

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**cfDNA KAO BIOMARKER**

**cfDNA AS A BIOMARKER**

**SEMINARSKI RAD**

Luka Tandarić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2017.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PRIMJENA cfDNA U DIJAGNOZI I PRAĆENJU MALIGNIH BOLESTI.....	3
2.1. Specifični markeri cfDNA za dijagnostiku i prognostiku određenih vrsta malignih tumora: .....	4
2.1.1. Karcinom pluća ne-malih stanica .....	4
2.1.2. Karcinom pluća malih stanica .....	5
2.1.3. Karcinom dojke .....	5
2.1.4. Karcinom prostate .....	6
2.1.5. Kolorektalni karcinom.....	6
2.1.6. Gliomi.....	7
2.1.7. Adenokarcinom gušterače .....	7
2.1.8. Hepatocelularni karcinom .....	8
2.1.9. Maligni melanomi .....	8
3. PRIMJENA cfDNA U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI .....	9
3.1. Određivanje spola.....	10
3.2. Određivanje Rh-fenotipa .....	10
3.3. Određivanje aneuploidije.....	11
3.4. Predviđanje spontanog pobačaja .....	11
4. ETIČKA PITANJA VEZANA ZA PRENATALNO TESTIRANJE POMOĆU cfDNA.....	12
5. FRAGMENTIRANOST cfDNA.....	13
6. POKUŠAJI KOMERCIJALIZACIJE .....	13
7. ZAKLJUČAK .....	13
8. REFERENCE .....	14
8.1. SAŽETAK.....	24
8.2. SUMMARY .....	24

## **1. UVOD**

Izvanstanična DNA (cfDNA, od eng. *cell-free DNA*), poznata još kao circulating cell-free DNA (cirkulirajuća cfDNA) (ccfDNA), oblik je genomskog materijala kojeg možemo pronaći u krvnoj plazmi/serumu (Mandel i Metais 1948.) kao dvolančanu molekulu vezanu za nukleosome. (Rumore i Steinman 1990.) cfDNA najčešće ima duljinu od oko 150bp (Underhill i sur. 2016.), što odgovara duljini DNA omotane oko jednog nukleosoma. Ostale duljine cfDNA odgovaraju duljinama DNA omotane oko više nukleosoma: 300bp (2 nukleosoma), 450bp (3 nukleosoma), itd. (Noll i Kornberg 1977.) Molekule cfDNA predstavljaju vrlo fragmentiranu staničnu DNA koja u krvotok dospijeva nakon smrti stanice apoptozom ili nekrozom. (Jahr i sur. 2001.) Prema vrsti stanica iz kojih dolazi, cfDNA može doći iz normalnih tjelesnih stanica, tumorskih stanica (Vasioukhin i sur. 1994.) (Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA, od eng. *circulating tumor DNA*)) i fetalnih stanica (Izvanstanična fetalna DNA (cffDNA, od eng. *cell-free fetal DNA*)). (Lo i sur. 1997.) Drugi načini nastanka cfDNA su: spontano izbacivanje novosintetiziranih nukleinskih kiselina (Anker i sur. 1975.), razgradnja krvnih stanica, razgradnja patogena kao što su bakterije i virusi te DNA fagocitirajućih leukocita. (Brinkmann i sur. 2004.) Cirkulirajuća DNA ponajviše se razgrađuje u jetri, a u manjim količinama i u bubrezima. (Chused i sur. 1972.) Kratak poluživot cfDNA (Lo i sur. 1999.) čini ju informativnim, vrlo specifičnim biomarkerom za promatranje fizioloških stanja u kojima postoji visoka razina apoptoze. (Henaio i sur. 2016.) U zdravih pojedinaca, koncentracija cirkulirajuće cfDNA je niska, budući da ju fagociti efikasno uklanjaju iz krvotoka, (Elshimali i sur. 2013.) zbog čega je njena izolacija, kao i određivanje porijekla nastanka otežano. Osim u krvi, cfDNA se kao biomarker može pronaći u urinu (Bryzgunova i sur. 2006.), sinovijalnoj tekućini (Leon i sur. 1981.), slini (Jiang i sur. 2005.), fecesu (Diehl i sur. 2008.) te drugim tjelesnim tekućinama.

P. Mandel i P. Metais prvi su opazili prisutstvo cfDNA u krvnoj plazmi 1948. (Mandel i Metais 1948., Volik i sur. 2016.) Bendich i suradnici su 1965., proučavanjem radioaktivne DNA izolirane iz plazme miševa, pretpostavili da cfDNA porijeklom iz malignog tumora može biti povezana s metastaziranjem tumora. (Bendich i sur. 1965., Volik i sur. 2016.) Godinu dana nakon toga, 1966., objavljena je prva poveznica između cfDNA i bolesti, kada su Tan i suradnici u krvi pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom opazili visoke razine cfDNA. (Tan i sur. 1966., Volik i sur. 2016.) 1977., Leon i suradnici su, mjerenjem serumske koncentracije DNA pacijenata s različitim tipovima malignih tumora, radioimunokemijskim metodama pokazali da je razina cfDNA u krvi najmanje polovice pacijenata s malignim tumorom znatno viša od one u kontrolnoj skupini, te da se koncentracija cfDNA nakon terapije zračenjem može povezati s uspješnošću liječenja. (Leon i sur. 1977., Volik i sur. 2016.)

Napretcima u biomedicini, patologiji i istraživanjima etiologije bolesti, korištenje DNA kao biomarkera u kliničkoj medicini postalo je rutina. Dostupnost i pouzdanost informacija iz DNA, bila ona iz jezgre ili mitohondrija, tkiva ili tjelesne tekućine, čini ju nezamjenjivim dijagnostičkim i prognostičkim alatom. (Elshimali i sur. 2013.) Većina DNA iz plazme zdravih osoba pripada Alu-sekvencijama (Van der Vaart i Pretorius 2008.), dok većina sekvencija cfDNA povezanih s bolestima u zdravim osobama nije prisutna. (Elshimali i sur. 2013.) Poboljšanje kvalitete života optimizacijom medicinske dijagnostike i unaprjeđivanje personalizirane/precizne medicine glavni su ciljevi korištenja cfDNA kao biomarkera, no uspostavljanje standardnog protokola prikupljanja uzoraka, obrade i analize cfDNA, te utvrđivanje vjerodostojnosti informacija dobivenih temeljem analize cfDNA i dalje predstavljaju veliki izazov. (Elshimali i sur. 2013.)

Osim kod dijagnoze i praćenja tumorskih bolesti i određivanja odgovora na terapiju, analiza cfDNA može poslužiti u svrhe prenatalne dijagnostike kao moderna i neinvazivna metoda. Otkriće fetalne cfDNA u majčinskom krvotoku 1997. od strane Lo i suradnika (Lo i sur. 1997.) dovelo je do mnogih istraživanja kojima se pokušavaju razviti neinvazivne tehnike dijagnosticiranja genski uvjetovanih bolesti pomoću cfDNA već u fetalnom razdoblju.

Osim tehnoloških zapreka, u obzir moraju biti uzeta i etička pitanja korištenja cfDNA, osobito kod prenatalne dijagnostike.

## **2. PRIMJENA cfDNA U DIJAGNOZI I PRAĆENJU MALIGNIH BOLESTI**

Zbog iznimno niskog udjela tumorske DNA u ukupnoj cfDNA, isprva su se pomoću cfDNA mogli detektirati samo tumori čije su genomske značajke već bile poznate, što se postizalo anlizom mutacija pomoću umanažanja DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*). (Vasioukhin i sur. 1994.) Nakon što je kao rezultat Projekta sekvenciranja ljudskog genoma došlo do značajnog tehnološkog napretka u metodama sekvenciranja, detekcija tumorske cfDNA postala je mnogo lakša. Uz pomoć metoda sekvenciranja nove generacije (NGS, od eng. *new generation sequencing*) otkrivene su nove genomske promjene specifične za tumore poput hipermetilacije promotorskih sekvencija, mikrosatelitne nestabilnosti, gubitka heterozigotnosti, itd. (Volik i sur. 2016.) Iz analize genoma tumorskih stanica u nekim slučajevima mogu se utvrditi njegove značajke, poput morfologije, smještaja u tijelu, odgovora na liječenje, itd. (Elshimali i sur. 2013.) Raspoznavanje tumora otežano je činjenicom da se tumori sastoje od više klonova stanica koji dijele samo neke genomske značajke. (Andor i sur. 2016.) Neke od promjena genoma tumorskih stanica koje utječu na pojavnost tumora su one u genima koji sudjeluju u popravku DNA (Long i sur. 2013.), regulaciji staničnog ciklusa (Perkins i sur. 2012.) i signalizaciji pomoću faktora rasta (Slattery i sur. 2013.), a dolaze u obliku (hiper)metilacije promotora (Chan i sur. 2008.), promjena u mikrosatelitima (Nakamoto i sur. 2008.), točkastih mutacija (Daniotti i sur. 2007.), itd. Budući da se tumori mogu raspoznati pomoću određenih promjena u genomu stanica iz kojih nastaju, a kojima su izazvani, izrada baze podataka genoma tumorskih stanica bila bi od kritične važnosti za raširenu primjenu analize cfDNA u dijagnozi i liječenju tumorskih bolesti.

Nadalje, tradicionalne metode uzorkovanja tumora biopsijom mogu predstavljati opasnost za pacijenta (Yamada i sur. 1993.), a analiza tumora iz arhiviranih uzorkaka ne mora nužno predstavljati trenutno stanje bolesti. Koncentracija cirkulirajuće DNA u pacijentima s tumorima varira od osobe do osobe i od tumora do tumora, no općenito je viša nego u zdravih ispitanika, a više koncentracije cfDNA u krvi često su povezane i s lošijim tijekom bolesti. (Elshimali i sur. 2013.) U istraživanju u kojem se analizirala koncentracija cfDNA u osobama s različitim tumorima dobivene su koncentracije između 0,5 i 1600 ng/mL, s medijanom od 17 ng/mL. (Perkins i sur. 2012.) cfDNA porijeklom iz tumora odlikuje se određenom veličinom i visokim stupnjem fragmentacije (Mouliere i sur. 2011.). Kada nije moguće izvesti opetovane biopsije tumora i ako analiza tumorskih uzoraka iz arhive bude nezadovoljavajuća, neinvazivna analiza cfDNA iz plazme može se pokazati korisnom metodom. (Elshimali i sur. 2013.)

## **2.1. Specifični markeri cfDNA za dijagnostiku i prognostiku određenih vrsta malignih tumora:**

### **2.1.1. Karcinom pluća ne-malih stanica**

Povišena metilacija promotora gena *DAPK* i *ECAD* naznaka je ranog stadija, dok je povišena metilacija promotora gena koji kodiraju p16 i *MGMT* naznaka uznapredovalog stadija karcinoma pluća ne-malih stanica (NSCLC, od eng. *non-small cell lung cancer*). (Russo i sur. 2005.) Detekcija povišene metilacije promotora gena *TMEFF2* u cfDNA u serumu pokazala se kao koristan dijagnostički biomarker specifičan za NSCLC, no potrebna su istraživanja koja bi povećala osjetljivost detekcije. (Lee SM i sur. 2012.) Nadalje, kao mogući dijagnostički alat pokazala se detekcija gubitka heterozigotnosti (LOH, od eng. *loss of heterozygosity*) na markerima *AR*, *ACTBP-2* i *UT 762* u plazmi i serumu pacijenata s NSCLC-om. (Bruhn i sur. 2000.) Detekcija mutiranog EGFR (receptora epidermalnog faktora rasta) u cfDNA iz plazme potencijalno se može koristiti za preciznije liječenje NSCLC-a, gdje se umjesto kemoterapije primjenjuju inhibitori tirozinske kinaze EGFR-a, poput erlotiniba i gefitiniba, te blokatori tirozinskih kinaza ErbB-a. (Wu i sur. 2017.)

### **2.1.2. Karcinom pluća malih stanica**

U cfDNA iz plazme pacijenata s karcinomom pluća malih stanica (SCLC, od eng. *small cell lung cancer*) pronađene su mutirane sekvencije tumorskog supresora *TP53* (Fernandez-Cuesta i sur. 2016.), no u puno manjem postotku uzoraka negoli u istraživanju koje je analizom tkivnih uzoraka tumora karakteriziralo mutirani *TP53* kao glavnu značajku SCLC-a. (George i sur. 2015.) Osim potrebe za povećanjem osjetljivosti i specifičnosti kod detekcije mutiranog *TP53* u plazmi, još jedan problem predstavlja pojava mutirane sekvencije *TP53* koja se u obliku cfDNA može naći i kod zdravih osoba. (Fernandez-Cuesta i sur. 2016.)

### **2.1.3. Karcinom dojke**

Amplifikacija gena *HER2/Neu* često je prisutna u karcinomu dojke (Van de Vijver i sur. 1987.) pa je na temelju nje određen i podtip ovoga tumora. Navedena amplifikacija može se detektirati iz cfDNA iz krvi oboljelih pacijenata, (Page i sur. 2011.) što bi se moglo koristiti kao biomarker za podtip karcinoma dojke HER2+. Za određivanje prisutnosti i stanja karcinoma dojke pomoću cfDNA mogu se koristiti i analize gubitka heterozigotnosti markera D3S1605 (TIG1), D10S1765 (PTEN), D12S1725 (ciklin-D2), D13S218 (RB1), i D17S855 (BRCA1). Gubitak heterozigotnosti navedenih markera povezan je s agresivnijim oblicima HER2+ karcinoma dojke, lošijim tijekom bolesti i povećanom stopom metastaziranja u limfne čvorove. (Schwarzenbach i sur. 2012.) Detekcija hipermetilacije promotora *Erβ* i *RARβ2* u serumskoj cfDNA povezana je s pojavnošću invazivnog dukalnog karcinoma dojke, a istovremena detekcija hipermetilacije promotora obaju gena povezana je s kraćim ukupnim preživljenjem. (Mirza i sur. 2012.) Hipermetilirani promotori gena *ESR1* i *14-3-3-σ* u serumu također predstavljaju mogućnost razvitka nove dijagnostičke metode za karcinom dojke, no potrebna su daljnja istraživanja zbog pojavnosti metilacije promotora gena *14-3-3-σ* i kod benignih bolesti dojke. (Martinez-Galan i sur. 2008.) Kod pacijenata s primarnim karcinomom dojke, detekcija hipermetiliranih promotora gena *APC* i *RASSF1A* u serumu nagoviješta lošu prognozu. (Müller H.M. i sur. 2003.)

#### **2.1.4. Karcinom prostate**

Budući da se povišena metilacija promotora gena *GSTP1* na kromosomu 11q13 pojavljuje u više od 90% slučajeva karcinoma prostate (PC, od eng. *prostate cancer*) (Lee WH i sur. 1997.), vjeruje se da bi se dokazivanjem prisutnosti navedene mutacije u cfDNA otvorio put razvrtiku novih neinvazivnih dijagnostičkih testova. Dokazivanje prisutnosti hipermetilirane promotorske cfDNA gena *GTSP1*, ne samo u plazmi i serumu, već i u urinu i ejakulatu, uspjelo je Goesslu i suradnicima. (Goessl i sur. 2001.) *GTSP1*, kao i *PTGS2*, mogu se koristiti kao cfDNA biomarkeri kojima se može razlikovati PC i benigna hipertrofija prostate (BPH, od eng. *benign prostate hypertrophy*). (Ellinger i sur. 2008., Goessl i sur. 2001.) Analizom cfDNA iz plazme pacijenata s karcinomom prostate utvrđena je poveznica između prisutnosti cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC, od eng. *circulating tumor cells*) i LOH markera D8S137 (dematin), D9S171 (CDKN2/p16) i D17S855 (BRCA1), što bi moglo poslužiti kao biomarker za detekciju različitih faza metastaziranja. (Schwarzenbach i sur. 2009.) Detekcija kombinacija LOH markera D8S286\*D9S171 i D6S1631\*D8S286\*D9S171 u cfDNA iz plazme usko je povezana s agresivnijim oblikom tumora. (Müller I. i sur. 2008.)

#### **2.1.5. Kolorektalni karcinom**

Promoću detekcije povišene metilacije promotora gena *SEPT9*, *NGFR* i *TMEFF2* u cfDNA iz plazme moguće je dijagnosticirati pojavu kolorektalnog karcinoma (CRC, od eng. *colorectal carcinoma*), no za potvrdu pozitivnih rezultata preporuča se naknadna kolonoskopija. (Lofton-Day i sur. 2008.) Nadalje, kao dijagnostički markeri u serumskoj cfDNA mogu poslužiti povišene metilacije promotora gena *HTLF*, *HPP1* i *hMLH1*. Od njih, detekcija hipermetiliranog promotora gena *HTLF* i/ili *HPP1* povezana je s veličinom i stadijem tumora, stupnjem metastaze te općenito lošijim ishodom, dok je prisutnost hipermetilacije promotora gena *hMLH1* povezana samo s veličinom tumora. Prisutnost hipermetiliranog promotora gena *HPP1* ima značajnu pozitivnu korelaciju s detekcijom karcinoembrionog antigena (CAE, od eng. *carcinoembryonic antigen*) u serumu (Wallner i sur. 2006.). Mjerenje razine CAE koristi se za određivanje stadija CRC (Compton i sur. 2000.). Pacijenti s metastazirajućim karcinomom debelog crijeva koji nosi mutaciju gena *KRAS* ne odgovaraju na terapiju antitijelima specifičnim za EGFR (Lièvre i sur. 2006., Amado i sur. 2008.), a pacijenti s CRC-om koji nosi mutaciju BRAFV600E imaju kraće ukupno preživljenje (Fariña-Sarasqueta i sur. 2010.) Obje mutacije moguće je s visokom specifičnošću i osjetljivošću detektirati korištenjem cfDNA iz plazme. (Thierry i sur. 2014.)



### **2.1.6. Gliomi**

Delecija u genu *EGFR*, kojom nastaje varijanta III receptora epidermalnog faktora rasta (EGFRvIII), kod pacijenata s glioblastomom povezana je s lošijim preživljenjem, kraćim od jedne godine nakon resekcije tumora. (Heimberger i sur. 2005.) Kako bi se pratio odgovor pacijenata na liječenje, tj. uspješnost kirurškog odstranjanja tumora, moguće je analizirati razinu EGFRvIII DNA u plazmi. (Salkeni i sur. 2013.) Hipermetilacije promotora gena *p14ARF* i *p15INK4B* pokazane su kao markeri oligodendroglijalnih tumora, (Wolter i sur. 2001.) dok se kod astrocitoma kao markeri koriste analize povišene metilacije promotora gena *RASSF1A* i *MGMT*. (Lorente i sur. 2009.) Navedena četiri markera moguće je analizirati pomoću cfDNA iz seruma i povezati s pojavom tumora, zbog čega postoji mogućnost njihovog korištenja u neinvazivnim dijagnostičkim testovima, no potrebno je razviti testove s većom specifičnošću. Nadalje, određivanjem razine metilacije promotora gena *RASSF1A* moguće je razlikovati gliom od sekundarnih tumora mozga. (Lorente i sur. 2009)

### **2.1.7. Adenokarcinom gušterače**

Budući da djelotvorni načini dijagnoze karcinoma gušterače dosad nisu otkriveni, pojava karcinoma najčešće se potvrđuje tek nakon pojave simptoma. (Elshimali i sur. 2013.) Kako bi se smanjila smrtnost vezana za nemogućnost rane dijagnoze, provedena su mnoga istraživanja vezana za rano otkrivanje karcinoma gušterače preko cfDNA. Neki od obećavajućih markera su hipometilacije promotora gena *CCND2*, *SOCS1*, *THBS1*, *PLAU*, i *VHL*. Veća pojavnost hipometilacije ovih markera detektirana je u cfDNA iz plazme pacijenata s različitim stadijima adenokarcinoma gušteračnog voda, nego u zdravih kontrola. (Melnikov i sur. 2009.) Panel gena čijom analizom metilacije iz cfDNA bi se mogao detektirati adenokarcinom gušterače sastoji se od *BMP3*, *RASSF1A*, *BNC1*, *MESTv2*, *TFPI2*, *APC*, *SFRP1* i *SFRP2*. Navedenim panelom moguće je i razlikovati pojavu tumora od pankreatitisa. (Henriksen i sur. 2016.)

### **2.1.8. Hepatocelularni karcinom**

Detekcija mikrosatelitne nestabilnosti markera D8S277 u cfDNA iz plazme mogla bi poslužiti kao dijagnostički alat, (Pang i sur. 2006.) dok bi detekcija gubitka heterozigotnosti markera D8S298 pomoću cfDNA iz plazme mogla poslužiti kao odlika metastaze hepatocelularnog karcinoma (HCC, od eng. *hepatocellular carcinoma*). (Pang i sur. 2007.) Za uspostavljanje rane dijagnoze HCC-a može se koristiti detekcija hipermetilacije promotora gena *GTSP1* u cfDNA iz seruma, (Wang i sur. 2006.) te detekcija hipermetilacije promotora gena *p15* i *p16*. (Wong i sur. 2000., Wong i sur. 1999.) Nadalje, kao prognostički marker moguće je uzeti opću hipometilaciju ponavljajućih sekvencija LINE-1. Stupanj hipometilacije LINE-1 sekvencija u serumskoj cfDNA pozitivno korelira s napretkom HCC-a i njegovom invazivnošću, te s manjom šansom oporavka/preživljenja. (Tangkijvanich i sur. 2007.) Pojava HCC-a induciranog aflatoksinom može se povezati s mutacijama gena *CTNGB1* i točkastom mutacijom na 249. kodonu gena *TP53*, što je moguće detektirati u cfDNA iz seruma. (Hosny i sur. 2008.)

### **2.1.9. Maligni melanomi**

Točkasta mutacija BRAFV600E pojavljuje se u većini slučajeva kožnog melanoma. (Davies i sur. 2002.) Njena detekcija u serumu ili plazmi pacijenata s uznapredovalim stadijem kožnog melanoma ima potencijalnu primjenu u praćenju razvoja bolesti i liječenja, no zasad nije primjenjiva kod rane detekcije. (Daniotti i sur. 2007.) Kao dijagnostički i prognostički markeri melanoma mukoze proučavani su gubitci homozigotnosti markera D1S243, D6S311, D9S161, D19S246 u cfDNA iz plazme. Iako u navedenom istraživanju zbog malog broja ispitanika nije bilo moguće dobiti korelaciju između pojave gubitka heterozigotnosti navedenih markera i svojstava tumora, uočeno je da pacijenti s dva mutirana markera u prosjeku imaju veću tumorsku masu od onih s jednim ili nijednim mutiranim markerom. (Takagi i sur. 2007.) U drugom istraživanju proučavani su gubitci heterozigotnosti drugih markera u cfDNA iz plazme. Mutacija markera D3S1293 i parova markera D9S157/D3S1293, D9S157/D1S228 i D11S925/D3S1293 predstavljene su kao statistički značajne pri korelaciji sa stadijem oboljenja. (Fujiwara i sur 1999.) Za dijagnozu kožnog melanoma može poslužiti analiza hipermetilacije promotora gena *RASSF1A* u cfDNA iz plazme. (Salvianti i sur. 2015.)

### **3. PRIMJENA cfDNA U PRENATALNOJ DIJAGNOSTICI**

Kako bi se pripremila primjerena terapija, indiciralo stanje za prekid trudnoće ili dalo vremena za uspostavljanje financijske, psihološke i socijalne spremnosti roditelja za odgoj djeteta s mogućim problemima u razvoju, potrebno je obaviti pretrage za detekciju takvih stanja. Za dijagnosticiranje anatomskih i fizioloških poremećaja u prenatalnom razdoblju danas se i dalje koriste različite invazivne metode, koje mogu imati štetan utjecaj na plod i povećati rizik spontanog pobačaja. Neke od tih metoda manje su invazivne, poput analize određenih proteina u majčinom serumu i transcervikalno uzorkovanje trofoblastnih stanica, dok su neke metode više invazivne, no obično se provode kod trudnoća gdje se manje invazivnim metodama ne može dobiti mnogo informacija o stanju ploda. Amniocenteza, kordocenteza, embrio-/fetoskopija i uzorkovanje korionskih resica primjeri su visoko invazivnih metoda prenatalne dijagnostike.

Kako bi se rizik spontanog pobačaja kao posljedica testiranja doveo što bliže nuli, trenutno se provode mnoga istraživanja o mogućnostima analize genomskog materijala ploda uzorkovanjem majčine krvi. Slobodna cirkulirajuća fetalna DNA dolazi iz stanica trofoblasta (Sekizawa i sur. 2003.) i u majčinom krvotoku se nalazi u relativno malom udjelu od 3 do 6% ukupne cfDNA. (Lo i sur. 1998b) Brzo se odstranjuje iz majčinog krvotoka nakon poroda, što znači da je specifična za određenu trudnoću. (Lo i sur. 1999.) Analizom duljine cfDNA u krvotoku trudnica, Allen Chan i suradnici došli su do otkrića da je fetalna cfDNA kraća od majčinske, te da bi se obogaćivanje uzorka plazme fetalnom cfDNA i olakšavanje njene analize moglo provesti frakcionacijom prema veličini. (Chan i sur. 2004.) Poon i suradnici pretpostavili su da se fetalna od majčinske cfDNA može razlikovati i prema stupnju metilacije određenih područja genoma. (Poon i sur. 2002.) Razvitkom dijagnostičkih testova koji bi bili dovoljno osjetljivi i specifični za detekciju relativno malog udjela cfDNA ploda u krvi majke, današnje relativno invazivne metode bile bi zamijenjene jednostavnim, efikasnim, jeftinim i relativno neinvazivnim molekularnim metodama analize uzorka krvi.

### **3.1. Određivanje spola**

Određivanje spola prije rođenja tradicionalno se vrši vizualizacijom spolnih organa fetusa pomoću ultrazvuka i može se obaviti najranije u jedanaestom tjednu trudnoće. No nekada nije moguće dobiti dobru sliku. Određivanje spola može poslužiti i kod odluke o provođenju invazivnijih metoda testiranja za X-vezane recesivne bolesti (uzorkovanje korionskih resica). Ako se pokaže da je fetus ženskog spola, invazivniji testovi nisu potrebni. Budući da se uzorkovanje korionskih resica najčešće provodi u 10. i 11. tjednu trudnoće, spol je potrebno odrediti prije tog razdoblja. Ovakvo rano određivanje spola moguće je obaviti pomoću analize fetalne cfDNA iz majčinskog krvotoka (i plazme i seruma). Navedena metoda koristi PCR umnažanje sekvencija koje se nalaze na Y-kromosomu (SRY, DYS14 i DAZ), tj. ne nalaze se u majčinom genomu. Ova metoda nosi sa sobom veliku osjetljivost i specifičnost do čak 100%, gdje se pozitivan rezultat tumači kao muški spol, a negativan kao ženski spol (osim u slučaju dvojajčanih blizanaca) i može se koristiti za određivanje spola od čak 5. tjedna trudnoće, no točnost rezultata doseže 100% tek u 7. tjednu. (Zargari i sur. 2011., Honda i sur. 2002.)

### **3.2. Određivanje Rh-fenotipa**

Ako je majka RhD-negativna, a otac heterozigot za gen *RhD*, postoji 50%-tna šansa za pojavu hemolitičke bolesti novorođenčadi kod djeteta. Kao preventivna mjera, u Ujedinjenom Kraljevstvu se svim trudnicama koje su RhD-negativne daje anti-D imunoglobulin, bez obzira na potencijalni RhD-status djeteta, što je u slučajevima djeteta koje je RhD-negativno nepotrebno i dodatni je trošak na zdravstveni sustav. Kako bi se odredio Rh status ploda rano u trudnoći radi sprječavanja hemolitičke bolesti i smanjenja nepotrebne primjene liječenja, tijekom godina su se razvijale razne tehnike određivanja Rh-fenotipa ploda. Jedna od njih je detekcija DNA sekvencija lokusa *RhD* iz fetalnih stanica dobivenih uzorkovanjem korionskih resica i amniocentezom. Iako metoda daje izvrsne rezultate, zbog načina dobivanja uzoraka postoji opasnost od induciranja spontanog pobačaja ili pojačanog senzibiliziranja majke. (Bennett i sur. 1993.) Druga metoda analize DNA koristila je fetalne stanice izolirane iz majčinog krvotoka. Iako su dobiveni zadovoljavajući rezultati, navedena metoda problematična je zbog složenosti, troška, dugotrajnosti i potrebe za izolacijom velikog broja fetalnih stanica. (Lo i sur. 1993.) (Geifman-Holtzman i sur. 1996.) Najnovijim neinvazivnim postupcima analize fetalne cfDNA izolirane iz plazme i seruma majke pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, od eng. *real-time polymerase chain reaction*) moguće je brzo, jednostavno i uz malo troška, te sa skoro 100%-tnom točnošću odrediti RhD-genotip ploda. (Lo i sur. 1998a)

### **3.3. Određivanje aneuploidije**

Određivanje aneuploidije obično se provodi kariotipizacijom fetalnih stanica dobivenih invazivnim postupcima amniocenteze ili uzorkovanja korionskih resica. Kvantitativnim molekularnim metodama moguće je u prvom tromjesečju preko pojavnosti sekvencija specifičnih za određene kromosome i analize metilacije specifičnih gena (npr. *PDE9A*) u majčinskom serumu odrediti nosi li fetus aneuploidiju (najčešće kromosoma X, Y, 13, 18, 21, itd.). (Fan i sur. 2008., Papageorgiou i sur. 2011., Lim i sur. 2011., Lo i sur. 2007.)

### **3.4. Predviđanje spontanog pobačaja**

Predviđanje spontanog pobačaja moguće je napraviti rano u prvom tromjesečju mjerenjem serumske razine ljudskog korionskog gonadotropina beta i mjerenjem određenih morfoloških karakteristika ploda kao što su srednji promjer gestacijske vreće, i duljina od tjemena do trtice, mjerenjem brzine otkucaja srca fetusa ultrazvučnom vizualizacijom ploda i maternice. (El-Mekkawi i sur. 2008.) Više od polovine spontanih pobačaja povezano je s pojavom fetalne aneuploidije. (Nagaishi i sur. 2004., Kajii i sur. 1980.) Nedavna istraživanja pokazala su pozitivnu korelaciju između količine fetalne cfDNA u majčinom krvotoku i pojavnosti spontanog pobačaja vezanog uz kromosomske aneuploidije, što bi moglo poslužiti za neinvazivno predviđanje spontanog pobačaja. (Lim i sur. 2013., Aihua i sur. 2007.)

#### **4. ETIČKA PITANJA VEZANA ZA PRENATALNO TESTIRANJE POMOĆU cfDNA**

Sve bržim razvitkom tehnologije kroz posljednjih nekoliko desetljeća postalo je samo pitanje vremena kada će molekularne analize fetalne cfDNA postati glavna metoda prenatalne dijagnostike i u kojoj će mjeri biti moguće dobiti informacije o određenim genomskim obilježjima ploda, bile one vezane za bolest ili ne.

Neke od prednosti analize fetalne cfDNA su neinvazivnost i s time smanjen rizik od induciranja spontanog pobačaja; mogućnost dobivanja informacija o statusu ploda mnogo ranije u trudnoći negoli primjenjujući tradicionalne metode prenatalne dijagnostike poput amniocenteze, što bi dalo više vremena za odluku o prekidu trudnoće; te jednostavnost i ekonomičnost provođenja testova, čime se omogućuje dobivanje velike količine informacija o zdravstvenom stanju fetusa i promjenama njegova genoma.

Kome će određene informacije biti dostupne i kako će one utjecati na odluku o prekidu trudnoće glavna su etička pitanja koja ova tehnologija sa sobom nosi. Zbog mogućnosti donošenja odluke o prekidu trudnoće zbog genetičkih osobina nevezanih uz bolest, poput spola, ili zdravstvenih stanja koja smanjuju kvalitetu života, ali ne ugrožavaju život djeteta i za koje postoji razvijena terapija, prije raširenog pružanja određenih genetičkih testova parovima potrebno je odrediti socijalne okolnosti i viđenja određenih genskih svojstava i pomoću toga odrediti koja su testiranja primjerena u kojem kontekstu. No, ipak postoji pitanje ostavljanja takve odluke u rukama roditelja, koji imaju pravo izbora o odgajanju potomstva određenih svojstava. Ono oko čega bi se trebalo voditi brigu jest nepristrano i detaljno informiranje roditelja od strane profesionalaca u području medicine o određenim genomskim svojstvima i potencijalnim promjenama koje njihovo buduće dijete može imati.

Još jedna primjena prenatalnog genetičkog testiranja koju treba uzeti u obzir je određivanje očinstva. Ako je žena nesigurna o identitetu djetetova oca, prenatalnim testiranjem mogla bi dobiti tu informaciju. Time bi se moglo izvjestiti biološkog oca i ukloniti nesigurnosti oko očinstva, no moglo bi se i koristiti kao prekretnica u odluci o prekidu trudnoće ako žena želi nositi dijete samo određenog muškarca. (Newson 2008.)

## **5. FRAGMENTIRANOST cfDNA**

Općenito, promatrajući duljine cirkulirajuće cfDNA, može se primjetiti veća fragmentiranost cfDNA kod osoba oboljelih od tumora negoli u zdravim osobama. Selekcija kraćih fragmenata cfDNA u ispitivanom uzorku može pomoći u preciznijem dijagnosticiranju tumora koji ne metastaziraju. (Underhill i sur. 2016.) Nadalje, otkriveno je i da se fetalna cfDNA pojavljuje u manjim fragmentima od majčine cfDNA, što također može pomoći u poboljšanju kvalitete uzoraka fetalne cfDNA. (Lo i sur. 2010.)

## **6. POKUŠAJI KOMERCIJALIZACIJE**

Praktične primjene nadzora tumora preko krvi potaknule su njihovu komercijalizaciju. Do danas, jedan od najuspješnijih pothvata u tom području je tvrtka *Guardian Health Inc.* Njihov vlastiti pristup varijacija je metode barkodiranja i imenovana je „digitalno sekvenciranje“. Tvrtka tvrdi da je ovaj postupak 5 do 10 puta efikasniji od drugih postojećih postupaka i da se alelni oblici s otprilike 0,1%-tnom prisutnošću mogu detektirati s iznimno visokom specifičnošću. (Volik i sur. 2016.)

Jedna od potencijalnih primjena cfDNA koja se već dugo smatra mogućom jest otkrivanje malignog tumora prije pojave ikakvih simptoma. No, zbog poteškoća i visokog troška, ne postoje istraživanja koja su našla pouzdanu, širokoprимjenjivu metodu. Usprkos potrebe za poduhvatom „razmjera potrage za svetim gralom“, tvrtka *Illumina Inc* objavila je pokretanje tvrtke GRAIL, koja će raditi na razvitku metode ranog otkrivanja malignih tumora u asimptomatičnih pojedinaca na bazi cfDNA. (Volik i sur. 2016.)

## **7. ZAKLJUČAK**

Dijagnostičke metode koje koriste cfDNA tek se razvijaju i bit će potrebna mnoga opsežna istraživanja kako bi se uspostavila jednoznačna baza podataka biomarkera pomoću koje će se navedene pretrage moći široko primjenjivati u kliničkoj praksi. Kao i svaka druga novina u medicini, i ova sa sobom nosi mnoga etička pitanja, osobito kada se radi o prenatalnoj dijagnostici.

## **8. REFERENCE**

- Aihua Y, Xiangzhong Z, Yunshao H, Jing W, Leung.KY, 2007. Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding. *Hum Reprod* (2007) 22 (6): 1736-1743.
- Amado RG i sur., 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1626–1634 (2008).
- Andor N, Graham TA, Jansen M, Xia LC, Aktipis CA, Petritsch C, i sur., 2016. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med* 2016;22:105–13
- Anker P, Stroun M, Maurice PA, 1975. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res* 35: 2375–2382, 1975
- Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E, 1965. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science.* 1965;148:374–376
- Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, i sur., 1993. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993;329:607-610
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, i sur., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532–5
- Bruhn N, Beinert T, Oehm C, Jandrig B, Petersen I, Chen XQ, Possinger K, Fleischhacker M, 2000. Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;906:72–82
- Bryzgunova OE, Skvortsova TE, Kolesnikova EV, Starikov AV, Rykova EY, Vlassov VV, Laktionov PP, 2006. Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1075:334–340
- Chan KC, Lai PB, Mok TS, Chan HL, Ding C, Yeung SW, Lo YM, 2008. Quantitative analysis of circulating methylated DNA as a biomarker for hepatocellular carcinoma. *Clin. Chem.* 2008;54:1528–1536
- Chan KCA, i sur. 2004. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 50(1):88–92.



- Chused TM, Steinberg AD, Talal N, 1972. The clearance and localization of nucleic acids by New Zealand and normal mice. *Clin Exp Immunol.* 1972 Dec;12(4):465–476
- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP, 2000. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88:1739–57.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, i sur., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949–54.
- Daniotti M, Vallacchi V, Rivoltini L, Patuzzo R; Santinami M, Arienti F, Cutolo G, Pierotti MA, Parmiani G, Rodolfo M, 2007. Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III-IV melanoma patients. *Int. J. Cancer.* 2007;120:2439–2444
- Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, i sur., 2008. Analysis of Mutations in DNA Isolated From Plasma and Stool of Colorectal Cancer Patients. *Gastroenterology.* 2008;135:489–98
- Ellinger J, P Bastian, K Haan, i sur., 2008. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer.* 2008; 122(1):138-43
- El-Mekkawi SF, El-Shahawy HF, Alyamni OM, 2015. Prediction of spontaneous miscarriage risk by the use of first trimester ultrasound measurements and maternal serum progesterone level at the 7th week of pregnancy. *Middle East Fertility Society Journal,* Volume 20, Issue 1, March 2015, Pages 16-20
- Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama JV, 2013. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(9):18925-18958.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR, 2008. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(42):16266-16271.

- Fariña-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Moerland E, Creemers GJ, Lemmens VE, Rutten HJ, van den Brule AJ, 2010. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Ann Oncol.* 2010;21:2396–402
- Fernandez-Cuesta L, Perdomo S, Avogbe PH, i sur., 2016. Identification of Circulating Tumor DNA for the Early Detection of Small-cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* 2016;10:117-123.
- Fujiwara Y, Chi DDJ, Wang H, Keleman P, Morton DL, Turner R, Hoon DSB, 1999. Plasma DNA microsatellites as tumor-specific markers and indicators of tumor progression in melanoma patients. (1999) *Cancer Research*, 59 (7) , pp. 1567-1571.
- Geifman-Holtzman O, Bernstein IM, Berry SM, i sur., 1996. Fetal RhD genotyping in fetal cells flow sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:818-822
- George J, Lim JS, Jang SJ, i sur., 2015. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 2015;524(7563):47-53.
- Goessl C, Müller M, Heicappell R, Krause H, Miller K, 2001. DNA-Based Detection of Prostate Cancer in Blood, Urine, and Ejaculates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945: 51–58.
- Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, Yang D, Weinberg J, Gilbert M, Sawaya R, Aldape K, 2005. Prognostic Effect of Epidermal Growth Factor Receptor and EGFRvIII in Glioblastoma Multiforme Patients. *Clin Cancer Res* February 15 2005 (11) (4) 1462-1466
- Henao Diaz E, Yachnin J, Grönberg H, Lindberg J, 2016. The In Vitro Stability of Circulating Tumour DNA. Chalmers J, ed. *PLoS ONE.* 2016;11(12):e0168153.
- Henriksen, SD, Madsen, PH, Larsen, AC, Johansen, MB, Drewes, AM, Pedersen, IS, Krarup H, Thorlacius-Ussing, O, 2016. Cell-free DNA promoter hypermethylation in plasma as markers for pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*, 16(3).
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y i sur., 2002. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* (2002) 110: 75.

- Hosny G, Farahat N, Tayel H, Hainaut P, 2008. Ser-249 TP53 and CTNNB1 mutations in circulating free DNA of Egyptian patients with hepatocellular carcinoma versus chronic liver diseases. *Cancer Lett.* 2008;264:201–208.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, i sur., 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659–65
- Jiang WW, Masayeva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E, i sur., 2005. Increased Mitochondrial DNA Content in Saliva Associated with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2486–91
- Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S, 1980. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet.* 1980;55(1):87-98.
- Lee SM, Park JY, Kim DS, 2012. Methylation of TMEFF2 Gene in Tissue and Serum DNA from Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecules and Cells.* 2012;34(2):171-176.
- Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG, 1997. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 6: 443-450, 1997.
- Leon SA, Revach M, Ehrlich GE, Adler R, Petersen V, Shapiro B, 1981. DNA in synovial fluid and the circulation of patients with arthritis. *Arthritis Rheum.* 1981;24:1142–50
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ, 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646–50
- Lièvre A i sur., 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992–3995 (2006).
- Lim JH, Kim MH, Han YJ, i sur., 2013. Cell-Free Fetal DNA and Cell-Free Total DNA Levels in Spontaneous Abortion with Fetal Chromosomal Aneuploidy. El-Maarri O, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e56787.
- Lim JH, Kim SY, Park SY, i sur., 2011. Non-Invasive Epigenetic Detection of Fetal Trisomy 21 in First Trimester Maternal Plasma. Nizami Q, ed. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27709.

- Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, i sur., 2010. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010;2(61):61ra91 Epub 2010/12/15.
- Lo YM, Lun FMF, Chan KCA, i sur., 2007. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(32):13116-13121.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM, 1999. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American Journal of Human Genetics.* 1999;64(1):218-224.
- Lo YM, N Magnus Hjelm, Carrie Fidler, Ian L Sargent, Michael F Murphy, Paul F Chamberlain, Priscilla MK Poon, Christopher WG Redman, James S Wainscoat, 1998a. Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma. *N Engl J Med* 1998; 339:1734-1738
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, i sur., 1998b. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American journal of human genetics.* 1998;62(4):768–75. Epub 1998/06/13.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, i sur., 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7
- Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, i sur., 1993. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 1993;341:1147-1148
- Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, i sur., 2008. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin. Chem.* 2008;54:414–423.
- Long XD, Zhao D, Wang C, Huang XY, Yao JG, Ma Y, Wei ZH, Liu M, Zeng LX, Mo XQ, i sur., 2013. Genetic polymorphisms in DNA repair genes XRCC4 and XRCC5 and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma. *Epidemiology.* 2013;24:671–681
- Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, Lass U, von Deimling A, Castresana JS, 2009. RASSF1A, BLU, NORE1A, PTEN and MGMT expression and promoter

- methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of de novo DNMTs. *Brain Pathol.* 2009;19:279–292.
- Mandel P, Metais P, 1948. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme *CR Acad. Sci. Paris*, 142 (1948), pp. 241-243
- Martinez-Galan J, Torres B, Del Moral R, Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Villalobos M, Nunez MI, Luna J de D, Oliver FJ, Ruiz de Almodovar JM, 2008. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(6):958–965.
- Melnikov AA, Scholtens D, Talamonti MS, Bentrem DJ, Levenson VV, 2009. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 2009 Feb 1;99(2):119-22.
- Mirza S, Sharma G, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R, 2012. Clinical significance of promoter hypermethylation of ER $\beta$  and RAR $\beta$ 2 in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2012;19:3107–3115
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR, 2011. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011;6:e23418
- Müller I, Beeger C, Alix-Panabières C, Rebillard X, Pantel K, Schwarzenbach H, 2008. Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: Potential and technical improvements. *Clin. Chem.* 2008;54:688–696
- Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C, Widschwendter M, 2003. DNA methylation in serum of breast cancer patients: An independent prognostic marker. *Cancer Res.* 2003;63:7641–7645
- Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J, 2004. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res.* 2004 Jun;30(3):237-41.

- Nakamoto D, Yamamoto N, Takagi R, Katakura A, Mizoe JE, Shibahara T, 2008. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of malignant mucosal melanoma using whole genome amplification. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 2008;49:77–87
- Newson AJ, 2008. Ethical aspects arising from non-invasive fetal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008 Apr;13(2):103-8.
- Noll M., and Kornberg R.D, 1977. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of H1. *J. Mol. Biol.* 109, 393–404.
- Page K, Hava N, Ward B, i sur., 2011. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer.* 2011;104(8):1342-1348.
- Pang JZ, Qin LX, Wang QQ, Ren N, Sun BS, Lin GL, Ye QH, Liu YK, Tang ZY, 2007. Loss of heterozygosity of plasma circulating DNA from hepatocellular carcinoma patients and its clinical significance. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2007;15:906–909.
- Pang JZ, Qin LX, Ren N, Ye QH, Ying WD, Liu YK, Tang ZY, 2006. Microsatellite alterations of circulating DNA in the plasma of patients with hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006;86:1662–1665.
- Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC, 2011. Fetal-specific DNA methylation ratio permits non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nature medicine.* 2011;17(4):510-513.
- Perkins G, Yap TA, Pope L, i sur., 2012. Multi-Purpose Utility of Circulating Plasma DNA Testing in Patients with Advanced Cancers. Perez-Gracia JL, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e47020.
- Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YMD, 2002. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2002;48:35–41.
- Rumore PM, Steinman CR, 1990. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest.* 1990;86:69–74.

- Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF, i sur., 2005. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2466–70
- Salkeni, MA, Zarzour, A, Ansay, TY i sur., 2013. Detection of EGFRvIII mutant DNA in the peripheral blood of brain tumor patients. *J Neurooncol* (2013) 115: 27.
- Salvianti F, Orlando C, Massi D, De Giorgi V, Grazzini M, Pazzagli M, i sur., 2015. Tumor-related methylated cell-free DNA and circulating tumor cells in melanoma. *Front Mol Biosci.* 2015;2:76.
- Schwarzenbach H, Eichelsner C, Kropidlowski J, Janni W, Rack B, Pantel K, 2012. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 2012;18:5719–5730
- Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, Pantel K, 2009. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:1032–1038
- Sekizawa, A, Yokokawa, K, Sugito, Y, Iwasaki, M, Yukimoto, Y, Ichizuka, K i sur., 2003. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet.* 2003; 113: 307–310
- Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR, Hines L, Baumgartner KB, Torres-Mejia G, Wolff RK, 2013. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: The breast cancer health disparities study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013;140:587–601
- Takagi R, Nakamoto D, Mizoe JE, Tsujii H, 2007. LOH analysis of free DNA in the plasma of patients with mucosal malignant melanoma in the head and neck. *Int. J. Clin. Oncol.* 2007;12:199–204.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG, 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966;45:1732–40

- Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A, 2007. Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* 2007;379:127–133.
- Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, i sur., 2014. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* 20:430–435 (2014).
- Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, i sur., 2016. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. Kwiatkowski DJ, ed. *PLoS Genetics.* 2016;12(7):e1006162.
- Van der Vaart M, Pretorius PJ, 2008. A method for characterization of total circulating DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1137:92–97
- Van de Vijver M, van de Bersselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Peterse J, Nusse R, 1987. Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Molecular and Cellular Biology.* 1987;7(5):2019-2023.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M, 1994. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774–9
- Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C, 2016, Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies, 10.1158/1541-7786.MCR-16-0044
- Yamada N, Shinzawa H, Ukai K, Wakabayashi H, Togashi H, Takahashi T, i sur., 1993. Subcutaneous seeding of small hepatocellular carcinoma after fine needle aspiration biopsy. *J Gastroenterol Hepatol.* 1993;8:195–8
- Wallner M, Herbst A, Behrens A, Crispin A, Stieber P, Göke B, Lamerz R, Kolligs FT, 2006. Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006;12:7347–7352.
- Wang J, Qin Y, Li B, Sun Z, Yang B, 2006. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1 in the tumor and serum of Chinese human primary hepatocellular carcinoma patients. *Clin Biochem.* 2006;39:344–348.



- Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP, Reifenberger G, 2001. Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:1170–1180
- Wong IH, Lo YM, Yeo W, Lau WY, Johnson PJ, 2000. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3516–3521.
- Wong IH, Lo YM, Zhang J, Liew CT, Ng MH, Wong N, Lai PB, Lau WY, Hjelm NM, Johnson PJ, 1999. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59:71–73.
- Wu Y-L, Sequist LV, Hu C-P, i sur., 2017. EGFR mutation detection in circulating cell-free DNA of lung adenocarcinoma patients: analysis of LUX-Lung 3 and 6. *British Journal of Cancer.* 2017;116(2):175-185.
- Zargari M, Sadeghi MR, Shahhosseiny MH, i sur., 2011. Fetal Sex Determination using Non-Invasive Method of Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma of Pregnant Women During 6th– 10th Weeks of Gestation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology.* 2011;3(4):201-206.

## **8.1. SAŽETAK**

Od otkrića cfDNA (od eng. *cell-free* DNA) do danas, razmatrane su i istraživane mnoge njene primjene u molekularnoj medicini: od dijagnoze i praćenja tumora te predviđanja ozdravljenja pomoću specifičnih biomarkera, do otkrivanja i predviđanja poteškoća u razvoju ploda putem neinvazivne prenatalne dijagnostike. Danas su poznati mnogi biomarkeri specifični za određene maligne tumore i pomoću nekih od njih moguće je doći do zaključaka o pojavnosti/otpornosti na liječenje/stadiju tumora, no još uvijek se ne zna dovoljno da bi takvo što u medicini postalo široko primjenjivano. U prenatalnoj dijagnostici, cfDNA se pokazao kao iznimno vrijedan alat pri otkrivanju genomskih abnormalnosti. Kako bi se u budućnosti sprječila zloupotreba ove tehnologije, potrebno je uspostaviti detaljni etički kodeks. Općenito, cfDNA porijeklom iz tumora/fetusa, kraća je od normalne/majčine cfDNA, što daleko olakšava pročišćavanje i analizu.

## **8.2. SUMMARY**

Since the discovery of cfDNA (cell-free DNA), many of its applications in molecular medicine have been considered and researched: from diagnosing and monitoring tumors, and predicting disease outcome using specific biomarkers, to the detection and prediction of aberrant fetus development using noninvasive prenatal diagnostics. Today, many biomarkers specific for certain tumors types have been discovered and some of them can be used to help the decision making process about the presence/treatment resistance/stage of a tumor. Still, there is an insufficient amount of knowledge about the subject, which will have to be thoroughly analysed before wide use in medical practice. cfDNA has become an immensely valuable tool in prenatal diagnostics. To prevent future misuse, establishment of a detailed ethical codex is vital. Generally, tumor/fetal cfDNA is shorter than normal/maternal cfDNA, which makes purification and analysis far easier.