagnoza (eng. *overdiagnosis*) – Detekcija asimptomatske „abnormalnosti“ ili „stanja“ koje ne bi uzrokovala nikakve simptome niti smrt. Primjer su tumori koji nikad ne nastave rasti ili napreduju toliko sporo da pacijent umre od drugih uzroka prije nego se simptomi tumora pojave. Također, pojedini tumori mogu i regresirati, zbog imunih ili drugih mehanizama. Uzrok prekomjerne dijagnoze je napredak tehnologije, točnije razvoj osjetljivijih metoda i testova te preventivnih pregleda velikog dijela populacije (Bell i sur. 2017).

Tablica 1 prikazuje procjenu prekomjernih dijagnoza za pojedine tipove tumora. Za tumor štitnjače se procjenjuje da je barem polovica svih dijagnosticiranih slučajeva tumora zapravo bezopasna te nije bilo zdravstvene potrebe za takvom dijagnozom.

Tablica 1: Prikaz procjene učestalosti prekomjerne dijagnoze za pojedine tipove tumora. Prilagođeno prema Bell i sur. 2017.

TUMOR	TEST PROBIRA	PROCJENA PREKOMJERNE DIJAGNOZE
Tumor prostate	PSA test	40% - 56%
Tumor dojke	Mamografija	0% - >50%
Tumor štitnjače	Ultrazvuk, CT, MRI	50% - 90%
Tumor pluća	Niska doza CT-a	18.5%
<i>*Prikazani postoci učestalosti prekomjerne dijagnoze variraju zbog različitih metodoloških pristupa korištenih za izračun procjena.</i>		

Iako u zdravstvu imamo pojavu sve većeg broja antitumorskih lijekova koji ciljno djeluju na različite signalne puteve, postoje određeni nedostaci.

Kao prvo, većina takvih lijekova samo djelomično inhibira signalne puteve, a takvi lijekovi su često pretoksični da bi se tretmani kombinirali. Većinski uzrok tome je ovisnost normalnih humanih stanica o istim signalnim putevima koje inhibiramo antitumorskim lijekom (Tannock i Hickman 2016).

Poznati primjer je slučaj terapije raka dojke trastuzumabom. Prilikom liječenja pacijenti često razviju srčane probleme. Nije poznat uzrok, ali postoje dvije hipoteze – prva je da je trastuzumab sam po sebi kardiotoksičan. Druga hipoteza pretpostavlja da se učinak trastuzumaba pojačava ili ima aditivna svojstva kada se terapija daje nakon ili uz terapiju antraciklinima. Antraciklini su lijekovi koji se koriste u standardnoj kemoterapiji te je velik broj pacijenata oboljelih od tumora u nekom trenutku liječen antraciklinima (Keefe 2002).

Sljedeći problem je klonalna evolucija uzrokovana selektivnim pritiskom terapije.

Zbog selektivnog pritiska dolazi do *de novo* mutacija te stjecanja rezistencije što je danas poznato kao veliki nedostatak molekularno specifičnih terapija. Taj isti problem se javljao i u klasičnoj citostatskoj kemoterapiji tumora (Gonzalez de Castro i sur. 2013).

Bez obzira na veliki napredak u određivanju novih bioloških meta lijekova, još uvijek smo daleko pronalasku rješenja za tumorsku rezistenciju

Idealno rješenje bi bilo odrediti sve molekularne abnormalnosti na koje možemo djelovati te sve mehanizme rezistencije te djelovati na njih preciznim kombiniranim ciljanim terapijama (Gonzalez de Castro i sur. 2013).

Konačno, jedan od ključnih limita personaliziranog tretmana tumora je cijena lijekova. Treba uzeti u obzir da cijena ne korelira nužno s kliničkim uspjehom lijeka. Iako će se razvojem personalizirane

medicine na tržištu javiti mnogo bioloških terapija, to ne znači da će doći do povećanja postotka preživljenja ili kvalitete života pacijenata (Tannock i Hickman 2016).

5 LITERATURA

- Aboulkheyr Es, H., Montazeri, L., Aref, A.R., Vosough, M., Baharvand, H., 2018. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends in Biotechnology* 36, 358–371.
- Baylin, S.B., Ohm, J.E., 2006. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107–116.
- Bell, N. R., Grad, R., Dickinson, J. A., Singh, H., Moore, A. E., Kasperavicius, D., Kretschmer, K. L., 2017. Better decision making in preventive health screening: Balancing benefits and harms. *Canadian Family Physician* 63, 521-524.
- Bragança, J., Lopes, J.A., Mendes-Silva, L., Santos, J.M.A., 2019. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *WJSC* 11, 421–430.
- Bryce, A.H., Egan, J.B., Borad, M.J., Stewart, A.K., Nowakowski, G.S., Chanan-Khan, A., Patnaik, M.M., Ansell, S.M., Banck, M.S., Robinson, S.I., Mansfield, A.S., Klee, E.W., Oliver, G.R., McCormick, J.B., Huneke, N.E., Tagtow, C.M., Jenkins, R.B., Rumilla, K.M., Kerr, S.E., Kocher, J.-P.A., Beck, S.A., Fernandez-Zapico, M.E., Farrugia, G., Lazaridis, K.N., McWilliams, R.R., 2017. Experience with precision genomics and tumor board, indicates frequent target identification, but barriers to delivery. *Oncotarget* 8, 27145–27154.
- Cho, S.-Y., Kang, W., Han, J.Y., Min, S., Kang, J., Lee, A., Kwon, J.Y., Lee, C., Park, H., 2016. An Integrative Approach to Precision Cancer Medicine Using Patient-Derived Xenografts. *Molecules and Cells* 39, 77.
- Crews, D.W., Dombroski, J.A., King, M.R., 2021. Prophylactic Cancer Vaccines Engineered to Elicit Specific Adaptive Immune Response. *Front. Oncol.* 0.
- Esmaeilzadeh, A., Cancer Gene Therapy Research Center (CGRC), Zanjan University of Medical Science, Zanjan, Iran, Khosh, E., School of Medicine, Zanjan University of Medical Science, Zanjan, Iran, 2021. Personalized Immunology in Cancer: Paving the Way Towards a Better Quality of Life. *Multidiscip Cancer Investig* 5, 1–8.
- Ferrari, M.G., Ganaie, A.A., Shabenah, A., Mansini, A.P., Wang, L., Murugan, P., Davicioni, E., Wang, J., Deng, Y., Hoepfner, L.H., Warlick, C.A., Konety, B.R., Saleem, M., 2020. Identifying and treating *ROBO1*^{-ve} / *DOCK1*^{+ve} prostate cancer: An aggressive cancer subtype prevalent in African American patients. *The Prostate* 80, 1045–1057.
- Gao, D., Chen, Y., 2015. Organoid development in cancer genome discovery. *Current Opinion in Genetics & Development* 30, 42–48.
- Garralda, E., Paz, K., López-Casas, P.P., Jones, S., Katz, A., Kann, L.M., López-Rios, F., Sarno, F., Al-Shahrouf, F., Vasquez, D., Bruckheimer, E., Angiuoli, S.V., Calles, A., Diaz, L.A., Velculescu, V.E., Valencia, A., Sidransky, D., Hidalgo, M., 2014. Integrated Next-Generation Sequencing and Avatar Mouse Models for Personalized Cancer Treatment. *Clin Cancer Res* 20, 2476–2484.
- Girotti, M.R., Gremel, G., Lee, R., Galvani, E., Rothwell, D., Viros, A., Mandal, A.K., Lim, K.H.J., Saturno, G., Furney, S.J., Baenke, F., Pedersen, M., Rogan, J., Swan, J., Smith, M., Fusi, A., Oudit, D., Dhomen, N., Brady, G., Lorigan, P., Dive, C., Marais, R., 2016. Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma. *Cancer Discov* 6, 286–299.

- Gonzalez de Castro, D., Clarke, P.A., Al-Lazikani, B., Workman, P., 2013. Personalized Cancer Medicine: Molecular Diagnostics, Predictive biomarkers, and Drug Resistance. *Clin Pharmacol Ther* 93, 252–259.
- Hamstra, D.A., Rehemtulla, A., Ross, B.D., 2007. Diffusion Magnetic Resonance Imaging: A Biomarker for Treatment Response in Oncology. *JCO* 25, 4104–4109.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621.
- Hidalgo, M., Bruckheimer, E., Rajeshkumar, N.V., Garrido-Laguna, I., De Oliveira, E., Rubio-Viqueira, B., Strawn, S., Wick, M.J., Martell, J., Sidransky, D., 2011. A Pilot Clinical Study of Treatment Guided by Personalized Tumorgrafts in Patients with Advanced Cancer. *Mol Cancer Ther* 10, 1311–1316.
- Jin, K., Teng, L., Shen, Y., He, K., Xu, Z., Li, G., 2010. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol* 12, 473–480.
- Kalia, M., 2015. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 64, S16–S21.
- Kaliyappan, K., Palanisamy, M., Govindarajan, R., Duraiyan, J., 2012. Microarray and its applications. *J Pharm Bioall Sci* 4, 310.
- Kamel, H.F.M., Al-Amodi, H.S.B., 2016. Cancer Biomarkers, in: Wang, M., Witzmann, F.A. (Eds.), *Role of Biomarkers in Medicine*. InTech.
- Keefe, D.L., 2002. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 95, 1592–1600.
- Khotskaya, Y.B., Mills, G.B., Mills Shaw, K.R., 2017. Next-Generation Sequencing and Result Interpretation in Clinical Oncology: Challenges of Personalized Cancer Therapy. *Annu. Rev. Med.* 68, 113–125.
- Kim, C., 2014. Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application. *Blood Res* 49, 7.
- Koga, Y., Ochiai, A., 2019. Systematic Review of Patient-Derived Xenograft Models for Preclinical Studies of Anti-Cancer Drugs in Solid Tumors. *Cells* 8, 418.
- La Thangue, N.B., Kerr, D.J., 2011. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 587–596.
- Lancaster, M.A., Knoblich, J.A., 2014. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345, 1247125–1247125.
- Lin, W., Huang, L., Li, Y., Fang, B., Li, G., Chen, L., Xu, L., 2019. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *BioMed Research International* 2019, 1–12.
- Liu, X., Ory, V., Chapman, S., Yuan, H., Albanese, C., Kallakury, B., Timofeeva, O.A., Nealon, C., Dakic, A., Simic, V., Haddad, B.R., Rhim, J.S., Dritschilo, A., Riegel, A., McBride, A., Schlegel, R., 2012. ROCK Inhibitor and Feeder Cells Induce the Conditional Reprogramming of Epithelial Cells. *The American Journal of Pathology* 180, 599–607.

- Maruvada, P., Wang, W., Wagner, P.D., Srivastava, S., 2005. Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis. *BioTechniques* 38, S9–S15.
- Met, Ö., Jensen, K.M., Chamberlain, C.A., Donia, M., Svane, I.M., 2019. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol* 41, 49–58.
- Morash, M., Mitchell, H., Beltran, H., Elemento, O., Pathak, J., 2018. The Role of Next-Generation Sequencing in Precision Medicine: A Review of Outcomes in Oncology. *JPM* 8, 30.
- Parkinson, D.R., Johnson, B.E., Sledge, G.W., 2012. Making Personalized Cancer Medicine a Reality: Challenges and Opportunities in the Development of Biomarkers and Companion Diagnostics. *Clin Cancer Res* 18, 619–624.
- Plaks, V., Koopman, C.D., Werb, Z., 2013. Circulating Tumor Cells. *Science* 341, 1186–1188.
- Polzer, B., Medoro, G., Pasch, S., Fontana, F., Zorzino, L., Pestka, A., Andergassen, U., Meier-Stiegen, F., Czyz, Z.T., Alberter, B., Treitschke, S., Schamberger, T., Sergio, M., Bregola, G., Doffini, A., Gianni, S., Calanca, A., Signorini, G., Bolognesi, C., Hartmann, A., Fasching, P.A., Sandri, M.T., Rack, B., Fehm, T., Giorgini, G., Manaresi, N., Klein, C.A., 2014. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med* 6, 1371–1386.
- Rezvani, K., 2019. Adoptive cell therapy using engineered natural killer cells. *Bone Marrow Transplant* 54, 785–788.
- Rosenberg, S.A., Dudley, M.E., 2009. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Current Opinion in Immunology* 21, 233–240.
- Saraon, P., Snider, J., Kalaidzidis, Y., Wybenga-Groot, L.E., Weiss, K., Rai, A., Radulovich, N., Drecun, L., Vučković, N., Vučetić, A., Wong, V., Thériault, B., Pham, N.-A., Park, J.H., Datti, A., Wang, J., Pathmanathan, S., Aboualizadeh, F., Lyakisheva, A., Yao, Z., Wang, Y., Joseph, B., Aman, A., Moran, M.F., Prakesch, M., Poda, G., Marcellus, R., Uehling, D., Samaržija, M., Jakopović, M., Tsao, M.-S., Shepherd, F.A., Sacher, A., Leighl, N., Akhmanova, A., Al-awar, R., Zerial, M., Stagljar, I., 2020. A drug discovery platform to identify compounds that inhibit EGFR triple mutants. *Nat Chem Biol* 16, 577–586.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Scagliotti, G., Hanna, N., Fossella, F., Sugarman, K., Blatter, J., Peterson, P., Simms, L., Shepherd, F.A., 2009. The Differential Efficacy of Pemetrexed According to NSCLC Histology: A Review of Two Phase III Studies. *The Oncol* 14, 253–263.
- Schmidt, K.T., Chau, C.H., Price, D.K., Figg, W.D., 2016. Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient-Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment: Precision Oncology Medicine. *The Journal of Clinical Pharmacology* 56, 1484–1499.
- Shigematsu, H., 2011. A case of HER-2-positive recurrent breast cancer showing a clinically complete response to trastuzumab-containing chemotherapy after primary treatment of triple-negative breast cancer 6.

- Syn, N.L.-X., Yong, W.-P., Goh, B.-C., Lee, S.-C., 2016. Evolving landscape of tumor molecular profiling for personalized cancer therapy: a comprehensive review. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 12, 911–922.
- Tannock, I.F., Hickman, J.A., 2016. Limits to Personalized Cancer Medicine. *N Engl J Med* 375, 1289–1294.
- Tanyi, J.L., Bobisse, S., Ophir, E., Tuyaerts, S., Roberti, A., Genolet, R., Baumgartner, P., Stevenson, B.J., Iseli, C., Dangaj, D., Czerniecki, B., Semilietof, A., Racle, J., Michel, A., Xenarios, I., Chiang, C., Monos, D.S., Torigian, D.A., Nisenbaum, H.L., Michielin, O., June, C.H., Levine, B.L., Powell, D.J., Gfeller, D., Mick, R., Dafni, U., Zoete, V., Harari, A., Coukos, G., Kandalaft, L.E., 2018. Personalized cancer vaccine effectively mobilizes antitumor T cell immunity in ovarian cancer. *Sci. Transl. Med.* 10, eaa05931.
- Troiani, T., Schettino, C., Martinelli, E., Morgillo, F., Tortora, G., Ciardiello, F., 2008. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 65, 200–211.
- Trounson, A., 2013. Why Stem Cell Research? Advances in the Field, in: *Handbook of Stem Cells*. Elsevier, pp. 1–3.
- Tsimberidou, A.-M., Iskander, N.G., Hong, D.S., Wheeler, J.J., Falchook, G.S., Fu, S., Piha-Paul, S., Naing, A., Janku, F., Luthra, R., Ye, Y., Wen, S., Berry, D., Kurzrock, R., 2012. Personalized Medicine in a Phase I Clinical Trials Program: The MD Anderson Cancer Center Initiative. *Clin Cancer Res* 18, 6373–6383.
- Vaidyanathan, R., Soon, R.H., Zhang, P., Jiang, K., Lim, C.T., 2018. Cancer Diagnosis: From Tumor to Liquid Biopsy and Beyond. *Lab Chip* 10.1039.C8LC00684A.
- Vergati, M., Intrivici, C., Huen, N.-Y., Schlom, J., Tsang, K.Y., 2010. Strategies for Cancer Vaccine Development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1–13.
- Verma, M., 2012. Personalized Medicine and Cancer. *JPM* 2, 1–14.
- Vivarelli, S., Candido, S., Caruso, G., Falzone, L., Libra, M., 2020. Patient-Derived Tumor Organoids for Drug Repositioning in Cancer Care: A Promising Approach in the Era of Tailored Treatment. *Cancers* 12, 3636.
- Wang, Y.A., Sfakianos, J., Tewari, A.K., Cordon-cardo, C., Kyprianou, N., 2020. Molecular tracing of prostate cancer lethality. *Oncogene* 39, 7225–7238.
- Wood-Bouwens, C.M., Haslem, D., Moulton, B., Almeda, A.F., Lee, H., Heestand, G.M., Nadauld, L.D., Ji, H.P., 2020. Therapeutic Monitoring of Circulating DNA Mutations in Metastatic Cancer with Personalized Digital PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics* 22, 247–261.
- Xie, F., Sun, L., Pang, Y., Xu, G., Jin, B., Xu, H., Lu, X., Xu, Y., Du, S., Wang, Y., Feng, S., Sang, X., Zhong, S., Wang, X., Sun, W., Zhao, H., Zhang, H., Yang, H., Huang, P., Mao, Y., 2021. Three-dimensional bio-printing of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine. *Biomaterials* 265, 120416.
- Yuan, H., Myers, S., Wang, J., Zhou, D., Woo, J.A., Kallakury, B., Ju, A., Bazylewicz, M., Carter, Y.M., Albanese, C., Grant, N., Shad, A., Dritschilo, A., Liu, X., Schlegel, R., 2012. Use of Reprogrammed Cells to Identify Therapy for Respiratory Papillomatosis. *N Engl J Med* 367, 1220–1227.

Zhang, B., Birer, S.R., Dvorkin, M., Shruti, J., Byers, L., 2021. New Therapies and Biomarkers: Are We Ready for Personalized Treatment in Small Cell Lung Cancer? American Society of Clinical Oncology Educational Book e276–e285.

Internet

<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/t-cell-transfer-therapy>
(pristupljeno 8.8.21).

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>
(pristupljeno 27.8.2021.)

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/pcr>
(pristupljeno 27.8.2021.)

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor>
(pristupljeno 8.8.2021)

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/xenograft>
(pristupljeno 8.8.2021.)

<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pembrolizumab-high-risk-early-stage-triple-negative-breast-cancer>
(pristupljeno 27.7.2021.)

<https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/treatment-types/adoptive-cell-therapy>
(pristupljeno 8.8.2021)

<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/in-depth/biopsy/art-20043922>
(pristupljeno 27.8.2021.)

<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> (pristupljeno 8.8.2021)

<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/testing-biopsy-and-cytology-specimens-for-cancer/special-tests.html> (pristupljeno 27.8.2021.)

<https://www.jax.org/education-and-learning/clinical-and-continuing-education/cancer-resources/deciding-to-test> (pristupljeno 27.8.2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> (pristupljeno 8.8.2021)

<http://digital-pcr.gene-quantification.info/> (pristupljeno 27.8.2021.)

<https://bcgsc.ca/news/genome-sequencing-helps-prioritize-cancer-treatment-options>
(pristupljeno 6.8.2021.)

<https://www.immunology.org/hela-cells-1951>

(pristupljeno 12.7.2021)

<https://www.erlanger.org/centers-of-excellence/cancer-services/cancer-services/molecular-profiling>

(pristupljeno 27.8.2021.)

<https://www.racgp.org.au/clinical-resources/clinical-guidelines/key-racgp-guidelines/view-all-racgp-guidelines/genomics/chromosome-microarray> (pristupljeno 27.8.2021.)

<https://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/trastuzumab.aspx>

(pristupljeno 29.8.2021.)

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=62675> (pristupljeno 27.8.2021.)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42611257> (pristupljeno 28.8.2021.)

6 ŽIVOTOPIS

Moje ime je Petra Struški, rođena sam 6. travnja 1999. godine u Varaždinu. Osnovnu školu završila sam u Ludbregu te sam zatim upisala Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Prvoj gimnaziji Varaždin. Za vrijeme srednjoškolskog obrazovanja polazila sam fakultativnu nastavu iz mikrobiologije te DSD-a (Deutsches Sprachdiplom) gdje sam položila C1 razinu znanja njemačkog jezika.

2018. godine upisala sam prvu godinu Preddiplomskog studija molekularne biologije na PMF-u u Zagrebu. Za vrijeme studija sudjelovala sam u Erasmus+ projektu PROMISE. U sklopu projekta bila sam na edukacijskim ekspedicijama u Splitu i Parizu. Također, imala sam priliku sudjelovati u Ljetnoj školi znanstvene komunikacije te Bioinformatičkoj školi transkriptomike organiziranim na Mediteranskom institutu za istraživanje života u Splitu.

2021. godine odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za molekularnu biologiju. Tijekom studija trenirala sam u Veslačkom klubu PMF-a te sam volonirala na Noći biologije.