

VANSTANIČNA DNA (cfDNA) KAO BIOMARKER ZA RANU DIJAGNOSTIKU TUMORA

Brlić-Kukoleča, Simona

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:278313>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**VANSTANIČNA DNA (cfDNA) KAO BIOMARKER ZA RANU
DIJAGNOSTIKU TUMORA**
**CELL - FREE DNA (cfDNA) AS A BIOMARKER FOR EARLY TUMOR
DIAGNOSTICS**

SEMINARSKI RAD

Simona Brlić - Kukoleča
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Rosa Karlić

Zagreb, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. POVIJEST ISTRAŽIVANJA cfDNA	2
3. BIOLOGIJA cfDNA.....	3
3.1. Biološke karakteristike cfDNA	3
3.2. Vanstanična mitohondrijska DNA.....	4
3.3. Mehanizam ulaska cfDNA u cirkulaciju.....	4
3.3.1. Slobodni DNA fragmenti	5
3.3.2. DNA u asocijaciji s vezikulama.....	5
3.3.3. DNA – makromolekulski kompleksi	6
3.4. Mehanizam ulaska ctDNA u krvotok	7
3.5. Biološka funkcija ctDNA	9
4. METODOLOGIJE ZA DETEKCIJU ctDNA	10
5. ULOGA ctDNA U DIJAGNOZI I PROGNOZI RAKA	11
5.1. Tekuća biopsija	11
5.2. Identifikacija mjesta nastanka tumora upotrebom ctDNA	12
5.3. Primjena istraživanja ctDNA u hematološkim zloćudnim bolestima	12
6. ULOGA ctDNA U LIJEČENJU RAKA.....	14
6.1. Genotipizacija i personalizirana medicina	14
6.2. Praćenje bolesti i evaluacija liječenja	14
6.3. Ilustracija mehanizama rezistencije na terapiju	15
7. ZAKLJUČAK.....	16
8. LITERATURA	17
9. SAŽETAK.....	28
10. SUMMARY	29

1. UVOD

Klinička istraživanja vezana uz razumijevanje biologije tumora trenutno su područje sve većeg interesa onkologa i molekularnih patologa, a napredak tehnika u molekularnoj biologiji omogućuje personalizirani pristup dijagnostici, prognostici i liječenju malignih bolesti. Istraživanja se sve više temelje na proučavanju slobodnih (vanstaničnih) nukleinskih kiselina, prvenstveno vanstanične DNA (eng. *cell – free DNA*, cfDNA). CfDNA se oslobađa iz normalnih, ali i tumorskih stanica i moguće ju je detektirati u tjelesnim tekućinama, poput krvi.¹

Tumorske stanice u krv oslobađaju cirkulirajuću tumorsku DNA (eng. *circulating tumor DNA – ctDNA*) koja odražava mutacije prisutne u izvornom tumorskom genomu. Primjenama tehnologije sljedeće generacije (eng. *next generation sequencing*, NSG) istraživanje ctDNA postalo je jednostavnije i jeftinije.²

Biopsija tkiva je metoda koja se često koristi za karakterizaciju tumora, a njene mane su to što je učestalost uzorkovanja ograničena te uzorak tkiva ne mora biti reprezentativan za cijeli tumor, bolest se rijetko otkriva u ranoj fazi i komplicirano je procijeniti razvoj bolesti. Upravo se zato pozornost usmjerava na minimalno invazivne metode – tekuće biopsije.³ Tekuće biopsije omogućuju analizu cirkulirajućih tumorskih stanica (eng. *circulating tumor cell*, CTC) i tumorskih DNA u tjelesnim tekućinama poput krvi, urina i likvora.⁴

Promjene detektirane u ctDNA mogu dati širu sliku o primarnim tumorima, ali i o udaljenim metastatskim mjestima. Uz to, ctDNA se može repetitivno uzorkovati radi praćenja odgovora na liječenje, evolucije tumorskog genoma, razvoja bolesti i procjene stjecanja rezistencije na određene lijekove.⁵

2. POVIJEST ISTRAŽIVANJA cfDNA

Vanstanične nukleinske kiseline (eng. *cell – free nucleic acid*, cfNA) prisutne su u tjelesnim tekućinama, a prvi su ih puta opisali Mandel i Métais 1948. godine.⁶ Njihovo otkriće tada nije bilo primijećeno, a nova saznanja o cfNA pojavljuju se gotovo 20 godina kasnije kada su Tan i sur. uočili visoku koncentraciju cfNA u uzorcima krvi pacijenata koji boluju od sistemskog eritemskog lupusa (autoimuna, kronična upalna bolest vezivnog tkiva).⁷ CfNA su također detektirane i u zdravih osoba, a u jednom od ranijih istraživanja ovog područja Steinman je procijenio koncentraciju cfDNA na 10 – 30 ng/mL u zdravih odraslih osoba.⁸

Leon i sur. su otkrili određenu količinu cfDNA kod pacijenata s malignim bolestima i predložili njenu upotrebu kao prognostičkog čimbenika za utvrđivanje učinkovitosti terapije u liječenju raka. Također, kod pacijenata izliječenih od raka detektirana je smanjena koncentracija cfDNA.⁹ Nažalost, u to vrijeme molekularne metode nisu bile dovoljno napredne da bi se cfDNA koristila u tu svrhu, prvenstveno zbog visoke razrjeđenosti u uzorcima koja je teško detektibilna Sangerovom metodom sekvenciranja.¹⁰

Prve primjene cfDNA ne nalazimo u onkologiji, već u prenatalnoj dijagnostici. Naime, Lo i sur. su 1997. otkrili cirkulirajuću fetalnu DNA (eng. *cell-free fetal DNA*, cffDNA) u majčinoj plazmi koja sadrži Y – kromosom specifične DNA frakcije i RhD (Rhesus D), što je otvorilo vrata novim neinvazivnim tehnikama u prenatalnoj dijagnostici.¹¹ Razvojem tehnika sekvenciranja sljedeće generacije, 2015. godine omogućeno je određivanje aneuploidija iz cffDNA, a danas je mogućnost neinvazivnog otkrivanja trisomije 21. kromosoma postala široko dostupna.¹² Također, NGS se koristi za otkrivanje drugih trisomija, subkromosomskih aberacija pa čak i za monogenске poremećaje. Primjena cffDNA u prenatalnom testiranju potaknula je interes znanstvenika i liječnika koji se bave onkologijom, kardiovaskularnim bolestima itd.¹³

3. BIOLOGIJA cfDNA

3.1. Biološke karakteristike cfDNA

CfDNA je visoko fragmentirana molekula, veličine između 80 i 200 bp¹⁴, iako postoje iznimke veličine od 300 – 450 bp, a 90% ukupne cfDNA pripada skupini molekula niske molekulske mase.¹⁰ Podrijetlo cfDNA nije u potpunosti istraženo, ali postoje mnogi mehanizmi kojima DNA može ući u cirkulaciju. Fragmenti cfDNA sadrže signale specifične za tkivo ili stanicu iz koje potječu. Analizom signalnih faktora, dokazano je da je cfDNA u krvnoj plazmi pretežito limfoidnog i mijeloidnog podrijetla¹⁵, što je u skladu s činjenicom da je glavni izvor cfDNA apoptoza hematopoetskih stanica.¹⁶

Kod onkoloških pacijenata, glavni dio cfDNA nastaje apoptozom i nekrozom tumorskih stanica, a oslobađanje cfDNA iz nekrotičnih stanica događa se isključivo tijekom fagocitoze.¹⁷ CfDNA u osoba koje boluju od raka sadrži, uz DNA koja potječe iz normalnih zdravih stanica, i DNA koja potječe iz tumorskih stanica, a naziva se ctDNA.¹⁸

Rane studije pokazale su da ctDNA posjeduje mnoge molekularne karakteristike povezane s rakom, kao što su mononukleotidne mutacije, promjene metilacije i virusne sekvence¹⁵, međutim mnoge biološke karakteristike ctDNA ostaju nejasne. Primjer je veličina fragmenata ctDNA za koju neki znanstvenici smatraju da je duža od odgovarajuće cfDNA zdravih stanica, dok se drugi znanstvenici tome protive. Takve nesuglasice mogu se objasniti razlikama u primijenjenim metodama i spektru uzoraka korištenih u analizi.¹⁹

U nedavnoj studiji Jiang i sur. otkrili su da plazma pacijenata s rakom jetre sadrži vrlo kratke fragmente molekule DNA koji često sadrže aberacije broja kopija specifične za tumore.²⁰ Madhavan i sur. izvijestili su o sličnom fenomenu u bolesnika s rakom dojke. Ove studije sugeriraju da je ctDNA kraća od odgovarajuće cfDNA.²¹

3.2. Vanstanična mitohondrijska DNA

Mitohondriji imaju središnju ulogu u proizvodnji energije, proliferaciji stanica i programiranoj staničnoj smrti – apoptozi. Mitohondrijski genom sastoji se od 100 – 10000 kopija kružnih molekula DNA veličine oko 17 kb, a kodira 37 gena; za 13 polipeptida respiratornog lanca, 22 transportne RNA (tRNA) i 2 ribosomske RNA (rRNA).²²

Pri analizi vanstanične mitohondrijske DNA (eng. *cell – free mitochondrial DNA*, cf – mtDNA) trebalo bi uzeti u obzir strukturne razlike između mitohondrijske i genomske DNA. Budući da je mitohondrijska DNA (eng. *mitochondrial DNA*, mtDNA) mala molekula koja nije asocirana s histonima, cf – mtDNA strukturno se razlikuje od genomske cfDNA, a čak se i fragmenti cf – mtDNA međusobno vrlo razlikuju. Veličina cf – mtDNA u biološkim tekućinama kreće se od 30 do 80 bp.²³

3.3. Mehanizam ulaska cfDNA u cirkulaciju

Jedan od načina na koji cfDNA ulazi u cirkulaciju je posredovan neutrofilima. Neutrofili izazivaju imunološki odgovor oslobađanjem neutrofilnih vanstaničnih zamki (eng. *neutrophil extracellular traps – NETs*) koje mogu 'zarobiti' i eliminirati razne patogene.²⁵ To su ekstracelularne mrežaste strukture koje se sastoje od nuklearnih (jezgrinih) i mitohondrijskih DNA fragmenata u asocijaciji s raznim proteinima poput histona i proteaza.²⁴ Uočena je povezanost u koncentraciji NETs – a i cfDNA, što potvrđuje da DNA oslobođena tijekom formiranja NETs – a doprinosi ukupnosti cfDNA u cirkulaciji.²⁵

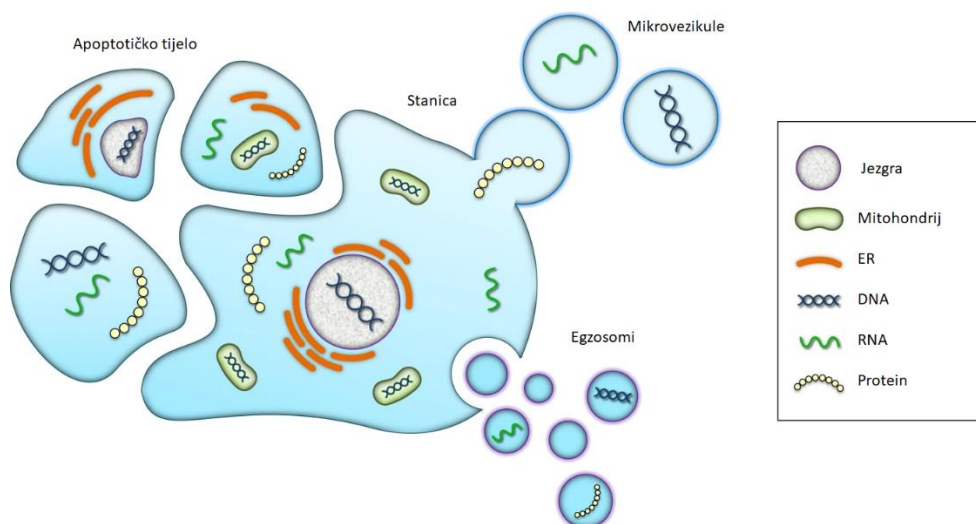
Drugi način na koji se DNA oslobađa u cirkulaciju je aktivni prijenos nosivih kompleksa DNA pomoću vezikula i lipoproteonukleotidnih kompleksa. Ovisno o obliku u kojem se nalaze u cirkulaciji razlikujemo: slobodne DNA fragmente, DNA u asocijaciji s vezikulama i DNA – makromolekulske komplekse.²⁶

3.3.1. Slobodni DNA fragmenti

Slobodni DNA fragmenti su gole sekvence DNA koje nisu asocirane s proteinima ili vezane na površinu stanice. Tijekom stanične smrti, genomska DNA se cijepa i ulazi u cirkulaciju, ali samo je DNA koja je asocirana s proteinima otporna na cijepanje nukleazama, dok se slobodni fragmenti DNA cijepaju i potpuno gube u tjelesnim tekućinama.²⁰

3.3.2. DNA u asocijaciji s vezikulama

Nukleinske kiseline mogu biti sadržane u vezikulama (eng. *extracellular membrane vesicles* – EMVs) što ih štiti od razgradnje.²⁷ Ove membranske strukture posreduju u međustaničnoj komunikaciji. Na temelju veličine i podrijetla dijele se na egzosome, mikrovezikule i apoptotična tijela (Slika 1). Vezikule se mogu osloboditi i iz zdravih i iz tumorskih stanica. EMV – i koji se oslobađaju iz tumorskih stanica sadrže različite onkogene čimbenike u obliku onkoproteina i nukleinskih kiselina pa su stoga nazvani onkosomi. Unosom onkosoma u stanicu (prepoznavanjem specifičnih receptora na membrani onkosoma i staničnoj membrani) onkogeni čimbenici mogu prenijeti fenotip tumorskih stanica u zdravu stanicu.²⁸



Slika 1 Shematski prikaz nastanka ekstracelularnih membranskih vezikula (EMV) na temelju veličine i podrijetla. EMV se dijele na egzosome (40 - 100 nm), mikrovezikule (50 - 3000 nm) i apoptotička tijela (800 - 5000 nm).

(Preuzeto i prilagođeno prema <https://www.nature.com/articles/s41431-018-0132-4/figures/2>)

Poput genomske DNA, mtDNA se također može prenositi pomoću EMV, a zanimljivo je da EMV može sadržavati i potpuni mitohondrijski genom koji prijenosom u stanicu s defektnim metabolizmom može vratiti njenu metaboličku aktivnost. S druge strane, takav horizontalni prijenos mtDNA pomoću EMV – a može aktivirati latentne tumorske stanice i prouzrokovati rezistenciju na određene lijekove.²⁹

Varijacije broja kopija mtDNA povezane su s raznim bolestima, uključujući dijabetes tipa 2, fibrilaciju atrija i rak (rak dojke, pluća i debelog crijeva), a te se promjene mogu analizirati pomoću cf – mtDNA zbog čega ova molekula ima potencijal kao biomarker u dijagnostici određenih bolesti.³⁰

3.3.3. DNA – makromolekulski kompleksi

Cirkulirajući nukleosomi su DNA – proteinski kompleksi nastali cijepanjem kromosomske DNA tijekom apoptoze (programirane stanične smrti).³¹ To su fragmenti dsDNA (dvolančana DNA, eng. *double stranded DNA*) veličine od 180 do 200 bp omotani oko oktamernog histonskog kompleksa. Nukleosomi su međusobno povezani s *linker* DNA, a niz koji je omotan oko oktamernog kompleksa dugačak je 147 bp.²⁵ DNA koja je izravno vezana na nukleosome zaštićena je od razgradnje nukleazama pa se stoga u cirkulaciji javlja u obliku mono – i oligo – nukleosoma.³²

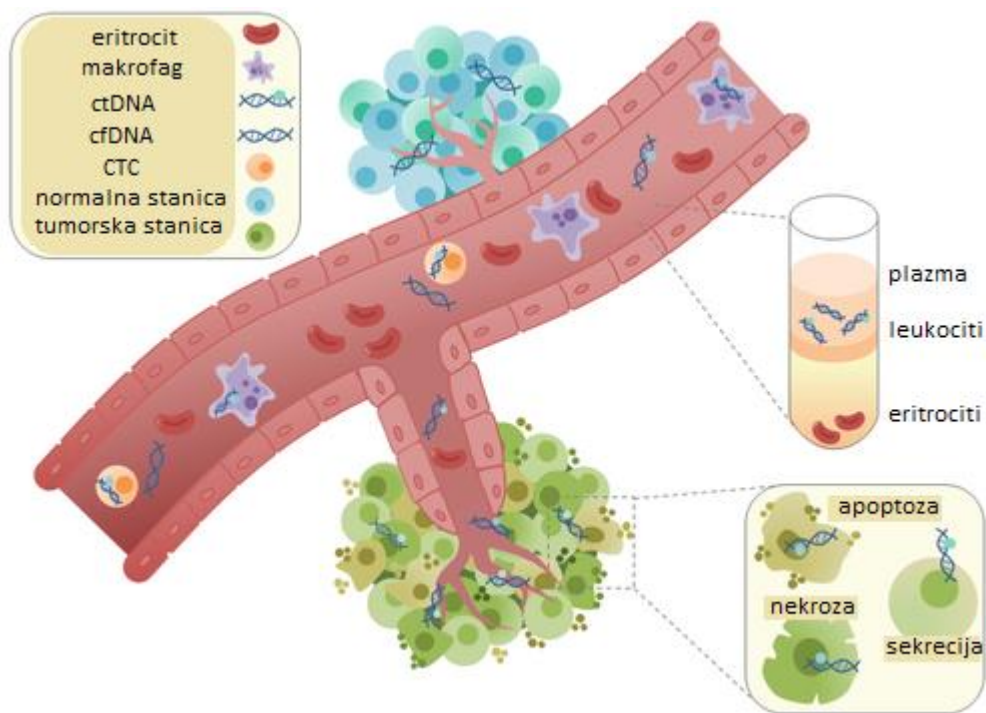
Uočeno je da razmak između nukleosoma varira od tkiva do tkiva, odnosno specifičan je za određene tipove stanica, ovisno o ekspresiji gena specifičnoj za tkivo. Uzrok tome je položaj nukleosoma – nalaze se vrlo blizu početka transkripcije, na mjestima vezanja transkripcijskih faktora na DNA. Upravo zato je DNA zaštićena od cijepanja nukleazama tijekom apoptoze, što rezultira specifičnim uzorkom fragmentacije ili 'otiskom' transkripcijskog faktora iz čega možemo saznati od kojeg tkiva potiče cfDNA od interesa.²⁰

Postoje i makromolekulski kompleksi građeni od DNA i lipoproteina, a nazivamo ih virtosomima. Lipoproteini vezani u virtosomima štite nukleinske kiseline od razgradnje nukleazama. Nukleinske kiseline, proteini i lipidi sadržani u ovim kompleksima su novosintetizirane molekule koje se sintetiziraju u približno isto vrijeme. Nedugo nakon sinteze, aktivno se oslobađaju iz živih stanica i smatra se da igraju ulogu u

međustaničnoj komunikaciji. Virtosomi mogu ući u stanice i ugraditi vlastitu DNA u genom stanice te na taj način promijeniti biologiju stanice. To uključuje različite imunološke modifikacije ili transformaciju normalnih stanica u tumorske.²⁵

3.4. Mehanizam ulaska ctDNA u krvotok

Iako je postojanje ctDNA općeprihvaćeno, mehanizmi kojima tumorska DNA ulazi u krvotok nisu potpuno razjašnjeni. Predloženo je da postoje tri potencijalna podrijetla ctDNA: apoptotične ili nekrotične tumorske stanice, žive tumorske stanice i tumorske stanice u cirkulaciji (Slika 2).³³



Slika 2 U uzorku seruma i plazme krvi nalaze se cfDNA i ctDNA, kao i CTC. Shematski je prikazan i mehanizam oslobađanja ctDNA u krvotok: apoptozom, nekrozom i aktivnim oslobađanjem iz tumorskih stanica (sekrecija).

(Preuzeto i prilagođeno prema https://www.biochain.com/wp-content/uploads/2018/08/CtDNA_in_circulation.png)

Nekoliko je prethodnih studija izvijestilo da su veličine fragmenata ctDNA oko 166 bp, slično onima koje oslobađaju tipične apoptotične stanice.³⁴ Općeprihvaćeno je da deregulacija proteolitičkih aktivnosti uključena u apoptozu može dovesti do otpuštanja DNA ili nukleosoma u cirkulaciju.³⁵

Roth i sur. otkrili su da promjene u deregulaciji proteolitičkih aktivnosti povezanih s apoptozom koreliraju s povišenom koncentracijom DNA u krvi, stoga cirkulirajući nukleosomi značajno doprinose koncentraciji DNA u krvi pacijenata i zdravih ispitanika.³⁶ Na temelju ovih saznanja, apoptotične stanice mogu otpustiti ctDNA u obliku nukleosoma. Iako je većina oslobođenih nukleosoma probavljena makrofazima, ovaj eliminacijski sustav može biti preopterećen ili oslabljen kod rapidnog napredovanja tumora i povećane stanične smrti, što rezultira visokom koncentracijom nukleosoma koji ulaze u krvotok.³⁷ Osim toga, uočeno je da oboljeli od raka s velikim brojem nekrotičnih tumorskih stanica u uznapredovalom stadiju imaju više ctDNA u plazmi od pacijenata u ranom stadiju. Ovi podaci podupiru mišljenje da su apoptotične ili nekrotične tumorske stanice vjerojatno glavno podrijetlo ctDNA.³⁸

Međutim, osobe oboljele od raka u ranoj fazi također sadrže ctDNA u plazmi pa je vjerojatno da apoptotične ili nekrotične tumorske stanice nisu jedini izvor ctDNA.³⁹ *In vitro* studije otkrile su da žive tumorske stanice, poput limfocita, mogu kontinuirano i automatski oslobađati DNA, što bi moglo objasniti prisutnost detektibilne ctDNA u pacijenata s ranim stadijem raka.⁴⁰ Osim toga, količina ctDNA raste s rastom tumora, što dodatno podupire hipotezu da bi se ctDNA mogla oslobađati iz živih tumorskih stanica.⁵ Dokazi također podržavaju treći scenarij, u kojem se DNA oslobađa iz CTC - a. Dokazano je da ctDNA i CTC sadrže identične genetske mutacije. Također, CTC može izbjeći probavu makrofazima i lako ući u krv. Također se sugerira da krv koja sadrži CTC također sadrži ctDNA. Ova istraživanja podržavaju mišljenje da bi CTC mogao biti još jedan izvor ctDNA, ali budući da periferna krv sadrži vrlo mali broj CTC – a, ctDNA iz CTC – a vjerojatno nije glavni izvor ctDNA.³⁸

3.5. Biološka funkcija ctDNA

Općenito, metastaze predstavljaju krajnje produkte invazije primarnih tumora koji se putem tjelesnih tekućina prenose na udaljena mjesta u tijelu.⁴¹

Međutim, ova je teorija sve manje prihvaćena posljednjih desetljeća zbog činjenice da postoje brojni dokazi da bi ctDNA mogla odigrati ključnu ulogu u metastaziranju raka putem onkogene transformacije zdravih stanica.⁴²

Godine 1999. García – Olmo i sur. pokazali su da plazme štakora koji nose tumore mogu stabilno transformirati normalne stanice uzgojene *in vitro* i po prvi put je predložena hipoteza o genomastazi: „Metastaze se mogu pojaviti transfekcijom osjetljivih stanica, smještenih u udaljenim ciljnim organima, s dominantnim onkogenima koji potječu iz primarnih tumora i cirkuliraju u plazmi ”.⁴³

Nastavno na ovu hipotezu, serum pacijenata oboljelih od raka i supernatant ljudskih stanica raka također su mogli inducirati *in vitro* staničnu transformaciju i tumorigenezu, dok se taj proces nije dogodio ako se u serumu i supernatantima uklonila DNA.⁴⁴

U kasnijim studijama García – Olmo i sur. otkriveno je u neliječenih štakora koji nose tumor, kao i u kirurški liječenih, da je hematogeno širenje tumora uže povezano s ctDNA nego s CTC – ima. Na štakorima je također pokazano da je za stvaranje tumora bitna ne samo infekcija tumorskih stanica, već i regrutiranje stanica domaćina.⁴⁵

Nadalje, Roth i sur. otkrili su prisutnost udaljenih metastaza povezanih sa značajnim povećanjem razine DNA. Njihovi su nalazi također podržali prethodna zapažanja Diehla i sur. koja su sugerirala da se sa širenjem tumora kroz crijeva na udaljena mjesta broj molekula ctDNA postupno povećavao.³⁶

Zanimljivo je da se ctDNA može horizontalno prenijeti između tumorskih i normalnih stanica putem apoptotičkih tijela ili virtosoma, što rezultira udaljenim metastazama.⁴⁶

Sumarno ovi podaci ukazuju na to da ctDNA ima svojstva potrebna za integraciju vlastitog genoma u zdrave stanice, a samim time i onkogenu transformaciju stanica.

Sve je više prihvaćena hipoteza o genomastazi kao razumnom objašnjenju za metastaze raka. Međutim, trenutne studije još uvijek ne odgovaraju na sva pitanja i ne pružaju potpunu sliku o metastaznoj funkciji ctDNA, prvenstveno zbog malog broja istraživanja *in vivo*, pogotovo u kliničkoj praksi.⁴⁴

4. METODOLOGIJE ZA DETEKCIJU ctDNA

Detekcija ctDNA u plazmi nije samo prikladna za proučavanje patogeneze raka, već je i korisna za kliničko liječenje raka. Budući da se pokazalo da ctDNA posjeduje karakteristične mutacije odgovarajućeg primarnog tumora, znanstvenici su pokušali iskoristiti ovu značajku u osmišljavanju testova koji se mogu koristiti u liječenju raka. Međutim, testovi temeljeni na ctDNA suočavaju se s nekoliko izazova. Ne samo da ctDNA čini samo mali postotak (ponekad i manje od 0,01%) ukupne vanstanične DNA u perifernoj krvi, već je potrebno imati i prethodno znanje o pojedinim mutacijama koje su često nepoznanica.³⁹

U početku su znanstvenici koristili Sangerovo sekvenciranje za otkrivanje ctDNA u plazmi. Međutim, postoje mnogi nedostaci za Sangerovu detekciju ctDNA, poput niske protočnosti, zahtjevnih protokola, visoke cijene i potencijalne pristranosti uvedene PCR metodologijom.⁴⁷ U posljednjem desetljeću, napredak NGS tehnologije omogućio je znanstvenicima da razviju mnoge učinkovite i prikladne alternative Sangerovom sekvenciranju. Diehl i sur. su razvili tehniku pod nazivom BEAMing (eng. *beads, emulsion, amplification, magnetics*, BEAM) za otkrivanje ctDNA u krvi. Ovom tehnikom, segment DNA se umnožava pomoću *primera* koji sadrže poznate sekvence DNA, a zatim se takav slijed nukleotida kovalentno veže na magnetske kuglice, a protočnom se citometrijom sortiraju kuglice koje sadrže određenu mutaciju.⁴⁸

Newman i sur. razvili su drugu tehniku za kvantificiranje ctDNA pod nazivom CAPP – seq. (eng. *cancer personalized profiling by deep sequencing*) Dizajnirali su probu koja se sastoji od biotiniziranih DNA oligonukleotida koji se vežu na ponavljajuće mutirane regije u DNA od interesa. Koristeći ovu tehniku, otkrili su ctDNA u 100% pacijenata sa stadijem II – V i u 50% pacijenata sa stadijem I ne – mikrocelularnog raka pluća (eng. *non – small – cell lung carcinoma*, NSCLC), s maksimalno 96% specifičnosti za mutirane frakcije alela.⁵

U usporedbi s prethodnim metodama, tehnike NGS pružaju značajno veću osjetljivost pri detekciji ctDNA, a uz to su automatizirane i jeftinije. Međutim, i ove tehnike imaju određene nedostatke i ograničenja poput mogućnosti dijagnosticanja raka u samo oko 50% pacijenata u ranoj fazi, što ukazuje da osjetljivost ovih metoda zahtjeva dodatna poboljšanja. Osim toga, troškovi su i dalje relativno visoki što ograničava primjenu ovih metoda u kliničkoj praksi. Daljnjim napretkom u znanosti ova primjena

detekcije ctDNA ima potencijal za ubrzavanje otkrivanja bolesti i prilagodbu terapije raka.³⁹

5. ULOGA ctDNA U DIJAGNOZI I PROGNOZI RAKA

5.1. Tekuća biopsija

Biopsija tkiva i dalje je zlatni standard za dijagnosticiranje tumora. Međutim, postoje mnogi nedostaci. Na primjer, postoje rizici povezani s invazivnim uzorkovanjem, osobito ako se primjenjuju na krhke organe poput pluća, a osjetljivost je suboptimalna, što često dovodi do nemogućnosti otkrivanja tumora u ranoj fazi.

Osim toga, budući da su tumori heterogeni i stalno se razvijaju, ispitivanja temeljena na biopsiji tkiva često ne mogu točno odrediti progresiju tumora.⁴⁹

Smatra se da pristup temeljen na biomarkerima u plazmi može procijeniti pojavu tumora i njegovu progresiju, a takav pristup je minimalno invazivan.

Međutim, već poznati biomarkeri tumora u plazmi osiguravaju samo ograničenu osjetljivost i specifičnost te stoga ne mogu uvijek zadovoljiti kliničke zahtjeve.⁵⁰

Tekuća biopsija temeljena na ctDNA superiorna je u odnosu na prethodne biomarkere zbog osjetljivosti i kliničke korelacije. AFP, CEA, PSA i CA15-3 su biomarkeri proteina plazme koji se obično koriste u kliničkom liječenju. Međutim, pozitivan udio pacijenata za ove biomarkere obično je između 50 i 70% u pacijenata s rakom, a ovi se biomarkeri također nalaze i u serumu zdravih osoba, ali u nižim koncentracijama.⁵¹ Dawson i sur. analizirali su ctDNA, CTC i CA15-3 u 30 pacijenata s metastatskim rakom dojke i otkrili da je stopa detekcije ctDNA dosegla 97%, dok su stope za CTC i CA15-3 bile samo 78%, odnosno 87%.⁵² Bettegowda i sur., u studiji na 206 pacijenata s metastatskim rakom, otkrili su da je osjetljivost detekcije ctDNA 87,2%. U daljnjim studijama, ctDNA i CTC testirani su kod 16 pacijenata s rakom, čime se pokazalo da je 13 pacijenata koji su bili ctDNA – pozitivni bilo CTC – negativno. Kod tri pacijenta s ctDNA i CTC pozitivnim testom detektirano je 50 puta više ctDNA od DNA dobivene iz CTC-a. Ove studije zajedno pokazuju da je ctDNA osjetljivija od biomarkera proteina plazme i CTC – a.³⁸

Važno je da poluvrijeme raspada ctDNA iznosi manje od 2 sata, dok vrijeme poluraspada proteinskih markera u plazmi može biti do nekoliko tjedana. To znači da

ctDNA može točnije odražavati sliku tumora u stvarnom vremenu u pacijenata koji primaju terapiju. Znanstvenici su testirali uzorke krvi različitih pacijenata s rakom i otkrili da je ctDNA prisutna u značajno različitim koncentracijama među pacijentima s različitim stadijima raka. Točnije, bolesnici s uznapredovalim stadijima raka želuca, jednjaka, gušterače, dojke i kolorektalnog karcinoma imali su višu razinu ctDNA od pacijenata u ranim fazama tih bolesti.⁵³ Studije Garcia – Murillas i sur. imaju slične rezultate.⁵⁴ Stoga ctDNA ima potencijal u procjeni progresije tumora i prognoze bolesti, tekuća biopsija temeljena na analizi ctDNA mogla bi predstavljati sljedeću generaciju dijagnostičkih i prognostičkih ispitivanja tumora zbog visoke točnosti i osjetljivosti.

5.2. Identifikacija mjesta nastanka tumora upotrebom ctDNA

Analiza metilacije DNA može se primijeniti na ctDNA kako bi se otkrile specifične promjene u uzorku metilacije karakteristične za rak pomoću metilacijsko – specifičnog PCR – a, mikroraspada ili sekvenciranja.^{17, 55, 56}

Primjer je otkrivanje stupnja metilacije gena, poput BRCA1 kod raka dojke.⁵⁷ Također, analiza metilacije ctDNA može se koristiti za određivanje tkiva odnosno određivanje tipa stanica iz kojih sama DNA potječe te se na taj način mogu dobiti informacije o dinamici tkiva u različitim bolestima.⁵⁸

Ova tehnika ima veliki potencijal u onkologiji za određivanje podrijetla tkiva kod raka s nepoznatim ishodištem ili za identifikaciju podtipova tumora. Nažalost, nedostatak ovih metoda je to što zahtijevaju visoku frakciju tumorske DNA.⁵⁹

5.3. Primjena istraživanja ctDNA u hematološkim zloćudnim bolestima

Prednosti analize ctDNA u tjelesnim tekućinama osoba oboljelih od raka dovele su do masovnih istraživanja ctDNA u hematološkim zloćudnim bolestima. Vrijednost analize ctDNA prvi put je prikazana u hematološkim karcinomima 1994. godine, kada su identificirane specifične NRAS mutacije prisutne u plazmi pacijenata s mijelodisplazijom i akutnom mijeloičnom leukemijom.⁶⁰ Tijekom posljednjih nekoliko godina istraživanja u tom području brzo su se proširila, a mnogi znanstvenici istražuju

ulogu ctDNA u procjeni rizika i praćenju tumorskog opterećenja te odgovora na liječenje kod limfoidnih pa tako i mijeloidnih malignih bolesti.⁶¹

U liječenju limfoma, analiza ctDNA specifična za pacijenta mogla bi se koristiti za praćenje MRD – a (eng. *minimal residual disease*) i određivanje terapije. U ne – Hodgkinovom limfomu, pacijentova specifična raspodjela IgH lako se može otkriti analizom ctDNA.⁶² Osim toga, opsežna analiza ctDNA pacijenata s limfomom pojavila se kao važno kliničko oruđe kojim se mogu identificirati različiti biološki podtipovi i dati uvid u obrasce genomske evolucije tijekom liječenja.⁶³ Paralelno, nekoliko je studija pokazalo da analiza ctDNA omogućuje opsežniju genomsku karakterizaciju Hodgkinovog limfoma, bolesti koju je tradicionalno bilo teško proučavati zbog relativno male frakcije Hodgkin/Reed – Sternberg stanica u biopsijama tumora.⁶⁴

Korištenje ctDNA za praćenje bolesti nedavno je pokazano i kod kronične limfocitne leukemije (eng. *chronic lymphocytic leukemia*, CLL). Kod CLL – a, analiza ctDNA može otkriti progresiju bolesti u svim dijelovima tkiva, uključujući koštanu srž i limfne čvorove. Uz to, serijska analiza ctDNA kod CLL – a može omogućiti praćenje klonske dinamike i identificirati genomske promjene povezane s Richterovim sindromom.⁶⁵ Analiza ctDNA također je moćno oruđe u pacijenata s mijeloidnim zloćudnim bolestima, osobito mijelodisplastičnim sindromima⁶⁶ te onima s poremećajima plazma stanica, poput multiplog mijeloma.⁶⁷ Potencijal ovih pristupa u kontroli bolesti je nemjerljiv i nesumnjivo je da će se kliničke primjene proširiti na cijeli spektar hematoloških zloćudnih bolesti.

6. ULOGA ctDNA U LIJEČENJU RAKA

6.1. Genotipizacija i personalizirana medicina

Genotipizacija je usmjerena na analizu genskih mutacija i ima važnu primjenu u liječenju raka. Smatra se da genotipizacija ima potencijal odigrati ključnu ulogu u preciznoj medicini, osobito u preciznoj imunoterapiji, olakšavajući razvoj novih terapijskih protokola temeljenih na poznatim ili nepoznatim ključnim genskim mutacijama.⁶⁸ Na primjer, u strategijama precizne imunoterapije, znanstvenici mogu potencijalno otkriti antigene koji izazivaju snažne imunološke odgovore upravo prema podacima dobivenim genotipizacijom, a zatim prilagoditi T stanice kako bi mogle ciljati nove antigene.⁶⁹

U dosadašnjoj kliničkoj praksi genotipizacija se provodi pomoću DNA dobivene biopsijom tkiva. Međutim, biopsijom tkiva možemo dobiti samo lokalne informacije o tumoru, ali to ne odražava i cjelokupnu sliku tumora zbog njegove heterogenosti i stalne evolucije.⁷⁰ CtDNA analiza prevladava ove prepreke odražavajući genetske mutacije cijelog tumorskog tkiva. Dodatno, ctDNA istih pacijenata u različitim fazama bolesti može se koristiti za dinamičko praćenje genskih mutacija tijekom progresije raka.⁷¹ Stoga tekuća biopsija na temelju analize ctDNA poboljšava genotipizaciju tumora i ciljanu terapiju raka, što je veliki napredak u području personalizirane medicine.

6.2. Praćenje bolesti i evaluacija liječenja

Rak se često vraća i razvija tijekom liječenja. Praćenje bolesti i procjena procesa liječenja važni su za liječnike kako bi mogli prilagoditi naknadne protokole liječenja. Serijsko detektiranje ctDNA može poslužiti za procjenu učinkovitosti liječenja, procjenu remisijskog stanja te otkrivanje progresije raka.⁷²

Koristeći ctDNA, stope detekcije među bolesnicima sa stadijem raka I, II, III i IV bile su 47, 55, 69 i 82%, što ukazuje na to da se razina ctDNA povećava s progresijom raka.³⁸ Osim toga, Diehl i sur. otkrili su da se kod većine pacijenata nakon operacije značajno smanjila koncentracija ctDNA. Daljnje studije sugeriraju da se kod svih pacijenata s detektibilnom ctDNA nakon operacije nastavila razvijati bolest, dok su oni bez detektibilne ctDNA nakon operacije ostali u remisiji.⁴⁸ Reinert i sur. pokazali su da

detekcijom ctDNA postoji prednost od 10 mjeseci nad konvencionalnim metodama u predviđanju razvoja bolesti i ishoda terapije.⁷³

6.3. Ilustracija mehanizama rezistencije na terapiju

Otpornost na terapiju glavni je uzrok neuspjeha u liječenju raka. Međutim, do sada odgovarajuće metode ispitivanja rezistencije tumora još nisu uspostavljene.⁷⁴

Nedavno su studije o ctDNA potencijalno pružile novi napredak u ovom području. Diaz i sur. analizirali su ctDNA pacijenata s karcinomom pluća koji su bili podvrgnuti liječenju inhibitorom EGFR i pronašli su 42 mutacije gena KRAS, za koje je poznato da su markeri rezistencije na terapiju. Daljnje studije pokazale su da bi ova metoda mogla osigurati dodatnih 5 mjeseci vremena u otkrivanju razvoja tumora i otpornosti u usporedbi s konvencionalnim metodama.⁷⁵ Osim toga, Murtaza i sur. prikupili su uzorke krvi šest pacijenata s uznapredovalim stadijem raka dojke, raka pluća i raka jajnika te izvršili sekvenciranje cijelog egzoma. Otkrili su česte mutacije u genima uključenim u puteve relevantne za razvoj rezistencije na terapiju. Na primjer, otkrili su mutacije koje su blokirale vezanje lijeka za njegove biološke akceptore, stoga se smatra da analiza ctDNA može koristiti za praćenje evolucije raka i ilustriranje mehanizama rezistencije na terapiju.⁷²

7. ZAKLJUČAK

Nedavni napredak u razumijevanju biologije i kliničke primjene ctDNA, vrste vanstanične DNA (cfDNA) koja se oslobađa iz tumorskih stanica, osigurao je dokaze da upotreba ctDNA u tekućoj biopsiji može poboljšati dijagnozu i liječenje raka putem genotipizacije, praćenja bolesti, evaluacije liječenja itd.

Međutim, još uvijek postoje neki izazovi koje treba nadvladati kako bi se ova tehnika mogla primjenjivati u rutinskoj kliničkoj praksi. Za upotrebu ctDNA kao dijagnostičkog markera važno je bolje razumjeti biološke karakteristike ctDNA, uključujući njezinu veličinu, postojeći oblik i mehanizme pomoću kojih se ctDNA oslobađa u krvotok. Osim toga, iako su kliničke analize ctDNA provjerene, usvajanje ove tehnike u rutinsku kliničku praksu još uvijek mora dokazati njezinu analitičku valjanost, kliničku valjanost i, što je najvažnije, kliničku korisnost s obzirom na suboptimalnu osjetljivost metoda za detekciju ctDNA i ograničene količine uzoraka. Ovi izazovi ukazuju na to da će trebati neko vrijeme da se analiza ctDNA uvede u kliničku praksu. Međutim, kako se tehnologije sekvenciranja brzo razvijaju, a razumijevanje biologije ctDNA i klinički potencijal produbljuju, čini se da je upotreba ctDNA u kliničkoj praksi neupitna.⁷⁶

8. LITERATURA

¹ Stewart, C.M., Kothari, P.D., Mouliere, F., Mair, R., Somnay, S., Benayed, R., Zehir, A., Weigelt, B., Dawson, S.J., Arcila, M.E. and Berger, M.F., 2018. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *The Journal of pathology*, 244(5), pp.616-627.

² Garcia, J., Dusserre, E., Cheynet, V., Bringuier, P. P., Brengle-Pesce, K., Wozny, A. S., ... & Couraud, S., 2017. Evaluation of pre-analytical conditions and comparison of the performance of several digital PCR assays for the detection of major EGFR mutations in circulating DNA from non-small cell lung cancers: the CIRCAN_0 study. *Oncotarget*, 8(50), pp.87980.

³ Cohen, J.D., Javed, A.A., Thoburn, C., Wong, F., Tie, J., Gibbs, P., Schmidt, C.M., Yip-Schneider, M.T., Allen, P.J., Schattner, M. and Brand, R.E., 2017. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(38), pp.10202-10207.

⁴ Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. and Bardelli, A., 2017. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(9), pp.531-548.

⁵ Newman, A.M., Bratman, S.V., To, J., Wynne, J.F., Eclov, N.C., Modlin, L.A., Liu, C.L., Neal, J.W., Wakelee, H.A., Merritt, R.E. and Shrager, J.B., 2014. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine*, 20(5), pp.548-554.

⁶ Mandel, P., 1948. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez 1 homme. *CR Seances Soc Biol Fil*, 142, pp.241-243.

⁷ Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I. and Kunkel, H.G., 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, 45(11), pp.1732-1740.

⁸ Steinman, C.R., 1975. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *The Journal of clinical investigation*, 56(2), pp.512-515.

⁹ Leon, S.A., Green, A., Yaros, M.J. and Shapiro, B., 1975. Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *Journal of immunological methods*, 9(2), pp.157-164.

¹⁰ Volik, S., Alcaide, M., Morin, R.D. and Collins, C., 2016. Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Molecular Cancer Research*, 14(10), pp.898-908.

¹¹ Lo, Y.D., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W. and Wainscoat, J.S., 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The lancet*, 350(9076), pp.485-487.

¹² Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., Haddow, J.E., Neveux, L.M., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A.T., Deciu, C., Grody, W.W. and Nelson, S.F., 2011. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genetics in medicine*, 13(11), pp.913-920.

¹³ Tong, Y.K. and Lo, Y.D., 2006. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica chimica acta*, 363(1-2), pp.187-196.

¹⁴ Duque-Afonso, J., Waterhouse, M., Pfeifer, D., Follo, M., Duyster, J., Bertz, H. and Finke, J., 2018. Cell-free DNA characteristics and chimerism analysis in patients after allogeneic cell transplantation. *Clinical biochemistry*, 52, pp.137-141.

¹⁵ Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M. and Shendure, J., 2016. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*, 164(1-2), pp.57-68.

¹⁶ Lui, Y.Y., Chik, K.W., Chiu, R.W., Ho, C.Y., Lam, C.W. and Lo, Y.D., 2002. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical chemistry*, 48(3), pp.421-427.

¹⁷ Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D. and Knippers, R., 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4), pp.1659-1665.

¹⁸ Chan, K.A., Jiang, P., Zheng, Y.W., Liao, G.J., Sun, H., Wong, J., Siu, S.S.N., Chan, W.C., Chan, S.L., Chan, A.T. and Lai, P.B., 2013. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clinical chemistry*, 59(1), pp.211-224.

¹⁹ Wang, B.G., Huang, H.Y., Chen, Y.C., Bristow, R.E., Kassaei, K., Cheng, C.C., Roden, R., Sokoll, L.J., Chan, D.W. and Shih, I.M., 2003. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer research*, 63(14), pp.3966-3968.

²⁰ Jiang, P., Chan, C.W., Chan, K.A., Cheng, S.H., Wong, J., Wong, V.W.S., Wong, G.L., Chan, S.L., Mok, T.S., Chan, H.L. and Lai, P.B., 2015. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), pp.E1317-E1325.

²¹ Madhavan, D., Wallwiener, M., Bents, K., Zucknick, M., Nees, J., Schott, S., Cuk, K., Riethdorf, S., Trumpp, A., Pantel, K. and Sohn, C., 2014. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast cancer research and treatment*, 146(1), pp.163-174.

²² Thierry, A.R., El Messaoudi, S., Gahan, P.B., Anker, P. and Stroun, M., 2016. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and metastasis reviews*, 35(3), pp.347-376.

²³ Kohler, C., Radpour, R., Barekati, Z., Asadollahi, R., Bitzer, J., Wight, E., Bürki, N., Diesch, C., Holzgreve, W. and Zhong, X.Y., 2009. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Molecular cancer*, 8(1), pp.1-8.

²⁴ Papayannopoulos, V., 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), pp.134-147.

²⁵ Fuchs, T.A., Kremer Hovinga, J.A., Schatzberg, D., Wagner, D.D. and Lämmle, B., 2012. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(6), pp.1157-1164.

²⁶ Mouliere, F. and Thierry, A.R., 2012. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert opinion on biological therapy*, 12(sup1), pp.S209-S215.

²⁷ Contreras-Naranjo, J.C., Wu, H.J. and Ugaz, V.M., 2017. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a Chip*, 17(21), pp.3558-3577.

²⁸ Di Vizio, D., Kim, J., Hager, M.H., Morello, M., Yang, W., Lafargue, C.J., True, L.D., Rubin, M.A., Adam, R.M., Beroukhim, R. and Demichelis, F., 2009. Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer research*, 69(13), pp.5601-5609.

²⁹ Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L.B., Strillacci, A., Stepanova, A., Iommarini, L., Mastroleo, C., Daly, L. and Galkin, A., 2017. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), pp.E9066-E9075.

³⁰ Zhang, J., Xu, S., Xu, Y., Liu, Y., Li, Z., Zhang, Y., Jin, Y., Xue, X. and Wang, H., 2017. Relation of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood to postoperative atrial fibrillation after isolated off-pump coronary artery bypass grafting. *The American journal of cardiology*, 119(3), pp.473-477.

³¹ Pérez-Barrios, C., Nieto-Alcolado, I., Torrente, M., Jiménez-Sánchez, C., Calvo, V., Gutierrez-Sanz, L., Palka, M., Donoso-Navarro, E., Provencio, M. and Romero, A., 2016. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Translational lung cancer research*, 5(6), p.665.

³² Ma, X., Zhu, L., Wu, X., Bao, H., Wang, X., Chang, Z., Shao, Y.W. and Wang, Z., 2017. Cell-free DNA provides a good representation of the tumor genome despite its biased fragmentation patterns. *PloS one*, 12(1), p.e0169231.

³³ Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. and Anker, P., 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta*, 313(1-2), pp.139-142.

³⁴ Alcaide, M., Cheung, M., Hillman, J., Rassekh, S.R., Deyell, R.J., Batist, G., Karsan, A., Wyatt, A.W., Johnson, N., Scott, D.W. and Morin, R.D., 2020. Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Scientific reports*, 10(1), pp.1-10.

³⁵ López-Otín, C. and Matrisian, L.M., 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature reviews cancer*, 7(10), pp.800-808.

³⁶ Roth, C., Pantel, K., Müller, V., Rack, B., Kasimir-Bauer, S., Janni, W. and Schwarzenbach, H., 2011. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC cancer*, 11(1), pp.1-12.

³⁷ Holdenrieder, S., Nagel, D., Schalhorn, A., Heinemann, V., Wilkowski, R., Von Pawel, J., Raith, H., Feldmann, K., Kremer, A.E., Müller, S. and Geiger, S., 2008. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), pp.180-189.

³⁸ Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Lubner, B., Alani, R.M. and Antonarakis, E.S., 2014. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*, 6(224), pp.224ra24-224ra24.

³⁹ Yong, E., 2014. Cancer biomarkers: written in blood. *Nature News*, 511(7511), p.524.

⁴⁰ Van der Vaart, M. and Pretorius, P.J., 2007. The origin of circulating free DNA. *Clinical chemistry*, 53(12), pp.2215-2215.

⁴¹ Valastyan, S. and Weinberg, R.A., 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), pp.275-292.

⁴² García-Olmo, D.C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J.M. and García-Olmo, D., 2010. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer research*, 70(2), pp.560-567.

⁴³ Olmo, D.G., Olmo, D.G., Ontanon, J., Martínez, E. and Vallejo, M., 1999. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histology and histopathology*, 14(4), pp.1159-1164.

⁴⁴ Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Taja-Chayeb, L., Anker, P., Herrera-Goepfert, R., Medina-Velázquez, L.A., Hidalgo-Miranda, A., Pérez-Montiel, D., Chávez-Blanco, A., Cruz-Velázquez, J. and Díaz-Chávez, J., 2012. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PloS one*, 7(12), p.e52754.

⁴⁵ García-Olmo, D.C., Gutiérrez-González, L., Samos, J., Picazo, M.G., Atiénzar, M. and García-Olmo, D., 2006. Surgery and hematogenous dissemination: comparison between the detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma before and after tumor resection in rats. *Annals of surgical oncology*, 13(8), pp.1136-1144.

⁴⁶ Gahan, P.B. and Stroun, M., 2010. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell biochemistry and function*, 28(7), pp.529-538.

⁴⁷ Lai, J., Du, B., Wang, Y., Wu, R. and Yu, Z., 2018. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA for detection of gene mutations in lung cancer: implications for precision treatment. *OncoTargets and therapy*, 11, p.9111.

⁴⁸ Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A. and Kinzler, K.W., 2008. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*, 14(9), pp.985-990.

⁴⁹ Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L. and Olivi, A., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *science*, 321(5897), pp.1807-1812.

⁵⁰ Mäbert, K., Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Souchelnytskyi, S. and Dubrovskaja, A., 2014. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *International journal of radiation biology*, 90(8), pp.659-677.

⁵¹ Duffy, M.J., 2001. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?. *Clinical chemistry*, 47(4), pp.624-630.

⁵² Dawson, S.J., Tsui, D.W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O.M., Chin, S.F., Dunning, M.J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B. and Rajan, S., 2013. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(13), pp.1199-1209.

⁵³ Fleischhacker, M. and Schmidt, B., 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1775(1), pp.181-232.

-
- ⁵⁴ Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R.J., Cheang, M., Osin, P., Nerurkar, A., Kozarewa, I. and Garrido, J.A., 2015. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Science translational medicine*, 7(302), pp.302ra133-302ra133.
- ⁵⁵ Melnikov, A.A., Scholtens, D., Talamonti, M.S., Bentrem, D.J. and Levenson, V.V., 2009. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer. *Journal of surgical oncology*, 99(2), pp.119-122.
- ⁵⁶ Chan, K.A., Jiang, P., Chan, C.W., Sun, K., Wong, J., Hui, E.P., Chan, S.L., Chan, W.C., Hui, D.S., Ng, S.S. and Chan, H.L., 2013. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), pp.18761-18768.
- ⁵⁷ Sturgeon, S.R., Balasubramanian, R., Schairer, C., Muss, H.B., Ziegler, R.G. and Arcaro, K.F., 2012. Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls. *Epigenetics*, 7(11), pp.1258-1267.
- ⁵⁸ Lehmann-Werman, R., Neiman, D., Zemmour, H., Moss, J., Magenheim, J., Vaknin-Dembinsky, A., Rubertsson, S., Nellgård, B., Blennow, K., Zetterberg, H. and Spalding, K., 2016. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), pp.E1826-E1834.
- ⁵⁹ Kang, S., Li, Q., Chen, Q., Zhou, Y., Park, S., Lee, G., Grimes, B., Krysan, K., Yu, M., Wang, W. and Alber, F., 2017. CancerLocator: non-invasive cancer diagnosis and tissue-of-origin prediction using methylation profiles of cell-free DNA. *Genome biology*, 18(1), pp.1-12.
- ⁶⁰ Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Stroun, M., 1994. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British journal of haematology*, 86(4), pp.774-779.

⁶¹ Frickhofen, N., Muller, E., Sandherr, M., Binder, T., Bangerter, M., Wiest, C., Enz, M. and Heimpel, H., 1997. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 90(12), pp.4953-4960.

⁶² He, J., Wu, J., Jiao, Y., Wagner-Johnston, N., Ambinder, R.F., Diaz Jr, L.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Papadopoulos, N., 2011. IgH gene rearrangements as plasma biomarkers in Non-Hodgkin's lymphoma patients. *Oncotarget*, 2(3), p.178.

⁶³ Scherer, F., Kurtz, D.M., Newman, A.M., Stehr, H., Craig, A.F., Esfahani, M.S., Lovejoy, A.F., Chabon, J.J., Klass, D.M., Liu, C.L. and Zhou, L., 2016. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Science translational medicine*, 8(364), pp.364ra155-364ra155.

⁶⁴ Vandenberghe, P., Wlodarska, I., Tousseyn, T., Dehaspe, L., Dierickx, D., Verheecke, M., Uyttebroeck, A., Bechter, O., Delforge, M., Vandecaveye, V. and Brison, N., 2015. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *The Lancet Haematology*, 2(2), pp.e55-e65.

⁶⁵ Yeh, P., Hunter, T., Sinha, D., Ftouni, S., Wallach, E., Jiang, D., Chan, Y.C., Wong, S.Q., Silva, M.J., Vedururu, R. and Doig, K., 2017. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature communications*, 8(1), pp.1-7.

⁶⁶ Yeh, P., Dickinson, M., Ftouni, S., Hunter, T., Sinha, D., Wong, S.Q., Agarwal, R., Vedururu, R., Doig, K., Fong, C.Y. and Blombery, P., 2017. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(12), pp.1685-1690.

⁶⁷ Kis, O., Kaedbey, R., Chow, S., Danesh, A., Dowar, M., Li, T., Li, Z., Liu, J., Mansour, M., Masih-Khan, E. and Zhang, T., 2017. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nature communications*, 8(1), pp.1-11.

⁶⁸ Li, T., Kung, H.J., Mack, P.C. and Gandara, D.R., 2013. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *Journal of Clinical Oncology*, 31(8), p.1039.

⁶⁹ Kreiter, S., Vormehr, M., Van de Roemer, N., Diken, M., Löwer, M., Diekmann, J., Boegel, S., Schrörs, B., Vascotto, F., Castle, J.C. and Tadmor, A.D., 2015. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*, 520(7549), pp.692-696.

⁷⁰ Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P. and Varela, I., 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366, pp.883-892.

⁷¹ Hamakawa, T., Kukita, Y., Kurokawa, Y., Miyazaki, Y., Takahashi, T., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Taniguchi, K., Takiguchi, S. and Mori, M., 2015. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. *British journal of cancer*, 112(2), pp.352-356.

⁷² Murtaza, M., Dawson, S.J., Tsui, D.W., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.F., Kingsbury, Z., Wong, A.S. and Marass, F., 2013. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 497(7447), pp.108-112.

⁷³ Reinert, T., Schøler, L.V., Thomsen, R., Tobiasen, H., Vang, S., Nordentoft, I., Lamy, P., Kannerup, A.S., Mortensen, F.V., Stribolt, K. and Hamilton-Dutoit, S., 2016. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*, 65(4), pp.625-634.

⁷⁴ Forshew, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D.W., Kaper, F., Dawson, S.J., Piskorz, A.M., Jimenez-Linan, M., Bentley, D. and Hadfield, J., 2012. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Science translational medicine*, 4(136), pp.136ra68-136ra68.

⁷⁵ Diaz Jr, L.A., Williams, R.T., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J.R., Berlin, J., Allen, B., Bozic, I., Reiter, J.G., Nowak, M.A. and Kinzler, K.W., 2012. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 486(7404), pp.537-540.

⁷⁶ Ilie, M., Hofman, V., Long, E., Bordone, O., Selva, E., Washetine, K., Marquette, C.H. and Hofman, P., 2014. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine?. *Annals of translational medicine*, 2(11).

9. SAŽETAK

Biopsija tkiva standardna je dijagnostička metoda kojom se mogu otkriti različite promjene u tkivnim stanicama te tako dijagnosticirati razne upalne bolesti, a najčešće se koristi za utvrđivanje prisutnosti tumorskih stanica. Biopsijom tkiva također se dobiva i materijal za genotipizaciju koji je iznimno važan u personaliziranoj terapiji raka. Međutim, dijagnostički postupci temeljeni na biopsiji tkiva imaju ograničenja u procjeni razvoja raka, prognozi i genotipizaciji zbog heterogenosti i relativno brze evolucije tumora. Cirkulirajuća tumorska DNA (eng. *circulating tumor DNA* – ctDNA) je tip vanstanične DNA (eng. *cell – free DNA*, cfDNA) koja se oslobađa iz tumorskih stanica u krv i odražava mutacije prisutne u izvornom tumoru, odnosno tumorskom genomu. Relativno nova metoda koja je sve više prihvaćena u molekularnoj dijagnostici je tekuća biopsija (eng. *liquid biopsy*), a njene najvažnije prednosti u odnosu na biopsiju tkiva su minimalna invazivnost i mogućnost ponavljanja, s obzirom da se uzorci za tekuću biopsiju uzimaju iz tjelesnih tekućina, poput krvi i urina. Različitim studijama je otkriveno da je detekcija genskih mutacija pomoću tekuće biopsije i ctDNA vrlo osjetljiva i specifična, što sugerira da analiza ctDNA može značajno unaprijediti postojeće sustave za dijagnostiku tumora pa čak i olakšati njihovo otkrivanje u ranoj fazi. Također, analizom ctDNA moguće je točno odrediti razvoj i napredovanje tumora, kao i preciznu terapiju.

Ključne riječi: biopsija tkiva, tekuća biopsija, tumor, ctDNA

10. SUMMARY

Tissue biopsy is a standard diagnostic procedure which is used to detect various changes in tissues and diagnose various inflammatory diseases. It is most often used to determine the presence of tumor cells. Tissue biopsy also provides genotyping material that is extremely important in personalized cancer therapy. However, diagnostic procedures based on tissue biopsy have limitations in assessing cancer development, prognosis, and genotyping due to heterogeneity and relatively rapid tumor evolution. Circulating tumor DNA (ctDNA) is a type of cell-free DNA (cfDNA) that is released from tumor cells into the blood and reflects mutations present in tumor genome. Relatively new method that is widely accepted in molecular diagnostics is liquid biopsy and its most important advantages over tissue biopsy are repetitive sampling and the fact it is minimally invasive, since samples for liquid biopsy are taken from body fluids, like blood and urine. Various studies have found that the detection of gene mutations by liquid biopsy and ctDNA is very sensitive and specific, suggesting that ctDNA analysis can significantly improve existing tumor diagnostic systems and even facilitate tumor detection at an early stage. Also, ctDNA analysis can accurately determine tumor development and progression, as well as precise therapy.

Key words: tissue biopsy, liquid biopsy, tumor, ctDNA