

# Intratumska heterogenost

---

**Vuletić, Filip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:719336>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Filip Vuletić**

**Intratumorska heterogenost**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Svena Seiwertha i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016/2017.

## Sadržaj rada:

1. Sažetak	
2. Summary	
3. Uvod	1
4. Rasprava	5
5. Zaključak	13
6. Zahvale	15
7. Literatura	16
8. Životopis	24

## **1. Sažetak**

### **Intratumorska heterogenost**

#### **Filip Vuletić**

Intratumorska heterogenost postala je glavna prepreka u liječenju zloćudnih bolesti. Iako je već desetljećima poznato da unutar samog tumora postoje subpopulacije tumorskih stanica koje se značajno razlikuju, interes za ovu problematiku sve donedavno je bio slab. Međutim, s pojavom potrebe za sve detaljnijom analizom svojstava tumora, ponovno se javlja interes za to područje. Budući da je danas poznato da upravo intratumorska heterogenost predstavlja jedan od glavnih razloga razvoja rezistencije tumora i razvoja sve agresivnijih metastaza, postaje neophodno integrirati i proširiti znanje kako bi se ta činjenica dovoljno razjasnila. Svjetlo pozornosti usmjereno je na otkrivanje novih metoda za određivanje intratumorske heterogenosti koje bi pomogle u predviđanju progresije, tj. invazije, metastaziranja, razvoja rezistencije na liječenje, ponovne pojave bolesti i u odabiru načina liječenja. Unatoč tome što postoji sve više i više dokaza o intratumorskoj heterogenosti kod različitih tumora, njeno podrijetlo još nije dokazano, i do danas ostaje nejasno. Zasadu postoje dvije teorije koje nastoje objasniti podrijetlo nastanka intratumorske heterogenosti: ideja o tumorskim matičnim stanicama i ideja o sekundarnim mutacijama koje oblikuju različite klonove stanica. Iako prikazivane u literaturi kao uzajamno ograničavajuće teorije, obje igraju značajnu ulogu u generiranju intratumorske heterogenosti.

**Ključne riječi:** intratumorska heterogenost, tumorske matične stanice, cirkulirajuće tumorske stanice, cirkulirajuća tumorska DNA, tekuća biopsija.

## **2. Summary**

### **Intratumoral heterogeneity**

#### **Filip Vuletić**

Intratumoral heterogeneity has become the main obstacle in treatment of malignant diseases. Although it has been known for decades, that within a single tumor there are sub-populations of tumor cells that are significantly different, the interest in this issue has for long been weak. However, with the emergence of the need for a more detailed analysis of tumor properties, interest for this area is again raising. Since it has become clear that intratumoral heterogeneity is one of the main reasons of tumor resistance and development of more aggressive metastases, it is essential to integrate and extend knowledge to sufficiently elucidate this fact. New light has been shed on significance of discovering new methods for determining intratumor heterogeneity which should help presume cancer progression including invasion, metastasis, drug resistance and disease relaps and according to that administration of the right treatment. Despite the fact that there are more and more evidence of intratumoral heterogeneity in different tumors, its origin have not been confirmed, and are still not clear. So far there are two theories that try to elucidate the origin of intratumor heterogeneity: the idea of „cancer stem cells“ and the idea of ongoing mutations that form different cell clones. Although presented in the literature as mutually restricted hypothesis, they both play an essential role in the generation of heterogeneity.

**Key words:** intratumor heterogeneity, cancer stem cells, circulating tumor cells, circulating tumor DNA, liquid biopsy.

### 3. Uvod

Intratumorska heterogenost zloćudnih tumora poznata je i prihvaćena znanstvena činjenica već više desetljeća. Rane 1978. godine, Isaiah Fidler potvrdio je da unutar pojedinog tumora postoje subpopulacije tumorskih stanica koje se značajno razlikuju (1). S vremena na vrijeme ta činjenica pobuđuje interes određenog broja znanstvenika no bez sistematičnih istraživanja i najčešće bez jasne spoznaje o njenom praktičnom značenju. U posljednje vrijeme, s pojavom potrebe za sve detaljnijom analizom svojstava tumora na razini klonalne diferencijacije, ponovno se javlja i interes za to područje. Relativno rano nakon što je analiza DNA ploidnosti upotrebljena i u većim studijama, postalo je očito da ne izražavaju sve stanice u tumoru isti sadržaj DNA. Gotovo dva desetljeća detaljnije analize dokazala su postojanje značajne intratumorske heterogenosti tumora u genetskom i molekularnom sadržaju koja nastaje kao rezultat napredovanja tumora i terapije citostaticima ili zračenjem (2). Dvije teorije proizlaze iz ovakvih rezultata – ideja o postojanju tumorskih matičnih stanica i ideja o sekundarnim mutacijama koje oblikuju klonove stanica s drugačijom morfologijom (rijetko i šturo demonstrirano), ploidnim statusom, proliferacijskom aktivnosti, ili (imunohistokemijski dokazanom) ekspresijom različitih antigena. Razvoj tih klonova potiče različito biološko ponašanje tumora što u konačnici može dovesti do razvoja rezistencije tumora na hipoksiju, radioterapiju, terapiju citostaticima i do razvoja klonova tumorskih stanica koje zaobilaze mehanizme ciljane terapije. Sve donedavno (od razvoja ciljane terapije) broj takvih studija je bio prilično ograničen. Njihov utjecaj, uključujući i prijedlog da je zbog intratumorske heterogenosti potrebna detaljnija analiza iz

više uzoraka tumora u svrhu dobivanja klinički značajnih podataka za terapiju, ostao je minimalan. Također, broj studija posvećen razotkrivanju prostorne distribucije različitih tumorskih klonova još je i manji. Unatoč činjenici da su neke studije prikazale razlike u tumorskim karakteristikama između različitih anatomskih/mikroskopskih regija tumora, jako je malo istraživanja učinjeno u tom smjeru. Značajnost intratumorske heterogenosti, u generiranju agresivnijih metastaza s većom rezistencijom na terapiju u odnosu na primarni tumor, potvrđena je s novim istraživanjima svakodnevno. Svjetlo pozornosti usmjereno je na otkrivanje novijih metoda za određivanje intratumorske heterogenosti koje bi pomogle u predviđanju progresije, tj. invazije, metastaziranja, razvoja rezistencije na liječenje, ponovne pojave bolesti i u odabiru načina liječenja (3). Postoje sve više i više dokaza o intratumorskoj heterogenosti kod različitih tumora, uključujući kolorektalni karcinom (4), karcinom dojke (5,6), pluća (7), prostate (8), jednjaka (9). Nasuprot tome, podrijetlo intratumorske heterogenosti još nije dokazano i do danas ostaje nejasno (6,10).

Kao što je i ranije rečeno, dvije teorije opisuju moguće uzorke formiranja i održavanja intratumorske heterogenosti. Prva teorija predlaže da samo mala frakcija stanica, nazvanih „tumorske matične stanice“, ima sposobnost iniciranja i vođenja tumorske proliferacije te sposobnost samoobnavljanja (11,12,13). Ovo svojstvo naposljetku dovodi do tipova stanica koje će generirati stvaranje intratumorske heterogenosti. Alternativno objašnjenje za sposobnost specifičnih podtipova stanica da generiraju rast i pridonose razvoju intratumorske heterogenosti je koncept plastičnosti tumorskih stanica. Tumorski mikrookoliš nije jedinstven i određene interakcije između tumorskih stanica i mikrookoliša



mogu promicati tumorsku progresiju (14). Unutar samog tumora svaka stanica doživljava razliku u interakcijama sa izvanstaničnim matriksom, čimbenicima rasta, gradijentom kisika i produktima metabolizma. Navedena interakcija doprinosi epigenetskim promjenama, uključujući i promjenama prilagodbe koje u konačnici mogu omogućiti invaziju u stromu, ulazak u limfatičku i krvnu struju, te rezistenciju na liječenje (15). Nasuprot tome, ideja o evoluciji klonova stanica navodi da se kao rezultat genomske nestabilnosti i proliferacije u tumoru neprestano odvijaju nasumične mutacije. S vremenom dolazi do razdvajanja između mutacija koje idu u prilog tumorske progresije i velikog broja mutacija koje bivaju odbačene putem Darvinističke selekcije. Stalne promjene u tumorskom genomu dovode do razvoja genetski, pa čak i funkcionalno, različitih klonova stanica koji mogu zauzeti prostorno različite područja unutar pojedinog tumora. Neke od tih mutacija mogu potaknuti klonalnu ekspanziju u smjeru tzv. evolucijski slijepo ulice, stoga neprisutne u potpuno razvijenom tumoru. Tumorska progresija je povezana i s promjenama u tumorskom mikrookolišu koje vrše selektivne sile na stanice, dovodeći do nelinearne evolucije i razvoja značajne genetske heterogenosti (16). Molekularne značajke stanice predstavljaju njene adaptacije na prostorno različit okoliš. U studiji rađenoj na karcinomu dojke, dokazana je povećana ekspresija estrogenskih receptora u područjima tumora s bogatijom krvnom opskrbom i višim razinama estrogena (17). Tumorske stanice iz različitih područja tumora pod utjecajem su drugačijih selektivnih sila, što u konačnici vodi u odabir drugačijih „setova“ mutacija. Karcinogeneza je pokrenuta s akumulacijom mutacija koje idu u prilog razvoju invazivnijih, agresivnijih i rezistentnijih fenotipova. Iako prikazane kao

međusobno ograničavajuće, obje teorije predstavljaju osnovu razvoja intratumorske heterogenosti.

#### 4. Rasprava

Kao što je rečeno u uvodu, intratumorska heterogenost ima jaki utjecaj na zloćudnost tumora i na razvoj terapijske rezistencije. Brojne studije dokazale su postojanje intratumorske heterogenosti na prostornoj, morfološkoj, genetskoj i molekularnoj razini.

Ovdje započinjemo s primjerom prostorne heterogenosti koja ima velik utjecaj na nalaz biopsija. Navedena tumorska karakteristika dovodi u pitanje korištenje nalaza malih, pojedinačnih biopsija kao reprezentativnih u dijagnostici i liječenju tumora. Kod hepatocelularnih karcinoma, prema podacima dobivenim analizom iz više područja tumora, nalaz jedne biopsije moguće je neadekvatan za opis cijelog tumora (18). U studiji rađenoj na nesitnostaničnom karcinomu pluća dokazana je prostorna heterogenost u ekspresiji EGFR, što se sumnja da predstavlja jedan od razloga u nekonzistentnosti kod odgovora na anti-EGFR terapiju (7,19). Postavlja se pitanje, da li je ekspresija pojedinog terapijskog markera u nalazu biopsije reprezentativna za cijeli tumor i da li je to dovoljno za određivanje ciljane terapije? Današnja klinička praksa u dijagnozi tumora i određivanju terapije zasniva se prema predominantnoj subpopulaciji s većom zastupljenošću unutar tumorske populacije stanica. Međutim, subpopulacije s manjom zastupljenošću unutar tumorske populacije pokazale su se važne za prikaz kako „dobro“ tumor odgovara na terapiju, i moguće je da su zaslužne za razvoj rezistencije i relapsa bolesti nakon davanja terapije (20). Problematika prostorne heterogenosti istraživana je i na karcinomu želuca (21). Analizirani su nalazi biopsije iz šest različitih područja tumora kod 24 HER2-pozitivna karcinoma grkljana. U prilog postojanja prostorne heterogenosti govori činjenica

da HER2-pozitivne stanice su nađene pretežno na luminalnoj površini tumora (21). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dokazala klinička važnost dobivenih podataka. Jedna zanimljiva studija provedena na karcinomu grkljana dokazala je povezanost između heterogenosti DNA sadržaja i histopatoloških varijabli (22). Uzimanjem u obzir tri histološki definirana područja tumora uspjeli su smanjiti utjecaj intratumorske heterogenosti na prognostičke faktore. Rezultati studije pokazali su da su DNA ploidnost, DNA i proliferacijski indeks veći u centru u odnosu na rubove tumora (transformacijske zone i invazivnog ruba). Dokazana je povezanost indeksa DNA transformacijske zone s veličinom tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova. Proliferacijski indeks transformacijske zone i centra tumora pokazao je korelaciju s veličinom tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova i histološkim gradusom. U prijašnjoj studiji rađenoj na karcinomu grkljana pronađena je značajna povezanost između broja organizacijskih regija po nukleusu (AgNOR) s postotkom aneuploidije (23). Klinički pokazatelji i postotak aneuploidije pokazali su korelacije s preživljenjem, što pridaje veliki prognostički značaj DNA citometriji kod karcinoma grkljana. Prostorna heterogenost DNA sadržaja dokazana je i u jednoj Američkoj studiji. Analizirane su 353 regije iz 18 kirurški odstranjenih glioma (24). Rezultati su pokazali da stanice sa sličnim ploidnim statusom i proliferativnim indeksom imaju tendenciju skupljanja u istoj regiji tumora. Uz dokaz prostorne heterogenosti, ovi nalazi mogu se upotrijebiti i kao dokaz teorije o lokalnoj klonalnoj ekspanziji tumorskih stanica kao generatoru intratumorske heterogenosti. Zaključno, stavlja se naglasak na potrebu daljnjih

istraživanja novih metode u svrhu procjene prostorne heterogenosti i njenog kliničkog značaja.

Nadalje, intratumorska heterogenost može se analizirati i na morfološkoj razini. Jedan od jednostavnijih primjera te značajke zloćudnih tumora je karcinom dojke. Gotovo 75% karcinoma dojke može se klasificirati kao invazivni karcinom bez posebnog tipa (IC NST). Ovaj tip karcinoma pokazuje širok raspon morfoloških karakteristika što otežavana njegovu histološku klasifikaciju (25). Jedno istraživanje bavilo se utjecajem tih morfoloških karakteristika karcinoma dojke na terapijski odgovor. Rezultati su pokazali da kod karcinoma dojke, karcinomi sa trabekularnim karakteristikama pokazuju lošiji odgovor na kemoterapiju (26). Jedan od najčešćih uzroka rezistencije na liječenje kod karcinoma dojke je promijenjena, tj. povećana ekspresija MDR gena (27). Upravo trabekularne strukture karcinoma dojke pokazuju povećanu ekspresiju MDR gena (26). Za razliku od toga, kod karcinoma dojke koje sadrže alveolarne strukture, povezanost strukture i odgovora na terapiju nije se uspjela dokazati. U zaključnici, ove studije pokazale su da karcinomi dojke sa trabekularnim i alveolarnim strukturama pokazuju nezadovoljavajući odgovor na kemoterapiju, međutim, potrebna su daljnja istraživanja za određivanje točnog mehanizma rezistencije. Fenomen koji bi mogao objasniti mehanizme rezistencije kod karcinoma dojke sa alveolarnim strukturama zove se „višestanična rezistencija“ (multicellular resistance MCR). Za razliku od jednoslojnih struktura, višeslojne sferoidne strukture dijele MCR mehanizme koji su povezani s neosjetljivošću na gotovo sve kemoterapeutike (28,29). Hipoksija i acidifikacija višeslojnih

tumorskih sfera potiču jaču ekspresiju gena odgovornih za rezistenciju na ciljano liječenje (30).

Općenito je prihvaćeno da je genetska heterogenost između tumorskih stanica rezultat evolucije, tj. slijeda „slučajnih“ mutacija kao posljedica smanjene genetske stabilnosti tumora. Velika je vjerojatnost da je barem dio tog procesa vođen fenotipskim varijacijama u odgovoru na prostornu i vremensku heterogenost okolišnih utjecajnih čimbenicima. U tom pogledu, nekolicina autora predložila je metode korištene u razvoju „pejzažne ekologije“ (eng. landscape ecology) kao alat u istraživanju tog fenomena (Lloyd M.M. 2015). Unatoč dobro poznatoj činjenici da snimke PET-CT-a pokazuju intratumorsku heterogenost u unosu fluorodeoksiglukoze (FDG), samo nekolicina studija pokušala je usporediti te podatke sa morfološkim, imunohistokemijskim i anatomskim nalazima. Faktori koji idu u prilog intratumorskoj FDG heterogenosti uključuju nekrozu, hipoksiju, staničnu proliferaciju te razlike u gustoći mikrovaskulature i krvne opskrbe. Rezultati jedne kohortne studije predložili su da je istraživanje procesa odgovornih za heterogenost u unosu FDG i njene distribucije u tumoru, koji tumače njihove lokalne i regionalne razlike, djelotvornije od sadašnjih mjera koje se koriste u praksi (31). Tumorski uzorak unosa fluorodeoksiglukoze pokazuje potencijale u pružanju dodatnih informacija za praćenje tumorske progresije i terapijske uspješnosti. Studija izrađena na 51 bolesniku s kirurški odstranjenim karcinomom jednjaka usmjerila se na istraživanje povezanosti intratumorske heterogenosti u unosu FDG s klasičnim kliničkim pokazateljima. Intratumorska heterogenost u unosu izražena je sa heterogenetskim faktorom (HF). Grupa s pozitivnim limfnim čvorovima

pokazala je značajno viši HF u odnosu na grupu s negativnim limfnim čvorovima. Takvi rezultati dovode nas do mogućeg zaključka da HF predstavlja jedan od najjačih prediktornih faktora kada govorimo o zahvaćenosti limfnih čvorova (32). Također, intratumorska heterogenost pokazala se bitnom i u prekanceroznim tvorbama jednjaka gdje se povećan stupanj heterogenosti povezuje s višim rizikom za razvoj karcinoma (33).

Za jednu od važnih odrednica početnog odgovora na ciljanu terapiju prihvaćeno je svojstvo intratumorske heterogenosti i na molekularnoj razini. Poduzeti su veliki naponi u osvjetljavanju molekularne pozadine rezistencije na lijekove koji su otkrili niz mehanizama, primjerice refluks lijeka, uključivanje alternativnih putova preživljavanja i stjecanje mutanata bez mjesta za vezanje lijeka (34). U studiji rađenoj na karcinomu endometrija analizirana je povezanost između intratumorske heterogenosti na razini proteina i ishoda liječenja (35). „Kumulativna tumorska heterogenost određenih proteina“ pokazala je snažnu povezanost s pojavnošću metastaza i gradusom tumora, a rezultati navode i mogućnost njenog korištenja kao nezavisnog prediktora preživljenja. Kod karcinoma prostate, izraženija heterogenost u proteinu Ki-67 je povezana s većom agresivnosti tumora (36). Također, uočeno je da heterogenost u razini ekspresije PTEN proteina utječe na sveukupno preživljenje kod bolesnika s glioblastomom (37). Istovremena analiza većeg broja proteinskih markera mogla bi dati potpuniju i jasniju sliku klonalne raznolikosti u populaciji tumorskih stanica.

Odnedavno se pojavljuju dokazi koji otkrivaju i nemutacijske mehanizme rezistencije na lijekove. Primjerice, mala populacija „tumorskih matičnih stanica“

može biti intrinzično otpornija na učinke više kemoterapeutika u odnosu na ostatak tumora, dijelom objašnjeno putem mehanizma pojačanog refluksa lijeka (38). Druga istraživanja uključuju epigenetske mehanizme, pokazujući da za stjecanje rezistencije na lijekove nije uvijek potrebna stabilna genetska mutacija (39). Zajedno, visoka genetska i epigenetska raznolikost povećava vjerojatnost postojanja klonova otpornih na terapiju. Dokazano je da populacije stanice raka mogu pokazati reverzibilnu toleranciju na liječenje. Održavanjem fenotipski različite subpopulacije stanica moguće je zaštititi cijelu tumorsku populaciju od potencijalno smrtonosnog djelovanja lijeka (40). Sposobnost subpopulacije s razvijenom tolerancijom na liječenje da se održi na životu čini se da uključuje IGF1R aktivaciju (41,42). IGF signalni sustav je uključen u različitim vrstama karcinoma kao što su pluća, prostata i karcinom dojke. Mitogene i antiapoptične uloge IGF signalnog sustava izravno utječu na razvoj tumora povezujući ga s lošijom prognozom i otpornosti na brojne terapije. Kod metastazirajućeg kolorektalnog karcinoma pronađeno je da mutacija u KRAS ili NRAS genu određuje otpornost na ciljano liječenje protiv EGFR. Navedene mutacije prisutne su u oko 60% metastazirajućih kolorektalnih karcinoma (43,44). Pacijenti s niskim sadržajem KRAS mutacija pokazuju bolji odgovor na EGFR ciljanu terapiju, međutim medijan bez progresije bolesti pokazuje se sličnim (45). Takvi rezultati djelomično idu u prilog dosadašnjim saznanjima koja navode da: "prisutnost niskog udjela stanica koje nose mutaciju otpora ne može spriječiti reakciju na određeni lijek, ali trajanje odgovora bit će kraće jer će rezistentni klon se brzo proširiti i uzrokovati ponavljanje bolesti " (46). Zanimljivo je da i niski sadržaj KRAS mutacija je u stanju prouzročiti rezistenciju na



liječenje ciljanom terapijom. Međutim, u tim slučajevima dodatne mutacije u BRAF i PIK3CA pridonose rezistenciji na EGFR terapijske lijekove (45). Višestruka procjena sadržaja mutacija mogla bi pridonijeti u shvaćanju kompleksnog fenomena rezistencije na liječenja i pomoći u razvoju personalizirane medicine.

Također, smatra se da je jedan od glavnih razloga neuspjeha sistemskog liječenja raka naša nesposobnost da precizno pratimo prostornu i vremensku heterogenost tijekom evolucije tumora (47). Nade se polažu u minimalno invazivne tekuće biopsije, izvođene u realnom vremenu i usmjerene u hvatanju i karakteriziranju cirkulirajućih tumorskih stanica (CTS), kao i cirkulirajuće tumorske DNA (ctDNA). Te se metode mogu izvesti u različitim vremenskim točkama nudeći virtualni, u „realnom vremenu“, uvid u klinički važne tumorske mehanizme, kao što je otpor koji nastaje tijekom liječenja i metastaziranja. Cirkulirajuće tumorske stanice identificirane su kod mnogih zloćudnih tumora, uključujući i karcinom kolona, dojke, prostate, želuca, itd. Sposobnost cirkulirajućih tumorskih stanica u prilagodbi i opstanku u ciljnom tkivu preduvjet je nastanka metastatske lezije (48). Njihovo izoliranje moguće je zbog razlike od normalnih krvotvornih stanica u veličini, gustoći, elektr. svojstvima stanične površine, ili ekspresije epitelno i tumorski specifičnih molekula, uključujući citokeratin, HER 2 i EpCAM. Trenutačno se većina CTS-a detektira upotrebom epitelnih markera, dok populacija s neepitelnim fenotipom biva neprepoznata. Jedan od mogućih razloga za CTS koje ne izražavaju epitelni fenotip je da su podvrgnute epitelijalno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT). Vjeruje se da ovakva vrsta „preobrazbe“ povećava metastatski potencijal. Potrebno je osmisliti

kompletnije tehnike njihove detekcije koje bi otkrivale sve cirkulirajuće tumorske stanice. Značaj određivanja točnog broja cirkulirajućih tumorskih stanica je u njegovoj dokazanoj uskoj povezanosti s prognozom bolesti (49,50). Uz određivanje njihovog broja, javlja se i potreba kvalitativnog određivanja cirkulirajućih tumorskih stanica, jer rezultati istraživanja idu u prilog da samo određene populacije CTS-a imaju mogućnost iniciranja metastaza (51). Veličina eliminacije i promjena broja cirkulirajućih tumorskih stanica može poslužiti kao rani signal aktivnosti terapije. S druge strane, povećano otpuštanje ctDNA neposredno nakon tretmana može biti dokaz smrti stanica tumora, tj. dokaz odgovora na liječenje. Također, postoji mišljenje da kvantitativna analiza razine ctDNA može ukazivati na prognozu. Trenutna uporaba CTS i ctDNA u svrhu je genotipizacije karcinoma za mutacijski ciljane terapije, uključujući nesitnostanični karcinom pluća (EGFR i EML4-ALK), melanom (BRAF), karcinom kolona (BRAF+EGFR), karcinoma dojke (PIK3CA) i karcinome drugih sijela (52,53). U budućnosti, CTS i ctDNA bi mogle omogućiti i uvesti upotrebu tekuće biopsije za raniju dijagnozu karcinoma, detekciju relapsa/progresije tumora i dati temeljiti uvid u heterogenost tumora.

## 5. Zaključak

Broj oboljelih od karcinoma u svijetu raste, prema procjeni svjetske zdravstvene organizacije očekuje se da će broj porasti za 75% u slijedeća dva desetljeća. Najčešći uzrok smrti nije primarni tumor, već njegovo ponovno pojavljivanje kao rezultat povećane neosjetljivosti na liječenje (54). Kao što je i rečeno u uvodu, vjeruje se da je upravo intratumorska heterogenost uzrok generiranja sve više i više agresivnijih metastaza i širenja rezistencije na liječenje (2). Budući da se razvoj i progresija tumora proučava iz brojnih kutova koristeći brojne tehnike, postoji velika potreba za inkorporiranjem svih tih nalaza te napraviti ih korisnima za svakodnevnu praksu i pri odabiru odgovarajuće terapije. Stoga postoji velika potreba za razvojem informatičkih metoda koje će moći analizirati ove ogromne količine podataka. Dijeljenje tumora u klinički i biološki značajne podtipove određene po sličnosti molekularnih profila trebao bi biti dalekosežan cilj „informatike karcinoma“ (55). Zahvaljujući brzom razvoju molekularne analize, danas smo u mogućnosti sekvencionirati cjelovite ljudske genome, ali i genome karcinoma. Jedno od najnovijih i najvažnijih tehnoloških dostignuća u biološkim znanostima je sekvencioniranje nove generacije (SNG). Ovaj pojam obuhvaća tehnike koje omogućuju masovno sekvencioniranje milijuna DNA predložaka. Budući da je vrlo važno znati koje nasljedne ili somatske mutacije potiču tumor prema proliferaciji i invaziji, SNG bi nam trebalo donijeti novi proboj u dijagnosticiranju i liječenju karcinoma (56). Kao što je jedna američka studija predvidjela, napredovanje tehnologije će u konačnici zahtijevati drukčiji pristup heterogenosti tumora, klasifikaciji i liječenju. Analizirali su kako novi napredak u informatici utječe na liječenje i novu klasifikaciju kod karcinoma dojke. Kao što

su iznijeli, najveći izazov „je da se najbolje iskoriste velike količine znanja koje su se stekle uz metode manje rezolucije na tisuće slučajeva, kako bi se SNG studije usmjerile prema najvećem utjecaju na kliničko upravljanje bolesti“ (57). Istraživali su intra i intertumorsku heterogenost kao i cirkulirajuće tumorske stanice i diseminirane tumorske stanice u koštanoj srži te su prema tome predložili novu, integriranu klasifikaciju. Novi način klasifikacije integrirao bi kliničke i molekularne podatke na četiri razine. Prvu razinu bi uključivala patološka procjena tumora, kao i kliničke karakteristike bolesnika. Druga razina uključivala bi klasifikaciju u „molekularnom podtipu“ prema procjeni genomske ili translacijske analize. Ova razina bi također uključivala specifične prognostičke i prediktivne testove te procjenu serumskih markera specifičnih za podtipove tumora. Treća razina uključivala bi intratumorsku heterogenost. Ova razina zahtijevala bi testove koji će identificirati stanice s promjenama zaslužnim u razvoju terapijske rezistencije za koje se vjeruje da postoje prije terapije i zaslužne su za progresiju bolesti nakon terapije (57). Na ovoj razini prostor se otvara upravo sekvencioniranju nove generacije. Konačna razina stopila bi sve podatke prikupljene na prethodnim razinama s ciljem davanja točne dijagnoze, predviđanja terapije i plana praćenja bolesti (57).

Kao što možemo vidjeti, intratumorska heterogenost postala je glavna prepreka u liječenju zloćudnih bolesti. Budući da predstavlja jedan od glavnih razloga razvoja rezistencije tumora i razvoja agresivnijih metastaza, neophodno je integrirati i proširiti znanje kako bi se dovoljno razjasnila intratumorska heterogenost i prema tome usmjerili prema učinkovitijem i personaliziranijem liječenju (54).

## **6. Zahvale**

Zahvaljujem svome mentoru, prof. dr. sc. Svenu Seiwerthu koji me od samog začetka ideje stručno i savjesno vodio kroz cijeli ovaj rad te svojim ogromnim iskustvom i znanjem usmjeravao kroz sve segmente rada, kako u praktičnom tako i u teoretskom dijelu. Sudjelovanje u ovakvom radu za mene je jedno nezamjenjivo iskustvo i zasigurno veliki poticaj za nove istraživačke izazove.

## 7. Literatura

1. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer res.* 1978;38(9):2651-60.
2. Futreal PA, Gerlinger M, Pusztai L, Swanton C, Yap TA. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med.* 2012;4:127-110.
3. Brown JS, Bui MM, Gatenby RA, Lloyd MC, Minor ES, Rejniak KA. Pathology to enhance precision medicine in oncology: lessons from landscape ecology. *Adv Anat Pathol.* 2015;22(4):267-72.
4. Brooke ES, Efsevia V. Tumor evolution and intratumor heterogeneity in colorectal carcinoma: insights from comparative genomic profiling of primary tumors and matched metastases. *J Gastrointest Oncol.* 2015; 6(6): 668–675.
5. Beca F, Polyak K. Intratumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;882:169-89.
6. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?. *Cell Cycle.* 2007;6:2332–8.
7. De Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Analysis of intratumor heterogeneity unravels lung cancer evolution. *Mol Cell Oncol.* 2015;2(3):e985549
8. Assenov Y, Bogatyrova O, Brocks D, Brors B, Feuerbach L, Korbel J i sur. Intratumor DNA methylation heterogeneity reflects clonal evolution in aggressive prostate cancer. *Cell Rep.* 2014;8(3):798-806.

9. Berman BP, Cai Y, Chang C, Dihn HQ, Hao JJ, Koeffler HP i sur. S Spatial intratumoral heterogeneity and temporal clonal evolution in esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet.* 2016;48(12):1500-1507.
10. Maley CC, Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:924–35.
11. Clarke MF, Morrison MJ, Reya T, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105-11.
12. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene.* 2004;23:7274-82.
13. Bapat SA. Evolution of cancer stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2007;17:204-13.
14. Barcellos-Hoff MH, Bissell MJ, Park CC. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today.* 2000;6:324-329.
15. Lowe SW, Luambio A. The microcosmos of cancer. 2012;482:347-55.
16. Campell IG, Haviv I, Polyak K. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* 2009;25:30-38.
17. Alfarrouk KO, Brown JS, Bui MM, Gatenby RA, Lloyd MC, Verduzco D. Vascular measurement correlate with estrogen receptor status. *BMC Cancer.* 2014;14:279.
18. Bohm F, Egger M, Frick L, Friemel J, Moch H, Rechsteiner M. Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(8):1951-61.

19. Atanackovic D, Bokemeyer C, Clauditz TS, Grob TJ, Hoenig T, Izbicki JR. Frequent intratumoral heterogeneity of EGFR gene copy gain in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2013;79(3):221-7.
20. Chen HY, Chan WK, Chang GC, Ho BC, Kuo ML, Li KC i sur. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(4):433-40.
21. Fujimoto K, Gotoda T, Grabsch HI, Hale MD, Hara M, Itoi T i sur. Five biopsy specimens from the proximal part of the tumor reliably determine HER2 protein expression status in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2016;19: 553–560.
22. Brčić L, Bura M, Ćorić M, Kusić Z, Ladika-Davidović B, Seiwert S. Heterogeneity of DNA content in laryngeal squamous cell carcinoma in relation to histopathological variables. *Acta Otolaryngol*. 2009;129(7):768-73.
23. Bumber Z, Ćorić M, Danić D, Ladika-Davidović B, Seiwert S, Vuletić LB. Prognostic significance of DNA cytometry in combination with AgNOR investigation. *Acta Otolaryngol*. 2007;127(12):1332-7.
24. Coons SW, Johnson PC. Regional heterogeneity in the DNA content of human gliomas. *Cancer*. 1993 Nov 15;72(10):3052-60.
25. Cherdyntseva NV, Denisov EV, Litvyakov NV, Slonimskaya EM, Perelmuter VM, Slonimskaya EM, i sur. The presence of alveolar



- structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis. *Diagn Cytopathol.* 2013;41(3):279-82.
26. Cherdyntseva NV, Denisov EV, Garbukov EY, Geraschenko TS, Perelmuter VM, Slonimskaya EM. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression. *Sci Rep.* 2014;4:4709.
27. Gottesman M, Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53:615-627.
28. Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;36(2-3):193-207.
29. Graham CH, Kerbel RS, Kobayashi H, Kapitain SJ, Man S, Teicher BA. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(8):3294-8.
30. Callaghan R, Mellor HR. Accumulation and distribution of doxorubicin in tumor spheroids: the influence of acidity and expression of P-glycoprotein. *Cancer Chemoter Pharmacol.* 2011;68:1179-1190.
31. Albarghach N, Corcos L, Hatt M, Le Rest CC, Metges JP, Tixier F. Intratumor heterogeneity characterized by textural features on baseline 18F-FDG PET images predicts response to concomitant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Nucl Med.* 2011;52(3):369-78.
32. Chang S, Kim SJ, Pak K. Determination of regional lymph node status using (18) F-FDG PET/CT parameters in oesophageal cancer patients:

- comparison of SUV, volumetric parameters and intratumor heterogeneity. *Br. J. Radiol.* 2015;22:20150673.
33. Blount PL, Finley JC, Galipeau PC, Maley CC, Paulson TG, Rabinovitch PS. Genetic clonal diversity predicts progression to oesophageal adenocarcinoma. *Nat Genet.* 2006;38:468-473.
34. Bliven SF, Faulkner LE, Leith JT, Michelson S. Growth properties of artificial heterogeneous human colon tumors. *Cancer Res.* 1987;47:1045-1051.
35. Gulczynski J, Majewska H, Lapinska-Szumczyk S, Supernat A, Wojciech B, Wydra D, et al. Tumor Heterogeneity at Protein Level as an Independent Prognostic Factor in Endometrial Cancer. *Translational Oncology.* 2014;7(5):613-9.
36. Demanes DJ, Huang J, Mesko S, Kamrava M, Kupelian P, Wang PC. Quantifying the ki-67 heterogeneity profile in prostate cancer. *Prostate Cancer.* 2013;2013:1-5.
37. Aristu J, Diez-Valle R, Echeveste J, Idoate MA, Lozano MD. Biological and clinical significance of the intratumour heterogeneity of PTEN protein expression and the corresponding molecular abnormalities of the PTEN gene in glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(6):736-46.
38. Trump A, Wiestler OD. Mechanisms of disease: cancer stem cells—targeting the evil twin. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2008;5: 337-347.
39. Brown R, Glasspool R.M., Teodoridis JM. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. *Br. J. Cancer* 2006;94:1087-1092.

40. Azizian N, Brandstetter K, Classon M, Fischbach MA, Lee DY, Li B. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010;141(1):69-80.
41. Casa AJ, Cui X, Dearth RK, Lee AV, Litzénburger BC. The type I insulin-like growth receptor pathway: a key player in cancer therapeutic resistance. *Front. Biosci.* 2008;13:3273-3287.
42. Pollax M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8:915-928.
43. Douillard JY, Oliner KS, Siena S. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023-1034.
44. Decker T, Heinemann V, Weikersthal LF. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patient with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open label, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* 2014;15:1065-1075.
45. Botti G, Ciardiello F, Colluci G, Esposito C, Fenizia F, Lambiase M. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1710-4.
46. Nicolson GL, Yeatman TJ. Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ-specific tumor metastasis. *Semin Surg Oncol*. 1993;9(3):256-263.
47. Dawson SJ, Ignatidis M. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann. Oncol.* 2014;25(12):2304-13.

48. Allard WJ, Connelly MC, Matera J, Miller MC, Rao C, Repollet M, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6897-6904.
49. Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med.* 2012;5:199-215.
50. Danila DC, Fleisher M, Pantel K, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers: progress toward biomarker qualification. *Cancer J.* 2011;5:438-450.
51. Baccei I, Bauerle T, Holland-Letz T, Marme F, Saini M, Scharpf M, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013;5:539-544.
52. Baselga J, Gray NS, Haber DA. The evolving war on cancer. *Cell.* 2011;145:19-24.
53. Downing JR, McDermott U, Stratton MR. Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med.* 2011;364:340-50.
54. Mirjam Renovanz, Ella L. Kim. Intratumoral Heterogeneity, Its Contribution to Therapy Resistance and Methodological Caveats to Assessment. *Front Oncol.* 2014;4:142.
55. Carte H, Gross A, Hofree M, Ideker T, Phen JP. Network-based stratification of tumor mutations. *Nat Methods.* 2013;10:1108-1115.

56. Doyle MA, Meldrum C, Tothill RW. Next-generation sequencing for Cancer Diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev.* 2011;32(4):177-195.
57. Borresen-Dale AL, Hicks J, Navin N, Russnes HG. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3810-3818.

## **8. Životopis**

Rođen u Zaboku 07.09.1992. godine. Svoju osnovnu školu i gimnaziju završio u Zagrebu. 2011. godine upisao Medicinski fakultet u Zagrebu. Već nakon prve godine fakulteta obavljao dodatnu praksu, za vrijeme ljetnih mjeseci, u Sveučilišnom kliničkom centru Maribor, na odjelu torakalne kirurgije, gdje sam i koautor jedne studije rađene na pacijentima s GERB-om. Osvojio dekanovu nagradu za ostvareni uspjeh na drugoj godini studija. Od treće godine voditelj sam vaterpolo sekcije Medicinskog fakulteta u Zagrebu te član Europskog udruženja studenata medicine (EMSA). Na četvrtoj godini volontirao na 6. kirurškom kongresu u Zagrebu i od četvrte godine volontiram na odjelu torakalne kirurgije KB Dubrava. Na istoj godini studija aktivno sudjelovao na kongresu EMSA-e u Varšavi i iste godine obavio jednomjesečnu praksu u „AKH“ bolnici, Beč. Na petoj godini sudjelovao na HIPON kongresu u Ateni i tokom ljetnog razdoblja bio na praksi u Houstonu, Teksas, na odjelu kardiorakalne kirurgije, onkologije i kardiologije. Na šestoj godini član organizacijskog odbora i aktivni sudionik kongresa SEEFORT. Tečno govorim i razumijem engleski, slovenski i njemački jezik.