

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ema Žanić

**Usporedba koncentracija TGF- β 1 proteina u
egzosomima dobivenima metodom tekuće biopsije iz
plazme bolesnika s pre-kolorektalnim karcinomom i
kolorektalnim karcinomom**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Somborac Bačura i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024. /2025.

Rad je financiran sredstvima projekta IP-2019-04-4624 Hrvatske zaklade za znanost.



POPIS KRATICA:

A	apsorbancija
AML	akutna mijeloična leukemija (engl. <i>acute myeloid leukemia</i>)
APC	engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>
BCA	bicinkoninična kiselina (engl. <i>bicinchonic acid</i>)
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
CRC	kolorektalni karcinom (engl. <i>colorectal cancer</i>)
CTC	cirkulirajuće tumorske stanice (engl. <i>circulating tumor cells</i>)
ctDNA	cirkulirajuća tumorska DNA (engl. <i>circulating tumor DNA</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
E	uzorak egzosoma
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	enzimski povezani imunosorbent test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FAP	obiteljska adenomatozna polipoza (engl. <i>familial adenomatous polyposis</i>)
γ	masena koncentracija
GARP	protein s predominantnim ponavljanjima glikoproteina A (engl. <i>glycoprotein-A repetitions predominant protein</i>)
GIT	gastrointestinalni trakt
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)

K	kontrolni uzorak
KRAS	engl. <i>Kristen rat sarcoma virus</i>
LAP	peptid povezan s latencijom (engl. <i>latency associated peptide</i>)
LRRC33	protein 33 koji sadrži ponavljanja bogata leucinom (engl. <i>leucine-rich repeat-containing protein 33</i>)
LTBP	latentni proteini koji vežu TGF- β (engl. <i>latent TGF-β-binding proteins</i>)
MMR	engl. <i>mismatch repair</i>
NGS	sekvenciranje nove generacije (engl. <i>next-generation sequencing</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pre-CRC	pre-kolorektalni karcinom (engl. <i>pre-colorectal cancer</i>)
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
SDS-PAGE	denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecile sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SP	slijepa proba
ST	standard
TBS+T	engl. <i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TEP	tumorom educirani trombociti (engl. <i>tumor-educated</i>)

platelets)

TGF- β	transformirajući čimbenik rasta β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
TP53	engl. <i>tumor protein 53</i>
TSP-1	trombospondin-1 (engl. <i>thrombospondin-1</i>)

SADRŽAJ RADA:

1. UVOD	1
1.1 KOLOREKTALNI KARCINOM	1
1.1.1 GRAĐA I ULOGA KLONA.....	1
1.1.2 ETIOLOGIJA.....	1
1.2 ČIMBENICI RIZIKA	2
1.2.1 ČIMBENICI NA KOJE SE NE MOŽE UTJECATI	3
1.2.2 ČIMBENICI NA KOJE SE MOŽE UTJECATI	4
1.3 EPIDEMIOLOGIJA.....	5
1.4 PREVENCIJA I RANA DIJAGNOSTIKA.....	6
1.5 PROBIR	6
1.6 TEKUĆA BIOPSIJA.....	7
1.7 EGZOSOMI	8
1.8 TGF- β PROTEINI.....	9
1.8.1 BIOSINTEZA TGF- β 1 PROTEINA	10
1.8.2 AKTIVACIJA TGF- β 1 PROTEINA	11
1.8.3 SIGNALIZACIJA	11
1.8.4 POVEZANOST TGF- β /SMAD SIGNALNOG PUTA I CRC-a.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1 ISPITANICI.....	14
3.2 PRIPREMA UZORAKA PLAZME.....	14
3.3 IZOLACIJA EGZOSOMA	15
3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	16
3.5 ELEKTROFOREZA I WESTERN BLOT ANALIZA	17
3.6 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	19
4. REZULTATI	20

4.1 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U EGZOSOMIMA	20
4.2 DETEKCIJA TGF- β 1 PROTEINA U EGZOSOMIMA WESTERN BLOT ANALIZOM	23
4.3 KVANTIFIKACIJA TGF- β 1 PROTEINA	24
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČCI	36
7. ZAHVALA	37
8. LITERATURA	38
9. SAŽETAK	45
10. SUMMARY.....	47

1. UVOD

1.1 KOLOREKTALNI KARCINOM

1.1.1 GRAĐA I ULOGA KLONA

Kolon, lociran između tankog crijeva i rektuma, predstavlja jedan od temeljnih sastavnica probavnog sustava. Građen je od četiri dijela: ascendentnog kolona lokaliziranog na desnoj strani; transversalnog kolona; descendentnog kolona lokaliziranog na lijevoj strani te sigmoidalnog kolona. Stijenka je građena od tri sloja: sluznice sa brojnim naborima preko kojih se odvija apsorpcija hranjivih tvari, mišićnog sloja i vezivnog sloja prekrivenog seroznom ovojnicom. Zbog konstantnog doticaja s antigenima iz hrane, stranim agensima te njegove biološke uloge u apsorpciji hranjivih tvari, debelo crijevo ima očuvanu visoku razinu stanične regeneracije. Međutim, upravo ona povećava mogućnost razvoja raznih patoloških stanja među kojima se nalazi i kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*, CRC). Najčešće dolazi do maligne preobrazbe epitelnih stanica sluznice te se ona širi na druge dijelove crijevnih stijenki, okolna tkiva i organe (Arvelo i sur., 2015).

1.1.2 ETIOLOGIJA

Kolorektalni karcinom pripada heterogenoj skupini bolesti te se može klasificirati različitim podtipovima, pri čemu je svaki karakteriziran specifičnim molekularnim i morfološkim značajkama (Müller i sur., 2016). Iz tog razloga potrebno je prije početka liječenja odrediti o kojem se podtipu radi, kako bi ono bilo što učinkovitije (Li i sur., 2021).

Nastanak CRC-a obično počinje s pojavom male nakupine stanica koje se nazivaju polipi te se formiraju unutar debelog crijeva (www.mayoclinic.org). Polipi općenito nisu kancerogeni, ali se neki, poput adenomatoznih polipa, mogu s vremenom razviti u rak. Stanje u kojem bolesnik ima dijagnosticirane polipe, naziva se još i pre-kolorektalni karcinom (engl. *pre-colorectal cancer*, pre-CRC) (www.cancer.org).

Često mutacije specifičnih gena dovedu do nastanka CRC-a. One se mogu pojaviti u onkogenima, tumor supresorskim genima te genima koji su odgovorni za mehanizme popravka molekule DNA. Ovisno o kojoj vrsti mutacije se radi, CRC se klasificira kao, sporadični i nasljedni (Mármol i sur., 2017).

Točkaste mutacije odgovorne su za 70 % svih CRC-a te se ubrajaju u sporadične karcinome čija je molekularna patogeneza heterogena (jer se mutacija može pojaviti na bilo kojem genu). One se pojavljuju tijekom života i nisu povezane s nasljednim sindromima, već utječu na stanice pojedinca i njihove potomke (Mármol i sur., 2017). Smatra se da u 80 % slučajeva CRC-a dolazi do specifičnog slijeda mutacija koje se prevode u morfološke sekvence (Lawler i sur., 2024). Rezultat ovih procesa je stvaranje adenoma zbog pojave mutacije u APC tumor supresorskom genu (Mármol i sur., 2017). Nastali se adenomi zovu polipi te se očekuje da će oni u oko 15 % slučajeva tijekom perioda od 10 do 15 godina godina progredirati u stanje karcinoma. S vremenom se aktivira KRAS (engl. *Kristen rat sarcoma virus*) onkogen te dolazi do rasta polipa u adenome. Na poslijetku, mutacijom TP53 (engl. *tumor protein 53*) tumor supresorskog gena, adenomi spontano prelaze u karcinom (Hossain i sur., 2022).

S druge strane, na nasljednu komponentu CRC-a nas upućuje 20 - 30 % bolesnika s pozitivnim obiteljskim anamnezama (Seppälä i sur., 2023). Uzrokovani su nasljednim mutacijama koje imaju utjecaj na jedan od alela mutiranog gena. Pojavom točkaste mutacije u drugom alelu pokrenut će se stvaranje tumorske stanice što će u konačnici dovesti do nastanka karcinoma. Klasifikacijom se dijele u dvije skupine. Prvu skupinu čine polipozni oblici, koji uključuju obiteljsku adenomatoznu polipozu (FAP). To je autosomno dominantni poremećaj uzrokovan mutacijama u APC genu (Aelvoet i sur., 2022), a karakterizira ga veliki broj adenomatoznih polipa koji postupno progrediraju u CRC (Dinarvand i sur., 2019). U drugu skupinu se svrstavaju nepolipozni oblici povezani s mutacijama u mehanizmima popravka DNA. Glavni uzrok nasljednog nepolipoznog CRC je Lynch sindrom, koji je uzrokovan nasljednim mutacijama u jednom od alela koji kodiraju za popravak DNA (Mármol i sur., 2017).

1.2 ČIMBENICI RIZIKA

Dvije su glavne skupine čimbenika koji utječu na povećanje rizika razvoja CRC-a. Prva skupina predstavlja čimbenike na koje se ne može utjecati te se tu ubrajaju: dob, spol, rasa, nasljedne mutacije, etnička pripadnost te prisutnost upalnih bolesti crijeva. U drugu skupinu svrstavaju

se čimbenici na koje se tijekom života može utjecati i koji predstavljaju stil života pojedinca kao što su primjeri: prehrana, pretilost, konzumacija alkohola i pušenje (Ionescu i sur., 2023).

1.2.1 ČIMBENICI NA KOJE SE NE MOŽE UTJECATI

Unazad više godina provedena su brojna istraživanja u kojima se promatrao utjecaj spola, dobi, genetskih predispozicija te prisutnost upalnih bolesti crijeva na razvoj CRC-a.

1.2.1.1 SPOL

Pokazalo se da osobe muškoga spola imaju 1,5 puta veći rizik od razvoja CRC-a nego žene (Bray i sur., 2018). Međutim, uspoređujući muški i ženski spol, primijetilo se da su žene sklonije raku desne strane kolona, koji se, uspoređujući sa rakom lijeve strane kolona, smatra agresivnijom vrstom neoplazme (Rawla i sur., 2019).

1.2.1.2 DOB

Dob ima veliku ulogu te je čvrsto povezana s incidencijom CRC-a (Kastrinos i sur., 2023). Njegova pojavnost je češća u osoba starijih od 65 godina te one imaju tri puta veću vjerojatnost razvoja CRC-a od osoba u dobnoj skupini između 50 i 64 godina. Međutim, epidemiološke studije su dokumentirale sve veći porast incidencije ove bolesti u osoba mlađih od 50 godina (Ionescu i sur., 2023). Vjeruje se da je razlog tome sjedilački način života, češća konzumacija alkohola, pretilost i pušenje (Kastrinos i sur., 2023) te se preporučuje sniženje dobnog praga za probir kako bi se ranije otkrio među mlađom populacijom (Rawla i sur., 2019).

1.2.1.3 GENETSKE PREDISPOZICIJE

Genetski čimbenici također igraju veliku ulogu u razvoju CRC-a (Matsuda i sur., 2025). Tome pridonosi podatak da je nasljedni CRC odgovoran za 7 - 10 % svih slučajeva te da do 30 % bolesnika s CRC-om imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu na neoplazme (Rawla i sur., 2019). Nasljedni CRC sindromi značajno povećavaju rizik, te u njih ubrajamo obiteljsku adenomatoznu polipozu (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP) i Lynch sindrom. FAP, koji je uzrokovan mutacijama u APC (engl. *adenomatous polyposis coli*) tumor supresorskom genu, dovodi do stvaranja brojnih adenomatoznih polipa koji su primarno locirani u kolonu i

rektumu. Ukoliko se njegova pojavnost ne uoči i medicinski ne zbrine, gotovo će svaki pojedinac razviti CRC prije dobi od 40 godina. S druge strane, Lynch sindrom, je odgovoran za 3 % svih slučajeva CRC-a, te se ubraja među najčešće nasljedne CRC sindrome. Njegova patofiziologija se zasniva na mutaciji u MMR (engl. *mismatch repair*) genima, dovodeći do mikrosatelitne nestabilnosti. Pojedinci koji boluju od ovog sindroma imaju 50 - 80 % rizik za razvoj karcinoma (Matsuda i sur., 2025).

1.2.1.4 UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Kod upalnih bolesti crijeva najčešće se govori o ulceroznom kolitisu i Crohnovoj bolesti te uprave one povisuju rizik za razvoj CRC-a čak dva do tri puta. Njih karakterizira kronična upala koja generira oksidacijski stres preko kojeg se inducira oštećenje DNA molekule. Krajnji rezultat oštećenja se vidi kao aktivacija gena koji promoviraju razvoj tumora te inaktivacija tumor supresorskih gena (Shah i Itzkowitz, 2022).

1.2.2 ČIMBENICI NA KOJE SE MOŽE UTJECATI

1.2.2.1 KONZUMACIJA ALKOHOLA

Meta-analize su pokazale da unos alkohola i rizik razvoja CRC-a imaju odnos doze-učinka. Tako visoke konzumacije alkohola, koje uključuju unos više od 50 grama u danu, povećava rizik od razvoja CRC-a za 52 % (Matsuda i sur., 2025). Druga studija je potvrdila kako umjereni unos alkohola, koji podrazumijeva konzumaciju 12,5 - 50 grama u danu, povećava rizik od razvoja ove bolesti za 17 % (Bagnardi i sur., 2015). Također se uočilo da je ova povezanost veća kod muškaraca, a kao razlog tome se navodi hormonska varijacija u metabolizmu alkohola. Muškarci ujedno piju veću količinu alkohola (Rawla i sur., 2019).

1.2.2.2 PUŠENJE

Smatra se da mutageni u dimu cigareta promoviraju mikrosatelitnu nestabilnost, CpG (engl. *cytosine followed by guanine*) metilaciju i mutaciju *BRAF* gena. Pušenje se stoga povezuje s povećanjem incidencije karcinoma koji u svojoj patofiziološkoj podlozi imaju upravo navedene procese (Rawla i sur., 2019). Provedene studije su dokazale povezanost između pušenja i

povećanog rizika od razvoja CRC-a (Matsuda i sur., 2025). Tako je jedna meta-analiza, pokazala povećanje rizika za 14 - 17 % kod pušača (Botteri i sur., 2020). Rizik je ovisan o dozi, te se povećava s trajanjem i intenzitetom pušenja (Matsuda i sur., 2025).

1.2.2.3 PREHRANA

Stil prehrane primarno utječe na sastav mikrobioma kolona. Različita hrana ima drugačiji utjecaj na mikrofloru te na razvoj upale u gastrointestinalnom traktu (GIT). Iz navedenog se može zaključiti da prehrana može imati protektivnu ulogu, ali isto tako može povećati rizik od razvoja CRC-a (Rawla i sur., 2019). Namirnice se mogu podijeliti u dvije kategorije koristeći indeks upalnih procesa u prehrani. Prva kategorija podrazumijeva pro-inflamatornu prehranu, koja je povezana sa povećanim rizikom razvoja CRC-a. U nju se uvrštavaju ugljikohidrati, proteini, trans masti, kolesterol te zasićene masne kiseline. S druge strane, u drugu kategoriju se svrstava prehrana s antiinflamatornim učinkom. Ona se povezuje s manjim rizikom nastanka CRC-a, te uključuje prehranu bogatu vlaknima, monozasićenim masne kiseline, omega-3 i omega-6 masnim kiselinama te vitaminima (Ionescu i sur., 2023).

1.2.2.4 PRETILOST I TJELESNA NEAKTIVNOST

Pretilost i tjelesna neaktivnost su najznačajniji čimbenici ponašanja koji doprinose razvoju CRC-a. Brojne studije pokazuju da osobe koje su tjelesne aktivne imaju 25 % manju vjerojatnost razvoja CRC-a. S druge strane, osobe kod kojih dominira sjedilački način života imaju do 50 % veći rizik od razvoja ove bolesti. Danas je tjelesna neaktivnost, uz nezdravu prehranu, jedan od glavnih uzroka razvoja pretilosti koja mijenja crijevnu mikrofloru uzrokujući upalu epitela debelog crijeva koja će u konačnici rezultirati karcinogenezom. Pretili muškarci imaju 50 % veći rizik od raka debelog crijeva i 20 % veći rizik od raka rektuma. Abdominalna masnoća posebno je opasna za razvoj CRC-a te se stoga opseg struka i indeks tjelesne mase koriste za procjenu povećanog rizika od CRC-a (Rawla i sur., 2019).

1.3 EPIDEMIOLOGIJA

Kolorektalni karcinom treće je po redu sijelo raka u svijetu, odmah nakon raka dojke i pluća te je drugi vodeći uzrok smrti povezanih s rakom. Ozbiljnost ove bolesti potvrđuje spoznaja da je 2020. diljem svijeta umrlo više od 930 000 bolesnika, te je iste godine zabilježeno 1,9 milijuna

novih slučajeva. Uočene su velike geografske varijacije u incidenciji, koja je bila najveća u Europi, Novom Zelandu i Australiji te smrtnosti, čija je stopa bila najveća u Istočnoj Europi. Podatak da će do 2040. godišnje oboljeti 3,2 milijuna ljudi i umrijeti 1,6 milijuna bolesnika, govori da je CRC postao veliki javnozdravstveni problem (www.who.int).

Za zemlje članice Europske Unije, prema procjenama Europske komisije, stope incidencije CRC-a su najviše u Danskoj, Mađarskoj i Slovačkoj, a Hrvatska se nalazi na devetom mjestu po pojavnosti (www.hzjz.hr).

U Hrvatskoj je rak debelog i završnog crijeva najučestalija zloćudna bolest. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo godišnje u prosjeku oboli 3600 osoba, od čega 60 % čine muškarci. Iako je češća u osoba starije dobi, skoro je petina oboljelih mlađa od 60 godina. Među zloćudnim bolestima, CRC po smrtnosti zauzima drugo mjesto, odmah nakon raka pluća. To nam potvrđuje podatak da godišnje u Hrvatskoj od CRC-a umire 2100 osoba (www.hzjz.hr).

1.4 PREVENCIJA I RANA DIJAGNOSTIKA

S povećanjem smrtnosti, potreba za aktivnom prevencijom CRC postaje sve važnija. Brojne epidemiološke studije pokazuju da postoji primarna i sekundarna prevencija od razvoja CRC-a. U primarnu se prevenciju ubraja promjena životnih navika te ona uključuje prestanak pušenja, smanjenje konzumacije alkohola, povećanje tjelesne aktivnosti te održavanje prehrane bogate namirnicama s visokim antiinflamatornim učinkom, dok sekundarna prevencija podrazumijeva pravovremeni probir i uklanjanje adenoma (Tsukanov i sur., 2025).

1.5 PROBIR

U početnim stadijima CRC-a, osoba je bez simptoma. Jednom kada se oni pojave u obliku abdominalne boli uz rektalno krvarenje i posljedičnu anemiju, označavaju nam da je bolest u već uznapredovalom stanju. Stoga je rana detekcija ključna za poboljšanje ishoda i prognoze bolesti te prevenciju metastaza (Xi i Xu, 2021).

Trenutno se koriste dvije strategije. Prva uključuje probir na temelju određivanja čimbenika rizika, što omogućuje odabir bolesnika za daljnja ispitivanja. Druga strategija, poznata kao populacijski probir, provodi se korištenjem epidemioloških metoda, a temelji se na opsežnom pregledu pojedinaca u određenoj populaciji (Burnett-Hartman i sur., 2021).

Preporuke o početku probira se razlikuju između regija u svijetu te one ovise o incidenciji, ekonomskim resursima i strukturi zdravstvenog sustava (Shaukat i Levin, 2022). Tako na primjer europske smjernice nalažu da se s probirom započinje jednom kada osoba navrši 50 godina (European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working Group; von Karsa i sur., 2013). S druge strane, Sjedinjene Američke Države, započinju probir u dobi od 45 godina (Shaukat i sur., 2021).

Postoji nekoliko različitih testova koji se koriste u svrhu otkrivanja CRC-a, a svaki od njih ima svoje prednosti i ograničenja. Najbitnija karakteristika svakog testa je osjetljivost. Ona govori koliki je postotak oboljelih osoba koje dobiju pozitivan rezultat testa. Također je bitna visoka specifičnost testa, koja upućuje na postotak osoba bez bolesti s negativnim rezultatom. Ove dvije navedene značajke zajedno definiraju točnost testa, koja je ključna pri uvrštavanju pojedinog testa u program probira (Simon, 2016).

U Hrvatskoj od 2007. godine postoji Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva. Odazivanjem u ovaj program, CRC se može otkriti u ranom stadiju, kada je preživljenje visoko. Žene i muškarci u dobi od 50. do navršene 74. godine se pozivaju svake dvije godine da naprave test na okultno krvarenje u stolici. Osobe s pozitivnim nalazom upućuju se na probirnu kolonoskopiju, a one s negativnim nalazom ponovno će biti pozvane u program za dvije godine. Odaziv je veći u starijoj dobnoj skupini, a udio testiranih osoba je oko 25 %. Za ostvarenje dugoročnih ciljeva, ovo još uvijek nije dostatan broj odazvanih (www.hzjz.hr).

1.6 TEKUĆA BIOPSIJA

Trenutni terapijski pristup za CRC uključuje endoskopsku i kiruršku resekciju, sistemske adjuvantne terapije, terapiju zračenjem, ciljanu terapiju i imunoterapiju. Međutim, zbog heterogenosti i kemorezistencije CRC-a često dolazi do neadekvatnog odgovora na liječenje i ponovne pojave tumora kod većine bolesnika. Iz tog razloga potreban je pouzdani biomarker koji će predvidjeti terapijski odgovor što je ranije moguće (Zhou i sur., 2022). Metode koje se trenutno koriste za otkrivanje CRC-a uključuju kolonoskopiju, tumorske markere, medicinsko snimanje i biopsiju tkiva. Navedene metode imaju različita ograničenja. Snimanje, na primjer, ima nisku stopu prepoznavanja raka u ranom stadiju, a kolonoskopija je poznata po svojoj invanzivnosti (Tao i sur., 2024). Biopsija tkiva još uvijek predstavlja zlatni standard za identifikaciju tumora. Međutim, ponovljenim biopsijama stvaraju se ozljede što u konačnici rezultira lošom suradnjom bolesnika. Iz tog razloga, biopsijom tkiva je teško pratiti daljnji

razvoj CRC-a (Zhou i sur., 2022). Invanzivnost ove metode nije jedini problem. Često je dobiveni uzorak premalen i ne predstavlja tumor u cijelosti, što može dovesti do krive interpretacije rezultata. Rezultat ovoga su nelagodnost, slaba suradljivost bolesnika i nemogućnost ponavljanja postupka tkivne biopsije (Aggarwal i sur., 2025).

Unazad nekoliko godina razvila se tekuća biopsija koja predstavlja novu metodu detekcije (Tao i sur., 2024). Riječ je o neinvanzivnoj metodi uzorkovanja koja sve više dobiva na važnosti kod nekoliko vrsta raka, uključujući CRC (Aggarwal i sur., 2025). Njezinom se primjenom mogu detektirati elementi tumorskog tkiva kao što su cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulating tumor cells*, CTC), cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulating tumor DNA*, ctDNA), tumorom educirani trombociti (engl. *tumor-educated platelets*, TEPs), proteinski tumorski markeri i egzosomi u perifernoj krvi ili drugim tjelesnim tekućinama bolesnika. U konačnici se dobivaju informacije povezane s tumorom što tekuću biopsiju čini idealnom dijagnostičkom tehnikom. Zbog svojih prednosti kao što su neinvanzivnost, jednostavnost izvođenja i mogućnost čestog prikupljanja uzoraka u svrhu praćenja, tekuća biopsija se koristi u ranom probiru i otkrivanju tumora. To je čini idealnom za procjenu odgovora na liječenje, identificiranje rezistencije na terapiju, predviđanje recidiva tumora i metastaza te prevladavanje heterogenosti tumora (Tao i sur., 2024).

1.7 EGZOSOMI

Egzosomi pripadaju skupini izvanstaničnih vezikula, a luče ih većina stanica u tijelu, uključujući zdrave stanice i stanice raka. Veličinom variraju od 30 do 150 nm u promjeru (Hui i sur., 2023) i smatraju se nanovezikulama (Titu i sur., 2023). Sferičnog su oblika s membranom sastavljenom od fosfolipida te raznih proteina i lipida. Uključeni su u različite biološke funkcije u stanicama, mogu prenositi različite molekule između stanica, sredstvo su komunikacije i igraju važnu ulogu u patološkim stanjima. Njihove specifične funkcije ovise o njihovom podrijetlu. Tako na primjer, egzosomi podrijetlom iz tumorskih stanica igraju ulogu u invaziji, regulaciji angiogeneze, rastu tumora i nastanku metastaza (Paskeh i sur., 2022).

Stanice raka proizvode i izlučuju više egzosoma u odnosu na zdrave stanice (Titu i sur., 2023). Egzosomi nastali iz tumorskih tkiva sadrže proteine porijeklom iz tumora, a neki od njih, kao što je TGF- β , se mogu koristiti za rano otkrivanje CRC-a (Verbanac i sur., 2021).

Egzosomi, zbog genetičke informacije koje nose o stanicama iz kojih potječu, najviše obećavaju kao biljezi. Tome također doprinosi njihova stabilnost u cirkulaciji te visoka koncentracija koja osigurava uspješno provođenje izolacije (Zhou i sur., 2022). Postoje mnoge metode za izolaciju egzosoma kao što su kromatografija isključenja prema veličini čestica, centrifugiranje u gradijentu gustoće, ultrafiltracijsko centrifugiranje, imunokemijski test temeljen na magnetskim kuglicama i metoda taloženja polimerom. Ultracentrifugiranje se smatra zlatnim standardom, a uključuje diferencijalno centrifugiranje i centrifugiranje u gradijentu gustoće. U početku se centrifugiranje odvija pri niskoj brzini kako bi se osiguralo odstranjivanje staničnog debrisa, nakon čega slijedi povećanje brzine i uklanjanje velikih vezikula. Na posljétku, centrifugiranje se odvija pri visokim brzinama čime se osigurava taloženje egzosoma. Nakon provedene izolacije potrebno je analizirati sadržaj egzosoma (Yu i sur., 2022), što uključuje analizu proteina imunokemijskim metodama poput Western blota i enzimski povezanog imunosorbent testa (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) te analizu nukleinskih kiselina kvantitativnom polimeraznom lančanom reakcijom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ili sekvenciranjem nove generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) (He i sur., 2022).

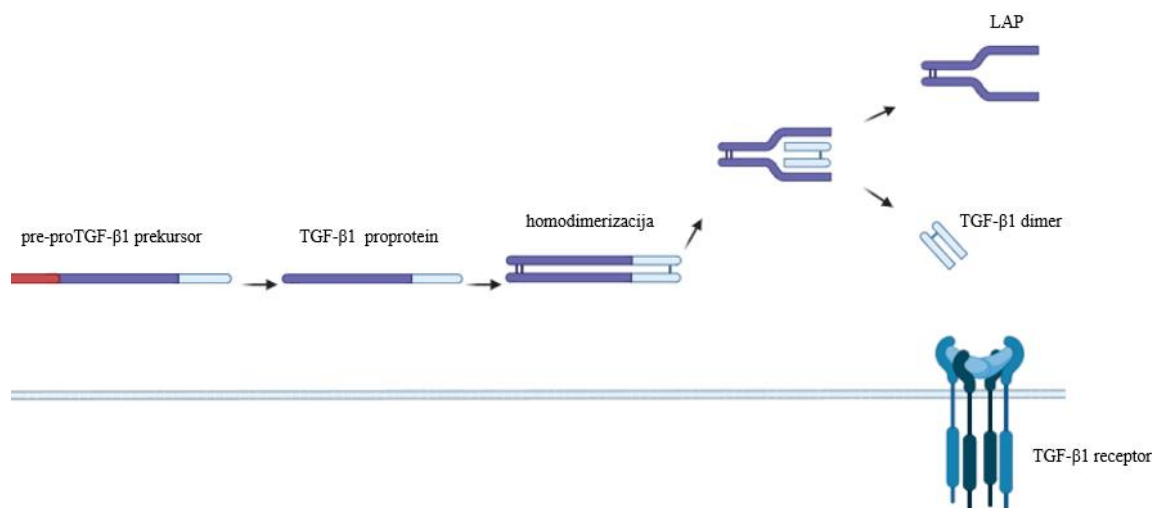
1.8 TGF- β PROTEINI

Naziv transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor- β* , TGF- β) obuhvaća skupinu citokina s različitim ulogama u staničnim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija, imunoregulacija i zacjeljivanje rana (Xie i sur., 2018) te u brojnim patološkim procesima poput fibroze, mišićnih bolesti i razvoj raka (Morikawa i sur., 2016). Sveukupno su poznata 33 polipeptida koji se svrstavaju u skupinu TGF- β proteina, među kojima su najpoznatije tri izoforme: TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. Svaka od njih se veže za specifični površinski receptor: TGF- β R1, TGF- β R2 i TGF- β R3. TGF- β ligandi se u izvanstanični matriks izlučuju u inaktivnoj formi te se mogu aktivirati putem integrina (Fasano i sur., 2024), reaktivnih kisikovih spojeva, trombospondina-1 (engl. *thrombospondin-1*, TSP-1) i proteaza (Deng i sur., 2024). U ovom radu fokusirali smo se na TGF- β 1 izoformu, koja predstavlja najčešće istraživanu izoformu. TGF- β 1 je također prekomjereno eksprimiran u različitim karcinomima te djeluje kao imunosupresor i omogućuje tumorskim stanicama da prežive i izbjegnu imunološki sustav domaćina. Navedeno sugerira da TGF- β 1 izoforma ima bitnu ulogu u progresiji karcinoma (Danielpour, 2024; Devan i sur., 2022). TGF- β 1 se sintetizira u gotovo svim stanicama, najzastupljeniji je u serumu i najčešće je predominantna izoforma u tumorskom

mikrookruženju. Također je ključni regulator mnogih bioloških procesa, uključujući diferencijaciju stanica i tkiva, vaskulogenezu, zacjeljivanje rana i imunološku homeostazu (de Streel i Lucas, 2021).

1.8.1 BIOSINTEZA TGF- β 1 PROTEINA

Procesom transkripcije nastaje pre-proTGF- β 1 prekursor koji se sastoji od signalnog peptida na N-terminalnom kraju, peptida povezanog s latencijom (engl. *latency-associated peptide*, LAP) i TGF- β 1 monomera na C-terminalnom kraju. N-terminalni signalni peptid, tijekom translokacije s ribosoma, vodi pre-proprotein u lumen endoplazmatskog retikuluma gdje dolazi do njegova uklanjanja, a LAP ostaje nekovalentno vezan na TGF- β 1 monomer, čineći proprotein. Stvaranjem triju međulančanih disulfidnih veza dolazi do homodimerizacije TGF- β 1 proproteina. Proteolitičkim djelovanjem furina (proproteinske konvertaze) nastaju C-terminalni dio koji se naziva zreli TGF- β 1 i N-terminalni LAP koji još uvijek obuhvaća zreli TGF- β 1. Ova nekovalentna interakcija stvara mali latentni kompleks te sprječava vezanje zrelog TGF- β 1 za njegove receptore (de Streel i Lucas, 2021; Deng i sur., 2024) (Slika 1). Na taj način nastaje struktura veličine oko 44 kDa koja održava TGF- β 1 latentnim u izvanstaničnom matriksu (www.uniprot.org). Izlučeni mali latentni kompleksi mogu se dalje putem disulfidnih veza s LAP-om vezati za latentne proteine koji vežu TGF- β (engl. *latent TGF- β -binding proteins*, LTBP) u velike latentne komplekse, koji ih usmjeravaju u izvanstanični matriks radi pohrane, ili se mogu vezati za protein s predominantnim ponavljanjima glikoproteina A (engl. *glycoprotein-A repetitions predominant protein*, GARP) ili protein 33 koji sadrži ponavljanja bogata leucinom (engl. *leucine-rich repeat-containing protein 33*, LRRC33), koji ih vežu za površinu stanice (Deng i sur., 2024).



Slika 1. Prikaz sinteze i vezanja TGF- β 1 proteina za receptor (napravljeno pomoću BioRender.com prema de Streel i Lucas, 2021; Deng i sur., 2024)

1.8.2 AKTIVACIJA TGF- β 1 PROTEINA

Bioaktivnost TGF- β 1 se temelji na ligand-receptor interakciji za koju je potrebna izloženost njegovog veznog mjesta za receptor. Aktivacija TGF- β 1 proteina predstavlja oslobađanje zrelog TGF- β 1 dimera od LAP prosegmenta, čime TGF- β 1 protein postaje aktivan te se može vezati na svoj receptor. Brojni spomenuti čimbenici su identificirani kao aktivatori ovoga proteina. Do sada je najbolje opisana aktivacija ovisna o integrinu te se ona ujedno smatra najvažnijim mehanizmom (de Streel i Lucas, 2021; Deng i sur., 2024). Aktivni oblik TGF- β 1 proteina je veličine oko 25 kDa (Li i sur., 2017).

1.8.3 SIGNALIZACIJA

Nakon aktivacije, TGF- β ligandi se vežu za TGF- β R2, promovirajući formaciju heterotetramernog kompleksa s TGF- β R1. Novonastali kompleks dovodi do fosforilacije TGF- β R1, koja fosforilira SMAD proteine. Ovi proteini su glavni medijatori TGF- β signalnog puta te se mogu podijeliti u tri kategorije: receptor-regulirani (SMAD 2 i SMAD 3), inhibitorni (SMAD6 i SMAD 7) te SAMD-ovi sa zajedničkim medijatorima (SMAD4) (Fasano i sur, 2024).

Jednom fosforilirani, SMAD2 i SMAD3 formiraju heterodimerni kompleks sa SMAD4 proteinom (Zhao i sur., 2018). Nastali kompleks se translocira u jezgru te utječe na regulaciju

genske ekspresije, koja dovodi do promjene u staničnim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza (Fasano i sur., 2024).

Nakon sudjelovanja u transkripciji, dolazi do njihove razgradnje. Ona započinje fosforilacijom vezne regije SMAD2 i SMAD3 od strane ciklin-ovisne kinaze 8 (CDK8), nakon čega ih fosforilira kinaza glikogen sintaze 3 (GSK3), stvarajući vezno mjesto za SMAD ubikvitinacijski regulatorni faktor 1 (SMURF1) i druge E3 ubikvitin ligaze. Kao rezultat dolazi do njihove ubikvitinacije i razgradnje u proteasomima (Fasano i sur., 2024).

1.8.4 POVEZANOST TGF- β /SMAD SIGNALNOG PUTA I CRC-a

TGF- β protein tijekom tumorigeneze ima dvostruku funkciju. U početnim fazama (nastanka tumora) pokazuje supresivnu ulogu inducirajući apoptozu i zaustavljanje staničnog ciklusa. S progresijom tumora, tumorske stanice postaju neosjetljive na njega, a izlučeni TGF- β protein pojačava tumorsku imunosupresiju i olakšava angiogenezu, invaziju i metastaze tumora. SMAD4, kao glavni medijator TGF- β signalnog puta, igra ključnu ulogu u preusmjeravanju funkcije TGF- β a na tumorigenezu (Zhao i sur., 2018).

Mutacije u SMAD2 i SMAD4 proteinima ometaju TGF- β signalizaciju te dovode do nekontroliranog rasta stanica i progresije do faze tumora. U sporadičnom CRC-u, mutacije u navedenim proteinima su bile pronađene u 8,6 % i 3,4 % slučajeva (Li i sur., 2022).

Razina ekspresije SMAD4 proteina ima pozitivnu korelaciju sa preživljavanjem kod CRC-a, a njegov gubitak upućuje na lošiju prognozu (Zhao i sur., 2018). Studija, kojom je bilo obuhvaćeno 202 blesnika s CRC-om, otkrila je da bolesnici s normalnom ekspresijom SMAD4 imaju korist od kemoterapije na bazi 5-fluorouracila s tri puta većim poboljšanjem u odnosu na bolesnike s gubitkom ovog proteina (Boulay i sur., 2002). Navedeni rezultati pokazuju da stopa gubitka SMAD4 ima pozitivnu korelaciju s progresijom CRC-a, što nam govori da je njegova inaktivacija kasni događaj u kolorektalnoj karcinogenezi (Zhao i sur., 2018).

Zbog svoje dvostruke uloge u ranim stadijima tumora te razvoju metastaza u kasnijim stadijima, TGF- β se dugo nije smatrao dobrom terapijskom metom. Posljednjih godina se razvija sve veći broj novih terapijskih opcija, čiji je cilj preusmjeravanje TGF- β signalizacije prilikom razvoja metastaza (Li i sur., 2022).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kolorektalni karcinom predstavlja najučestaliju zloćudnu bolest u Hrvatskoj i treću po redu zloćudnu bolest u svijetu. Iz navedenog se vidi da je CRC postao ozbiljan zdravstveni problem. Iako se provode programi probira, kasno dijagnosticiranje i dalje predstavlja jedan od temeljnih problema. Posljedica toga je otkrivanje bolesnika u već uznapredovaloj fazi bolesti kada je preživljenje vrlo nisko. Trenutno se za postavljanje dijagnoze koriste kolonoskopija i biopsija tkiva koje su poznate po svojoj invanzivnosti, rezultirajući nelagodom i smanjenom suradljivosti bolesnika. Iz navedenih razloga sve se više teži za razvojem novih metoda koje će omogućiti jednostavno uzorkovanje i ranu dijagnostiku.

Upravo tekuća biopsija predstavlja metodu kod koje je uzorkovanje minimalno invazivno. Pomoću nje se iz periferne krvi mogu izolirati elementi porijeklom iz tumorskih tkiva, a primjer takvih elemenata su egzozomi koji imaju potencijal da se koriste u dijagnostici i praćenju bolesti te procjeni odgovora na terapiju. Iako tekuća biopsija ima brojne prednosti, ona i dalje nije dio rutinske dijagnostike te su potrebna istraživanja kojima će se utvrditi pouzdanost njenih rezultata.

Jedan od proteina kojeg je moguće odrediti u egzozomima je TGF- β 1. Navedeni protein ima ulogu u proliferaciji i diferencijaciji tumorskih stanica te mutacijama u njegovim signalnim putevima dolazi do progresije tumora i razvoja metastaza. Iz navedenog, TGF- β 1 se sve više istražuje kao novi mogući biljeg u dijagnostici CRC-a.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike u koncentracijama TGF- β 1 proteina u egzozomima dobivenima metodom tekuće biopsije iz plazme bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 ISPITANICI

Za potrebe ovoga rada korišteni su uzorci ispitanika s dijagnozom pre-CRC-a (N = 24) i CRC-a (N = 40) koji su ispunjavanjem informiranog pristanka dobrovoljno prihvatili sudjelovanje u projektu "Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma primjenom tekuće biopsije" kojeg je financirala Hrvatska zaklada za znanost (IP-2019-04-4624, voditeljica: prof. dr. sc. Karmela Barišić). Liječnici Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu su regrutirali ispitanike, čija je krv uzeta za analizu tekućom biopsijom neposredno prije operacije.

3.2 PRIPREMA UZORAKA PLAZME

Svakom ispitaniku izvađeno je 10 mL pune krvi u epruvetu CellSave Preservative Tubes (Menarini Silicon Biosystems Inc, SAD) koja kao antikoagulans sadrži dinatrijevu sol etilendiamintetraoctene kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) uz odgovarajući konzervativ za očuvanje stanica. Nakon vađenja krvi potrebno je centrifugiranjem unutar jednog sata odvojiti plazmu od stanica. Na taj način sprječava se oslobađanje staničnog sadržaja *in vitro*. Ukoliko u uzorku dođe do hemolize on više nije prikladan za daljnju analizu te se isti odbacuje.

Krv je centrifugirana u centrifugi koja sadrži rotor s njišućim vjedorima (engl. *swinging-bucket rotor*) na 1900 g tijekom 10 minuta na 4 °C. Nadsloj plazme je prenesen u novu sterilnu epruvetu od 15 mL s konusnim dnom, pri čemu se mora paziti da se uz plazmu ne prenese i međusloj (engl. *buffy coat*) koji uz leukocite sadrži i trombocite te zajedno predstavljaju mogući izvor kontaminacije. Dobiveni uzorak plazme je ponovno centrifugiran na 3000 g tijekom 15 minuta na 4 °C čime su uklonjena apoptotska tjelešca, fragmenti trombocita te preostali stanični materijal. Tako pročišćeni nadsloj plazme prenesen je u novu epruvetu od 2 mL koja ne sadrži ribonukleaze. Epruvete su označene specifičnim identifikacijskim brojem ispitanika nakon čega su pohranjene na 4 °C ukoliko su egzozomi izolirani isti dan ili na temperaturu od -20 °C ako je uzorke bilo potrebno pohraniti tijekom dužeg perioda.

Ukoliko je izolacija egzosoma vršena nakon smrzavanja uzoraka plazme, iste uzorke bilo je potrebno otopiti na ledu i vorteksirati, nakon čega su centrifugirani na 3000 g tijekom 5 minuta na 4 °C. Ovim korakom uklanjeni su debris, fibrin, trombociti te preostale stanice. Pročišćeni nadsloj plazme prenesen je u nove epruvete od 2 mL koje ne sadrže ribonukleaze.

3.3 IZOLACIJA EGZOSOMA

Za izolaciju egzosoma korišten je komercijalni komplet miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen) koji se sastoji od sljedećih reagensa: 10 mL Precipitation Buffer A, 10 mL Resuspension Buffer, 200 U Thrombin (liofiliziran) te 500 µL Thrombin Buffer. Svi reagensi čuvaju se na 4 °C te moraju biti zaštićeni od svjetla. Liofilizirani Thrombin je, nakon otapanja u 400 µL Thrombin Buffer-a, bio inkubiran jednu minutu na sobnoj temperaturi, nakon čega je lagano promiješan te alikvotiran i pohranjen na -20 °C. Thrombin (500 U/mL) je nakon resuspenzije stabilan na 4 °C najmanje šest mjeseci. Navedeni komplet je uz brzu izolaciju također namijenjen pročišćavanju egzosoma i drugih izvanstaničnih vezikula iz plazme ili seruma. Dodatni materijali i oprema potrebni za postupak izolacije su: epruvete s konusnim dnom od 15 mL, epruvete bez ribonukleaze (engl. *RNase free*) od 2 mL, automatske pipete s nastavcima bez ribonukleaze, mikrocentrifuga za epruvete od 2 mL, vorteks, hladnjak i led.

Izolacija je započeta uzimanjem alikvota plazme od 600 µL koji je pomiješan s 6 µL Thrombina i stavljen na inkubaciju pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran na 10000 g tijekom 10 minuta na 20 °C. Po završetku je preneseno 0,5 mL nadsloja u novu epruvetu od 2 mL. Uzorak je zatim promiješan s Precipitation Buffer-om A u omjeru 5:2 tako da je dodano 200 µL Precipitation Buffer-a A u epruvetu s 0,5 mL nadsloja, nakon čega je vorteksiran oko 5 sekundi i inkubiran tijekom 60 minuta ili preko noći na 4 °C.

Uzorak je nakon inkubacije centrifugiran na 500 g tijekom 5 minuta na 20 °C, čime se postiglo taloženje egzosoma na dno epruvete. Nadsloj je uklonjen, a zaostali talog je ponovno kratko bio centrifugiran kako bi preostali nadsloj bio uklonjen. Na dobiveni talog egzosoma dodano je 270 µL Resuspension Buffer-a te su uzorci bili promiješani na termalnom mikseru tijekom 15 minuta na 20 °C pri 1400 rpm (engl. *rounds per minute*). Konačan volumen izoliranih egzosoma iznosio je oko 300 µL. Dobiveni uzorci egzosoma su bili alikvotirani po 100 µL za daljnje

analize proteina, nakon čega su bili pohranjeni na 4 °C do dva dana ili na -65 °C tijekom dužeg perioda.

U ovome radu su korišteni uzorci prethodno izoliranih egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.

3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Egzosomalni proteini nalaze se unutar ovojnice te kako bi njihova ukupna koncentracija bila određena potrebno ih je prvo osloboditi u otopinu. U tu je svrhu uzet alikvot uzorka egzosoma te je pomiješan s RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay*) puferom (*RIPA Lysis and Extraction Buffer*, Thermo Scientific, SAD), koji sadrži inhibitore proteaza.

Prethodno je pohranjene alikvote egzosoma od 100 µL bilo potrebno otopiti na ledu i homogenizirati. Od svakog je uzorka uzeto po 40 µL te pomiješano s 40 µL RIPA pufera, nakon čega su sonicirani u ultrazvučnoj vodenoj kupelji u trajanju od 10 sekundi. Nakon sonikacije, uzorci su stavljeni na led najmanje 15 minuta. Iz svakog je uzorka uzet alikvot od 1 µL te je određena ukupna koncentracija proteina uz pomoć kolorimetrijske metode s bicinkoniničnom kiselinom (engl. *bicinchoninic acid*, BCA). Metoda se temelji na redukciji Cu^{2+} iona u Cu^{+} ione pri alkalnim uvjetima od strane proteina. Navedena reakcija naziva se biuret reakcijom te je dokaz prisustva peptidne veze u uzorku. Reducirani Cu^{+} ioni s bicinkoniničnom kiselinom stvaraju ljubičasto obojeni kompleks čiji se intenzitet mjeri uz pomoć spektrofotometra na 570 nm. Izmjerena apsorbancija, koja ovisi o intenzitetu nastalog obojenja, izravno je proporcionalna koncentraciji reduciranih Cu^{+} iona, a samim time i koncentraciji proteina u uzorku. Metoda se smatra linearnom u rasponu koncentracije 0,0020 - 2,0 mg/mL.

Izmjerenoj apsorbanciji pridružene su odgovarajuće koncentracije proteina dobivene iz jednadžbe baždarnog pravca.

Za dobivanje baždarnog pravca najprije je potrebno pripremiti standard serumskog albumina koncentracije 1,0 mg/mL otapanjem 0,0100 g goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumine*, BSA) (#BSA-1S, Capricorn) u 10 mL fiziološke otopine (0,9 % NaCl). Nakon pripremljenog standarda, priređuje se niz koncentracija za baždarni pravac, svaki volumena 1 mL razrjeđivanjem s fiziološkom otopinom, u vrijednostima od: 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL i 1,0 mg/mL. Mjerenje apsorbancije provodi se u mikrotitarskoj

pločici s 96 jažica. Za baždarni pravac otpipetira se 25 μ L svake koncentracije standarda u triplikatu te se nanose na mikrotitarsku pločicu redoslijedom padajućih koncentracija. Za slijepu probu koristi se 25 μ L destilirane vode koja se također nanosi u triplikatu. Uzorci se prije nanošenja razrjeđuju 100 puta s destiliranom vodom te se svakoj jažici dodaje 25 μ L. Svaki uzorak radi se u triplikatu. Na kraju se u svaku jažicu dodaje 100 μ L radnog reagensa koji se priprema neposredno prije nanošenja, tako da se pomiješa 10 mL BCA s 200 μ L bakrova (II) sulfata. Pločica se inkubira 30 minuta na 37 °C u tresilici, na brzini od 300 rpm. Odmah nakon inkubacije mjeri se apsorbancija na 570 nm uz pomoć čitača mikrotitarskih pločica Wallac 1420 VICTOR3 (PerkinElmer, SAD).

3.5 ELEKTROFOREZA I WESTERN BLOT ANALIZA

Prije nanošenja uzoraka na gel za elektroforezu, potrebno ih je pripremiti na odgovarajući način da se osiguraju reducirajući uvjeti za denaturaciju proteina. U tu svrhu se prethodno lizirani uzorci egzosoma pomiješaju sa 6 $\times$ Sample Buffer-om (2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g 12 % SDS; 3 mL 30 % glicerol; 20 mg 0,2 % bromfenol plavilo; 1,2 mL 12 % β -merkaptotanol u destiliranoj vodi do ukupnog volumena od 10 mL) u *Protein LoBind* epruveticama od 0,5 mL (Eppendorf, Njemačka) te se kuhaju na 95 °C tijekom 3 minute. Nakon kuhanja hlade se na ledu i po potrebi pohranjuju na -20 °C do početka elektroforeze. SDS u puferu veže se na sve proteine iz uzorka u jednakom omjeru te im daje negativan naboj. Na taj se način osiguralo da putuju prema pozitivnoj elektrodi i da se razdvoje na temelju molekulske mase. β -merkaptotanol u puferu reducira sve proteine tako što kida disulfidne veze, a bromfenol plavilo omogućuje vizualizaciju tijeka elektroforeze.

U jažice 10 %-tnog poliakrilamidnog gela za elektroforezu prvo se nanosi standard proteina *mPAGE Color Protein Standard* (Merck Millipore, SAD), nakon čega se redom nanose volumeni uzoraka egzosoma koji sadrže 40 μ grama proteina. U zadnju jažicu se nanosi interna pozitivna kotrola koja predstavlja uzorak egzosoma jednog pre-CRC bolesnika u kojem se prethodnim analizama dokazalo prisustvo TGF- β 1 proteina. Elektroforeza se provodi u vertikalnom položaju u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 0,25 M glicin; 0,1 % otopina SDS-a) tijekom 90 minuta uz napon od 100 V. Razdvajanje proteina odvija se na temelju razlike u molekulskoj masi, pri čemu proteini manje mase putuju brže. Po završetku elektroforeze razdvojeni proteini prenose se na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 μ m

(GE Healthcare, SAD) uz pomoć uređaja za elektroprijenos proteina *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad, SAD). Prijenos se odvija tijekom 90 minuta uz jakost struje od 250 mA.

Nakon prijenosa proteina na membranu potrebno je blokirati sva slobodna vezna mjesta kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membranu ili same proteine. U svrhu toga membrana se inkubira 1 sat uz protresivanje na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje koji se sastoji od 5 %-tnog BSA u puferu TBS+T (engl. *Tris Buffered Saline with Tween*) (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi). Višak blokirajućeg reagensa uklanjanje se ispiranjem uz protresivanje, tri puta po pet minuta u puferu TBS+T.

Slijedi inkubacija membrane s primarnim (veznim) antitijelom koje će specifično prepoznati antigen na ciljnom proteinu. U svrhu ovoga rada korištena su monoklonska mišja antitijela koja se vežu na TGF- β 1 protein (*TGF- β 1 mAb (TB21)*, #MA5-16949, Invitrogen, SAD). Koncentracija antigena iznosi 1 mg/mL, a čuva se na -20 °C. Otopina antitijela se razrjeđuje u omjeru 1:1000, kako bi se spriječio nastanak nespecifičnih rezultata. Volumen od 7 μ L otopine antitijela dodan je u 7 mL 5 %-tnog obranog mlijeka u prahu u TBS+T puferu. Inkubacija s primarnim antitijelom odvija se preko noći u frižideru na +4 °C. Idući dan se inkubirana membrana izvadi te se s protresuje tijekom 10 minuta, nakon čega se ispire tri puta po pet minuta uz protresivanje u TBS+T puferu kako bi se uklonio višak nevezanog primarnog antitijela. Nakon ispiranja membrana se inkubira sa sekundarnim (detekcijskim) antitijelom koje je obilježeno peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Korištena su poliklonska anti-mišja antitijela (*Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody*, #7076S, Cell Signaling Technology, SAD) iz seruma konja koja se čuvaju na -20 °C. Otopinu antitijela je potrebno razrijediti omjeru 1:3000. Volumen od 4 μ L otopine antitijela doda se u 12 mL 5 %-tnog obranog mlijeka u TBS+T puferu. Inkubacija sa sekundarnim antitijelom provodi se uz protresivanje tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije slijedi ispiranje tri puta po pet minuta uz protresivanje u TBS+T puferu.

Membrana se zatim inkubira 1 minutu u mraku s reagensom za kemiluminiscencijom koji se priprema miješanjem 5 mg luminola (Sigma-Aldrich, SAD), 1 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 i 14 mL ultračiste vode. Neposredno prije mjerenja u reagens se dodaje 5 μ L H₂O₂ i 150 μ L pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich, SAD) u 10 mL DMSO, a čuva se na sobnoj temperaturi u mraku. Reagens za kemiluminiscenciju u dodiru s HRP na sekundarnom antitijelu emitira svjetlo koje se vizualizira kao tamne vrpce na membrani pomoću uređaja za fotografiranje membrane *Amersham A1600 Imager* (GE Healthcare Life Sciences, SAD).

Pomoću programa ImageQuant TL, Version 8,1 (GE Healthcare Life Sciences, SAD) napravljena je kvantifikacija dobivenih vrpce. Intenzitet jakosti pojedine vrpce iskazan je relativno u odnosu na jednu specifičnu vrpcu interne pozitivne kontrole koja je bila prisutna na svakoj membrani.

3.6 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza napravljena je upotrebom *MedCalc Statistical Software verzija 11.5.1.0* (*MedCalc Software Bvba, Ostend, Belgium*). Normalnost razdiobe za dobivene kvantitativne podatke ispitana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. S obzirom na rezultate tog testa i male skupine uzoraka, rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Za testiranje statistički značajnih razlika između ispitivanih skupina korišten je Mann-Whitneyjev test (za nezavisne uzorke). Razina značajnosti je za sve korištene testove postavljena na 0,05.

4. REZULTATI

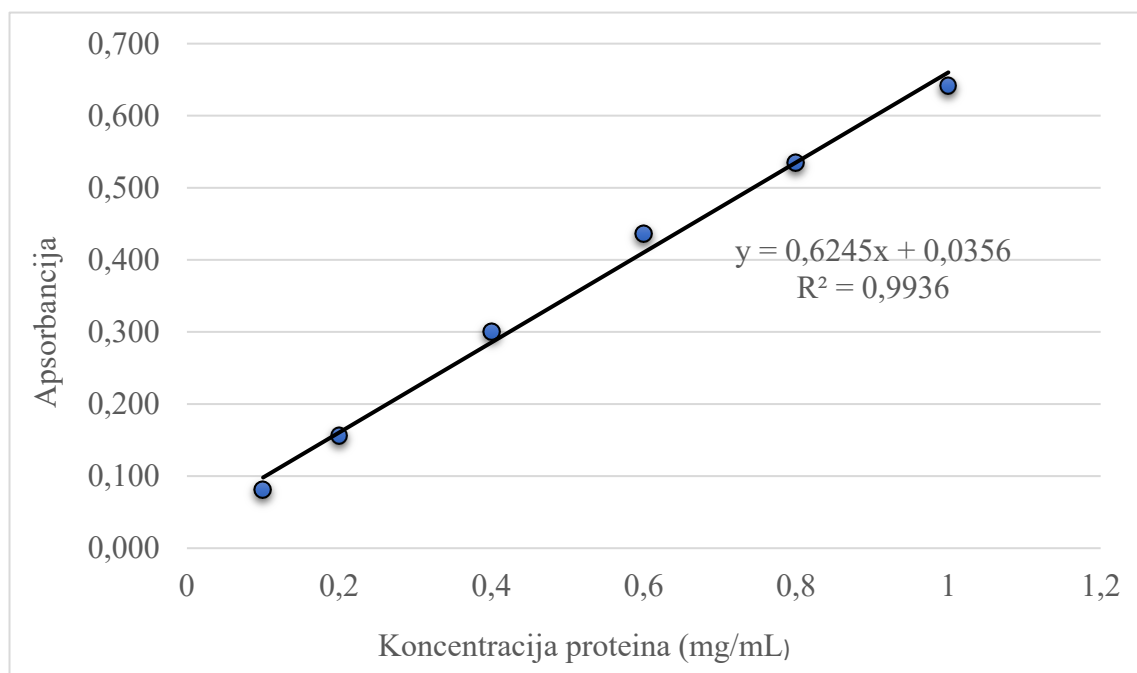
4.1 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U EGZOSOMIMA

Pomoću kolorimetrijske metode s BCA određena je koncentracija ukupnih proteina u uzorcima egzosoma. Na 570 nm se pripremljenim uzorcima mjerila apsorbancija (A) te je iz nje, uz pomoć baždarnog pravca, određena masena koncentracija (γ) proteina. Sva mjerenja rađena su u triplicatu te je iz izmjerenih vrijednosti izračunata srednja vrijednost mjerenja. Za uklanjanje interferencija iz matriksa određena je srednja vrijednost apsorbancije slijepe probe koja je potom oduzeta od izmjerenih vrijednosti ostalih apsorbancija.

Tablica 1. Primjer vrijednosti apsorbancija otopina standarda goveđeg serumskog albumina

γ (mg/mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
A	0,642	0,535	0,436	0,3	0,156	0,081

Baždarni pravac napravljen je iz srednjih vrijednosti apsorbancija standardnih otopina BSA. Njegova linearnost mora biti zadovoljavajuća te se pomoću dobivene jednadžbe pravca određuje masena koncentracija proteina u uzorcima. Raspon koncentracija baždarnog pravca je 0,1 – 1 mg/mL.



Slika 2. Primjer baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina

Kako bi se dobivene vrijednosti masenih koncentracija mogle očitati iz baždarnog pravca, uzorci se prije mjerenja apsorbancije moraju razrijediti 100 puta. Iz tog razloga, nakon uvrštavanja srednjih vrijednosti apsorbancija uzoraka u jednadžbu pravca, dobivene masne koncentracije proteina potrebno je korigirati da se dobiju prvobitne masene koncentracije u uzorcima. Potom se iz masene koncentracije proteina računa volumen proteina koji odgovara masi od 40 µg proteina u uzorku. Na taj se način dobiva optimalna količina proteina koju je potrebno nanijeti na gel za elektroforezu. Dodatno se radi korekcija volumena koji se nanosi na gel zbog razrjeđenja uzoraka s puferom za denaturaciju (6× *Sample Buffer*).

Tablica 2. Prikaz koncentracija ukupnih proteina u uzorcima egzosoma uz izračun volumena uzoraka za SDS-PAGE kod bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om

pre-CRC	γ uzorka razrjeđenog 100 x (mg/mL)	γ uzorka prije razrjeđenja (mg/mL)	V uzorka (40 µg proteina) (µL)	V uzorka (stavljen na gel) (µL)
E1	0,358	35,8	1,12	1,34
E2	0,278	27,8	1,44	1,73
E3	0,207	20,7	1,93	2,32
E4	0,316	31,6	1,27	1,52
E5	0,310	31,1	1,29	1,54
E6	0,210	21,0	1,90	2,29
E9	0,250	25,0	1,60	1,92
E10	0,347	34,7	1,15	1,38
E11	0,394	39,4	1,02	1,22
E12	0,290	29,0	1,38	1,66
E13	0,275	27,5	1,45	1,75
E14	0,247	24,7	1,62	1,94
E15	0,396	39,6	1,01	1,21
E17	0,332	33,2	1,20	1,45
E18	0,466	46,6	0,86	1,03
E19	0,288	28,8	1,39	1,67
E20	0,369	36,9	1,08	1,30
E29	0,493	49,3	0,81	0,97
E30	0,379	37,9	1,06	1,27
E31	0,675	67,5	0,59	0,71

E32	0,594	59,4	0,67	0,81
E33	0,493	49,3	0,81	0,97
E34	0,694	69,4	0,58	0,69
E35	0,557	55,7	0,72	0,86
CRC				
E7	0,297	29,7	1,35	1,62
E11	0,141	14,1	2,84	3,41
E12	0,263	26,3	1,52	1,82
E13	0,203	20,3	1,97	2,37
E14	0,343	34,3	1,17	1,40
E15	0,172	17,2	2,33	2,79
E19	0,180	18,0	2,22	2,66
E21	0,163	16,3	2,46	2,95
E22	0,321	32,1	1,25	1,49
E23	0,137	13,7	2,92	3,50
E24	0,102	10,2	3,92	4,71
E25	0,161	16,1	2,48	2,98
E26	0,228	22,8	1,76	2,11
E27	0,239	23,9	1,67	2,01
E28	0,200	20,0	2,00	2,40
E29	0,180	17,9	2,23	2,67
E30	0,304	30,4	1,32	1,58
E32	0,153	15,3	2,61	3,13
E33	0,247	24,7	1,62	1,95
E35	0,191	19,1	2,10	2,52
E36	0,238	23,8	1,68	2,02
E37	0,177	17,7	2,26	2,71
E38	0,202	20,2	1,98	2,37
E39	0,255	25,5	1,57	1,88
E40	0,277	27,7	1,45	1,73
E41	0,181	18,1	2,21	2,65
E42	0,274	27,4	1,46	1,75
E43	0,275	27,5	1,46	1,75
E44	0,263	26,3	1,52	1,82
E45	0,237	23,7	1,69	2,03
E66	0,334	33,4	1,20	1,44
E67	0,372	37,2	1,08	1,29
E68	0,239	23,9	1,68	2,01
E69	0,264	26,4	1,52	1,82
E70	0,263	26,3	1,52	1,83
E71	0,286	28,6	1,40	1,68
E72	0,430	42,9	0,93	1,12
E73	0,410	41,0	0,98	1,17

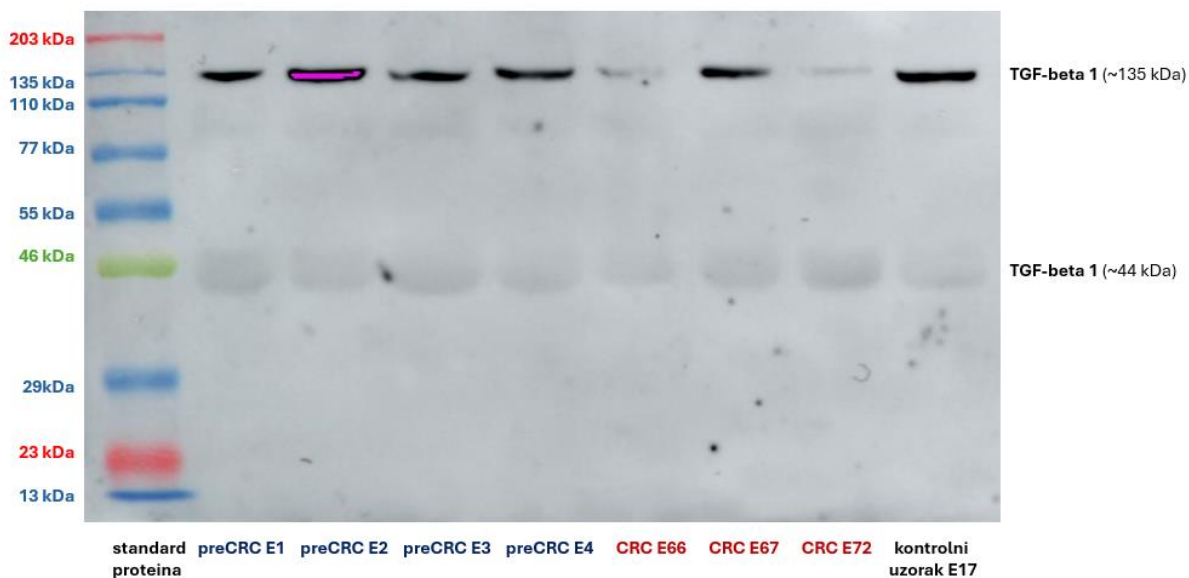
E74	0,292	29,2	1,37	1,64
E76	0,337	33,7	1,19	1,42

4.2 DETEKCIJA TGF- β 1 PROTEINA U EGZOSOMIMA WESTERN BLOT ANALIZOM

Western blot analiza provedena je na 24 uzoraka bolesnika s pre-CRC-om označenima identifikacijskim brojevima (E1 – E6, E9 – E15, E17 – E20, E29 – E35) i na 40 uzoraka bolesnika s CRC-om označenima identifikacijskim brojevima (E7, E11 – E15, E19, E21 – E30, E32, E33, E35 – E45, E66 – E74, E76). U svakoj seriji paralelno s uzorcima nanesen je standard proteina (SP) u prvu jažicu poliakrilamidnog gela, a u zadnju jažicu je nanesena interna pozitivna kontrola (K) (Slika 3).

Kao interna pozitivna kontrola se koristio uzorak egzosoma jednog pre-CRC bolesnika. U njemu je prethodnim analizama dokazana prisutnost TGF- β 1 proteina.

U svim uzorcima egzosoma dobivene su vidljive vrpce za TGF- β 1 protein na oko 44 kDa i intenzivan signal na oko 135 kDa. Veličina od oko 135 kDa odgovara velikom latentnom kompleksu. Nasuprot tome, veličina od oko 44 kDa odgovara molekulknoj masi proproteina koji se sastoji od LAP prosegmenta i TGF- β 1 monomera. U pojedinim uzorcima bolesnika s pre-CRC-om dobivene su vidljive vrpce za TGF- β 1 protein na oko 12 kDa (E32 – E34) i oko 25 kDa (E29, E32). Kod pojedinih uzoraka bolesnika s CRC-om (E14, E20, E21, E24, E27, E32, E41, E44, E69, E74, E76) također su dobivene vidljive vrpce za TGF- β 1 protein na oko 12 kDa što odgovara molekulknoj masi monomera TGF- β 1 proteina. U jednom uzorku bolesnika s CRC-om (E32) dobivena je slaba vrpca na oko 25 kDa koja odgovara TGF- β 1 dimeru, odnosno aktivnom obliku.



Slika 3. Prikaz reprezentativne Western blot membrane s vidljivim vrpčama za TGF-β1 protein (na oko 44 kDa i oko 135 kDa) u uzorcima egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om te internoj pozitivnoj kontroli

4.3 KVANTIFIKACIJA TGF-β1 PROTEINA

Nakon fotografiranja i vizualizacije vrpce na Western blot membranama, napravljena je njihova kvantifikacija pomoću računalnog programa. Intenzitet vrpce na svakoj fotografiji ovisi o mnogim čimbenicima. Jedan od takvih čimbenika je ekspozicija membrane prilikom fotografiranja. Iz tog razloga odabrana je referentna vrpca koju predstavlja interna pozitivna kontrola prisutna u svim serijama čije su vrpce na otprilike 44 i 135 kDa proglašene apsolutnim brojem 1, a ostale vrpce u svim ostalim uzorcima egzosoma su izražene relativno u odnosu na njih.

Tablica 3. Prikaz relativne kvantifikacije vrpci TGF- β 1 proteina u uzorcima egzosoma bolesnika s pre-CRC-om

pre-CRC (N = 24)	135 kDa	44 k Da	25 kDa	12 kDa
E1	0,817	1,347		
E2	1,535	1,148		
E3	0,873	1,120		
E4	0,862	0,965		
E5	1,302	1,182		
E6	0,958	1,127		
E9	1,371	1,107		
E10	1,252	1,181		
E11	1,654	1,157		
E12	2,021	1,225		
E13	1,549	1,468		
E14	1,302	1,590		
E15	1,153	1,058		
E17	0,935	0,880		
E18	0,816	0,968		
E19	1,159	1,053		
E20	0,718	0,975		
E29	1,152	0,840	0,271	
E30	0,798	0,953		
E31	0,711	0,873		
E32	0,956	0,988	0,176	0,244
E33	0,807	0,909		0,188
E34	1,852	0,955		0,134
E35	1,648	0,898		
K	1,000	1,000		

Tablica 4. Prikaz relativne kvantifikacije vrpce TGF- β 1 proteina u uzorcima egzosoma bolesnika s CRC-om

CRC (N = 40)	135 kDa	44 k Da	25 kDa	12 kDa
E7	0,712	1,246		
E11	1,454	1,328		
E12	1,078	1,118		
E13	1,421	1,186		
E14	0,424	0,858		0,546
E15	1,089	1,180		
E19	1,179	1,179		0,582
E21	0,983	1,314		0,518
E22	0,693	1,112		
E23	1,720	1,390		
E24	2,499	1,588		0,575
E25	2,110	1,633		
E26	1,863	1,360		
E27	1,796	1,444		0,308
E28	1,608	1,299		
E29	1,303	1,258		
E30	1,288	1,367		
E32	1,151	1,354	0,600	
E33	1,079	1,162		
E35	0,671	1,105		
E36	0,803	1,425		
E37	0,944	1,230		
E38	0,689	1,082		
E39	1,712	1,252		
E40	1,509	1,469		
E41	1,313	1,139		0,562
E42	0,886	1,091		
E43	0,920	1,176		
E44	0,897	1,490		0,329
E45	0,895	1,722		
E66	0,634	1,137		
E67	0,966	1,459		
E68	1,198	1,267		
E69	0,630	1,266		
E70	0,465	1,038		
E71	1,404	1,210		
E72	0,315	1,385		
E73	0,955	1,118		
E74	1,149	1,270		0,598
E76	0,825	1,361		0,314
K	1,000	1,000		

Tablica 5. Prikaz relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa, zbroja intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa te njihovog omjera u uzorcima egzosoma bolesnika s pre-CRC-om

pre-CRC (N = 24)	135 kDa	zbroj 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa	omjer
E1	0,170	1,347	1,648
E2	1,535	1,148	0,748
E3	0,873	1,120	1,283
E4	0,862	0,965	1,120
E5	1,302	1,182	0,908
E6	0,958	1,127	1,176
E9	1,371	1,107	0,807
E10	1,252	1,181	0,943
E11	1,654	1,157	0,700
E12	2,021	1,225	0,606
E13	1,549	1,468	0,948
E14	1,302	1,590	1,221
E15	1,153	1,058	0,917
E17	0,935	0,880	0,942
E18	0,816	0,968	1,186
E19	1,159	1,053	0,908
E20	0,718	0,975	1,358
E29	1,152	1,110	0,964
E30	0,798	0,953	1,194
E31	0,711	0,873	1,227
E32	0,956	1,408	1,473
E33	0,807	1,097	1,359
E34	1,825	1,089	0,597
E35	1,648	0,898	0,545
medijan	1,153	1,109	0,956
IQR	0,840 - 1,453	0,972 - 1,182	0,857 - 1,224

IQR = interkvartilni raspon

Tablica 6. Prikaz relativnih intenziteta vrpci TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa, zbroja intenziteta vrpci TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa te njihovog omjera u uzorcima egzosoma bolesnika s CRC-om

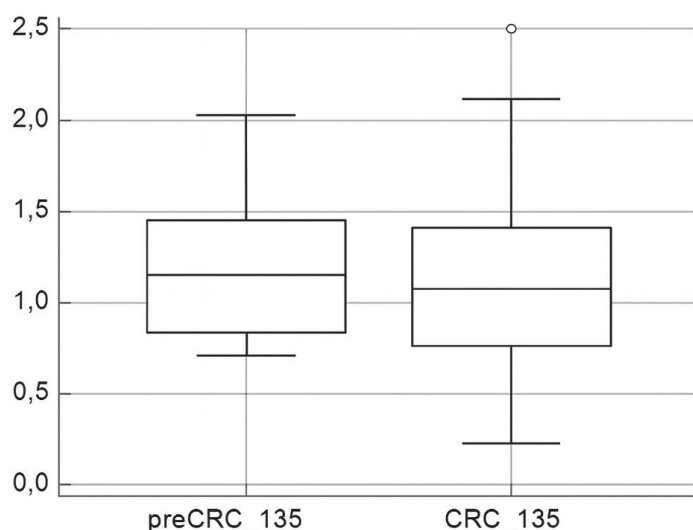
CRC (N = 40)	135 kDa	zbroj 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa	omjer
E7	0,712	1,246	1,749
E11	1,454	1,328	0,913
E12	1,078	1,118	1,038
E13	1,421	1,186	0,835
E14	0,424	1,405	3,312
E15	1,089	1,180	1,083
E19	1,179	1,761	1,493
E21	0,983	1,833	1,865
E22	0,693	1,122	1,618
E23	1,720	1,390	0,808
E24	2,499	2,163	0,865
E25	2,110	1,633	0,774
E26	1,863	1,360	0,730
E27	1,796	1,752	0,975
E28	1,608	1,299	0,808
E29	1,303	1,258	0,966
E30	1,288	1,367	1,062
E32	1,151	2,649	2,301
E33	1,079	1,162	1,077
E35	0,671	1,105	1,648
E36	0,803	1,425	1,775
E37	0,944	1,230	1,302
E38	0,689	1,082	1,571
E39	1,712	1,252	0,731
E40	1,509	1,469	0,974
E41	1,313	1,701	1,295
E42	0,886	1,091	1,232
E43	0,920	1,176	1,278
E44	0,897	1,195	1,332
E45	0,895	1,193	1,333
E66	0,418	0,769	1,841
E67	0,727	1,021	1,405
E68	1,198	1,267	1,058
E69	0,630	1,702	2,702
E70	0,465	1,038	2,232

E71	1,404	1,210	0,861
E72	0,232	1,083	4,676
E73	0,955	1,118	1,170
E74	1,149	1,868	1,626
E76	0,825	1,675	2,029
medijan	1,079	1,255	1,287
IQR	0,765 - 1,413	1,142 - 1,551	0,970 - 1,698

IQR = interkvartilni raspon

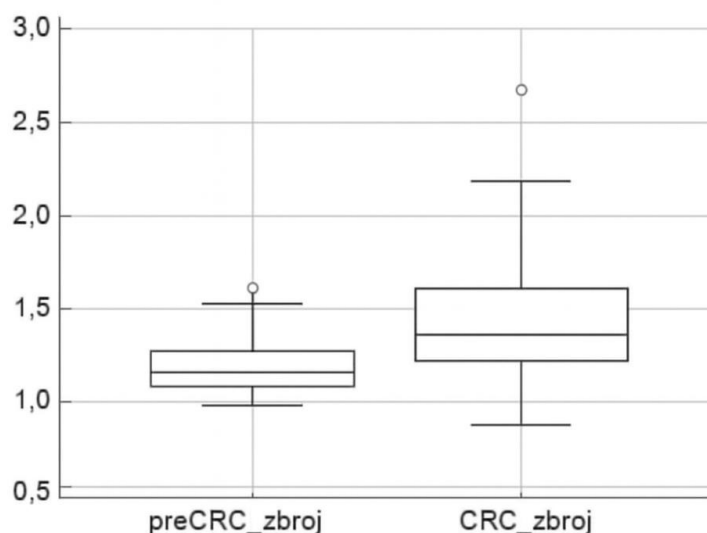
Iz priloženih podataka, napravljena je statistička analiza pomoću Mann-Whitneyjevog testa pri čemu su uspoređene tri skupine rezultata dobivene na uzorcima bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.

U prvoj skupini rezultata je ispitano postoji li statistički značajna razlika u relativnim intenzitetima vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa (za koje pretpostavljamo da predstavljaju veliki latentni kompleks) između uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i uzoraka egzosoma bolesnika s CRC-om. Medijan (interkvartilni raspon) uzoraka bolesnika s pre-CRC-om iznosio je 1,153 (0,840 - 1,453), dok je medijan (interkvartilni raspon) uzoraka bolesnika s CRC-om iznosio 1,079 (0,765 - 1,413), uz $P = 0,524$, što upućuje na to da ne postoji statistički značajna razlika u relativnim intenzitetima vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa između egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i egzosoma bolesnika s CRC-om (Slika 4).



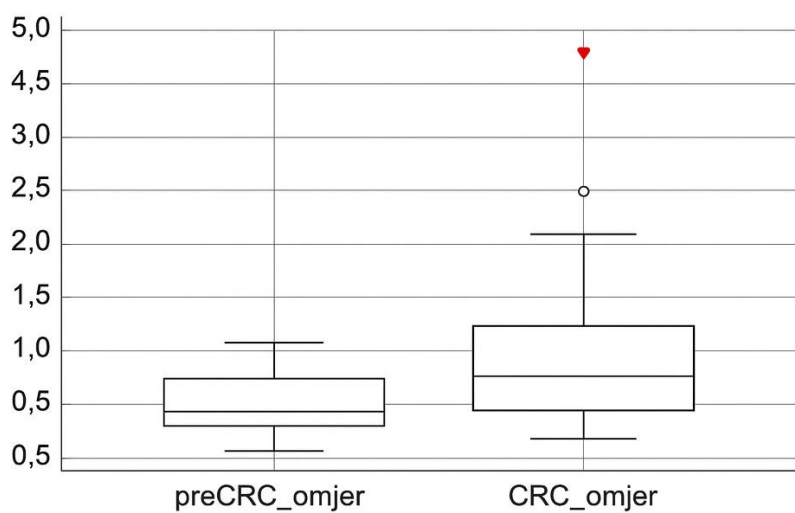
Slika 4. Grafički prikaz razlike u relativnim intenzitetima vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa između uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om

U drugoj skupini rezultata je ispitano postoji li statistički značajna razlika u zbroju relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa (koje predstavljaju ostale, uključujući aktivne oblike TGF- β 1 proteina) između uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i uzoraka egzosoma bolesnika s CRC-om. Medijan (interkvartilni raspon) uzoraka bolesnika s pre-CRC-om iznosio je 1,109 (0,972 - 1,182), dok je medijan (interkvartilni raspon) uzoraka bolesnika s CRC-om iznosio 1,255 (1,142 - 1,551), uz $P < 0,001$, što upućuje na to da je zbroj relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa iz egzosoma bolesnika s CRC-om statistički značajno veći nego u bolesnika s pre-CRC-om (Slika 5).



Slika 5. Grafički prikaz razlike u zbroju relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa između uzoraka egzozoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om

U trećoj skupini rezultata je ispitano postoji li statistički značajna razlika u omjeru zbroja relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa i relativnog intenziteta vrpce na oko 135 kDa između uzoraka egzozoma bolesnika s pre-CRC-om u odnosu na uzorke egzozoma bolesnika s CRC-om. Medijan (interkvartilni raspon) omjera iznosio je 0,956 (0,858 - 1,224) kod bolesnika s pre-CRC-om, dok je kod bolesnika s CRC-om iznosio 1,287 (0,970 - 1,699), uz $P = 0,011$, što upućuje na to da je omjer zbroja relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa i relativnog intenziteta vrpce na oko 135 kDa iz egzozoma bolesnika s CRC-om statistički značajno veći nego u bolesnika s pre-CRC-om (Slika 6).



Slika 6. Grafički prikaz razlike u omjeru zbroja relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa i relativog intenziteta vrpce na oko 135 kDa između uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitano je postoje li razlike u koncentracijama TGF- β 1 proteina u egzosomima dobivenima metodom tekuće biopsije iz plazme bolesnika s pre-CRC-om i bolesnika s CRC-om. Western blot analizom dokazana je prisutnost TGF- β 1 proteina u svih 24 uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i u svih 40 uzoraka egzosoma bolesnika s CRC-om.

Kvantifikacijom vrpce utvrđeno je da su vrpce TGF- β 1 proteina od oko 44 kDa kod 11 uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om manjeg intenziteta od interne pozitivne kontrole, a preostalih 13 uzoraka ima nešto veći intenzitet od interne pozitivne kontrole. Također su u tri uzorka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om utvrđene vrpce TGF- β 1 proteina od oko 12 kDa, a u dva uzorka egzosoma vrpce TGF- β 1 proteina od oko 25 kDa. S druge strane, vrpce TGF- β 1 proteina od oko 44 kDa su u gotovo svim uzorcima egzosoma bolesnika s CRC-om (osim u jednom uzorku) većeg intenziteta od interne pozitivne kontrole te je utvrđena vrpca TGF- β 1 proteina od oko 12 kDa u devet uzoraka egzosoma i vrpca TGF- β 1 proteina od oko 25 kDa u jednom uzorku egzosoma. Western blot analizom je dobivena vrpca TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa u svim uzorcima egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.

Provedenom statističkom analizom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u relativnim intenzitetima vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa (za koje pretpostavljamo da predstavljaju veliki latentni kompleks) između uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i uzoraka egzosoma bolesnika s CRC-om. Međutim, također je utvrđeno da je zbroj relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa (koje predstavljaju ostale, uključujući aktivne oblike TGF- β 1 proteina) iz egzosoma bolesnika s CRC-om statistički značajno veći nego u bolesnika s pre-CRC-om. Navedeni rezultat podupire činjenicu da je ekspresija TGF- β 1 proteina veća što je bolesnik u više uznapredovalom stanju CRC-a (Li i sur., 2022).

Nadalje, stavljajući u omjer zbroj relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa u odnosu na relativni intenzitet vrpce na oko 135 kDa utvrđeno je da je navedeni omjer statistički značajno veći u uzorcima egzosoma bolesnika s CRC-om nego u bolesnika s pre-CRC-om.

TGF- β 1 protein na oko 44 kDa pokazuje da je došlo do cijepanja pre-proTGF- β 1 proteina i nastanka proproteina iz kojeg se može otpustiti aktivni oblik TGF- β 1 proteina (oko 25 kDa) (de Streel i Lucas, 2021). TGF- β 1 protein na oko 12 kDa predstavlja prisutnost TGF- β 1 monomera iz kojeg također može nastati aktivni oblik od oko 25 kDa. Sve navedeno nas upućuje na to da

u uzorcima egzosoma bolesnika s CRC-om u odnosu na bolesnike s pre-CRC-om postoji više TGF- β 1 proteina koji odražavaju pokrenuti proces aktivacije i stvaranje aktivne forme proteina koja utječe na progresiju tumora, pojačanje tumorske imunosupresije, olakšava angiogenezu i razvoj metastaza (Kubiczkova i sur., 2012). Jedna studija je ispitala utječu li egzosomi CRC-a na nastanak jetrenih metastaza. Njihovi rezultati su potvrdili da egzosomi, podrijetlom iz tkiva CRC-a, u hepatocitima preko TGF- β 1 proteina aktiviraju TGF- β 1/SMAD signalni put te posljedično tome dolazi do razvoja metastaza (Pucci i sur., 2023).

Prednost ovog istraživanja jest primjena minimalno invazivne metode tekuće biopsije. Pomoću nje su prikupljeni uzorci periferne krvi bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om te su uspješno izolirani egzosomi. Uz njenu neinvazivnost, kao prednost se nameće mogućnost kvantifikacije koja omogućuje jasniji uvid u razlike u sadržaju TGF- β 1 proteina između bolesnika s pre-CRC-om i bolesnika s CRC-om. Promjena sadržaja TGF- β 1 proteina u egzosomima čini tekuću biopsiju potencijalno idealnom metodom za praćenje stadija bolesti i terapijskog odgovora. Tako su na primjer, u jednoj studiji uspoređeni egzosomi zdravih pojedinaca s egzosomima bolesnika koji boluju od akutne mijeloične leukemije (engl. *acute myeloid leukemia*, AML). Western blot analizom se potvrdilo da egzosomi bolesnika s AML-om sadrže proprotein na oko 44 - 50 kDa, LAP segment na oko 37 kDa i zreli TGF- β 1 protein na oko 25 kDa. Također su pokazali da egzosomi izolirani iz plazme bolesnika u različitom stadiju bolesti te prije, tijekom i nakon kemoterapije nose sva tri oblika TGF- β 1 proteina u različitim omjerima (Hong i sur., 2014). Nadalje, izrađena je studija u kojoj su uspoređeni oblici TGF- β 1 proteina u egzosomima neozračenih i ozračenih stanica raka dojke. Prvi put je pokazano da je u egzosomima ozračenih stanica porasla razina aktivnog oblika TGF- β 1 proteina u odnosu na egzosome neozračenih stanica raka dojke (Al-Abedi i sur., 2021). Ovi rezultati podupiru vrijednost tekuće biopsije kao neinvazivne metode za praćenje terapijskog odgovora.

Glavno ograničenje ovoga istraživanja jest korištenje relativno malog broja uzoraka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om. Glavni razlog tome je taj što smo, unatoč prikupljenom i obrađenom većem broju uzoraka, iz konačnih rezultata morali ukloniti određeni broj upitnih rezultata, primjerice onih kod kojih nam interne pozitivne kontrole na slikama Western blot membrana nisu bile jasno vidljive, što je dovelo do toga da nije bilo moguće ispravno odrediti relativne intenzitete vrpce TGF- β 1 proteina. Također smo uklonili rezultate svih uzoraka kod kojih je bilo problema pri nanošenju na gel, zbog čega smo pretpostavili da konačni rezultat nije odražavao stvarnu koncentraciju TGF- β 1 proteina. Bilo bi poželjno u nastavku ovog istraživanja ponovno obraditi izbačene uzorke bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om, kako bi se

dobio još jasniji uvid o prisutnosti određenog oblika TGF- β 1 proteina u početnom stadiju bolesti u usporedbi s uznapredovanim stadijem CRC-a.

6. ZAKLJUČCI

Pomoću Western blot analize u svim uzorcima egzosoma izoliranim iz plazme bolesnika s pre-CRC-om i bolesnika s CRC-om dokazana je prisutnost TGF- β 1 proteina.

U svim uzorcima egzosoma dobiven je jaki signal vrpce za TGF- β 1 protein na oko 135 kDa, što odgovara velikom latentnom kompleksu.

Također su u svim uzorcima egzosoma dobivene vrpce za TGF- β 1 protein na otprilike 44 kDa, što odgovara TGF- β 1 proproteinu.

U dva uzorka egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i jednom uzorku egzosoma bolesnika s CRC-om je također uočena slaba vrpca na oko 25 kDa, što odgovara TGF- β 1 dimeru, odnosno aktivnom obliku.

U pojedinim uzorcima bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om dobivene su slabe vrpce na oko 12 kDa, što odgovara TGF- β 1 monomeru.

Statističkom obradom podataka utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između egzosoma bolesnika s pre-CRC-om i bolesnika s CRC-om u relativnim intenzitetima vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa.

Međutim, zbroj relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa kao i omjer zbroja relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa i relativnog intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa statistički su značajno veći u egzosomima bolesnika s CRC-om u odnosu na egzosome bolesnika s pre-CRC-om, što upućuje na progresiju tumora i potencijalni razvoj metastaza.

Navedeno pokazuje veliki potencijal tekuće biopsije kao neinvazivne metode pomoću koje će se omogućiti probir, postavljanje dijagnoze i praćenje bolesti kod bolesnika s CRC-om.

7. ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc Aniti Somborac Bačuri, na ukazanoj prilici da dodatno produbim vlastito znanje i vještine te da tijekom izrade ovoga rada pobliže učim od nje. Također, hvala na konstantnom vodstvu, nesebičnoj pomoći i strpljenu tijekom rada u laboratoriju te kasnije tokom pisanja.

Zahvaljujem se i višoj tehničarki na Zavodu za medicinsku biokemiju i Hematologiju, Suzani Hrajinik Trninić, na trudu i pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja u laboratoriju.

8. LITERATURA

Aelvoet AS, Buttitta F, Ricciardiello L, Dekker E. Management of FAP and MAP; new insights. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2022;58-59:101793.

Aggarwal S, Chougale A, Talwar V, Shukla P, Rohtagi N, Verma A, et al. Liquid Biopsy and Colorectal Cancer. *South Asian J Cancer*, 2025;13(4):246-250.

Al-Abedi R, Tuncay Cagatay S, Mayah A, Brooks SA, Kadhim M. Ionising Radiation Promotes Invasive Potential of Breast Cancer Cells: The Role of Exosomes in the Process. *Int J Mol Sci*, 2021;22(21):11570.

Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, 2015;9:520.

Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis. *Br J Cancer*, 2015;112(3):580–93.

Botteri E, Borroni E, Sloan EK, Bagnardi V, Bosetti C, Peveri G, et al. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, 2020;115(12):19409.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2018;68(6):394–424.

Burnett-Hartman AN, Lee JK, Demb J, Gupta S. An Update on the Epidemiology, Molecular Characterization, Diagnosis, and Screening Strategies for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 2021;160(4):1041–9.

Colon cancer - Symptoms and causes, Mayo Clinic, 2024., www.mayoclinic.org, pristupljeno 29. srpnja 2025.

de Streel G, Lucas S. Targeting immunosuppression by TGF- β 1 for cancer immunotherapy. *Biochem Pharmacol*, 2021;192:114697.

Danielpour D. Advances and Challenges in Targeting TGF- β Isoforms for Therapeutic Intervention of Cancer: A Mechanism-Based Perspective. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024;17(4):533.

Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, et al. TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*, 2024;9(1):61.

Devan AR, Pavithran K, Nair B, Murali M, Nath LR. Deciphering the role of transforming growth factor-beta 1 as a diagnostic-prognostic-therapeutic candidate against hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2022;28(36):5250–64.

Dinarvand P, Davaro EP, Doan JV, Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, et al. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. *Arch Pathol Lab Med*, 2019;143(11):1382–98.

Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj, 2022., www.hzjz.hr, pristupljeno 22. srpnja 2025.

European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working Group; von Karsa L, Patnick J, Segnan N, Atkin W, Halloran S, Lansdorp-Vogelaar I, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. *Endoscopy*, 2013;45(1):51–9.

Fasano M, Pirozzi M, Miceli CC, Cocule M, Caraglia M, Boccellino M, et al. TGF- β Modulated Pathways in Colorectal Cancer: New Potential Therapeutic Opportunities. *In J Mol Sci*, 2024;25(13):7400.

He J, Xi N, Han Z, Luo W, Shen J, Wang S, et al. The Role of Liquid Biopsy Analytes in Diagnosis, Treatment and Prognosis of Colorectal Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022;13:875442.

Hong CS, Muller L, Whiteside TL, Boyiadzis M. Plasma Exosomes as Markers of Therapeutic Response in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol*, 2014;5:160.

Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*, 2022;14(7):1732.

Hui J, Zhou M, An G, Zhang H, Lu Y, Wang X, et al. Regulatory role of exosomes in colorectal cancer progression and potential as biomarkers. *Cancer Biol Med*, 2023;20(8):575–98.

Ionescu V, Gheorghe G, Nicolae Bacalbaşa, Alexandru Laurențiu Chiotoroiu, Camelia Cristina Diaconu. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas)*, 2023;59(9):1646.

Kastrinos F, Kupfer SS, Gupta S. Colorectal Cancer Risk Assessment and Precision Approaches to Screening: Brave New World or Worlds Apart? *Gastroenterology*, 2023;164(5):812–27.

Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*, 2012;10(1):183.

Lawler T, Parlato L, Warren Andersen S. The histological and molecular characteristics of early-onset colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*, 2024;14:1349572.

Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev*, 2021;35(11-12):787–820.

Li S, Gu X, Yi S. The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor- β on Nerve Regeneration. *Cell Transplant*, 2017;26(3):381–94.

Li X, Wu Y, Tian T. TGF- β Signaling in Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): From Underlying Mechanism to Potential Applications in Clinical Development. *Int J Mol Sci*, 2022;23(22):14436.

Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma: a General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 2017;18(1):197.

Matsuda T, Fujimoto A, Igarashi Y. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Public Health Strategies. *Digestion*, 2025;106(2):91-99.

Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 2016;469(2):125–34.

Paskeh MDA, Entezari M, Mirzaei S, Zabolian A, Saleki H, Naghdi MJ, et al. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol*, 2022;15(1):83.

Pucci M, Moschetti M, Urzì O, Loria M, Conigliaro A, Di Bella MA, et al. Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles induce TGFβ1-mediated epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes. *Cancer Cell Int*, 2023;23(1):77.

Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*, 2019;14(2):89-103.

Seppälä TT, Burkhart RA, Katona BW. Hereditary colorectal, gastric, and pancreatic cancer: comprehensive review. *BJS Open*, 2023;7(3):zrad023.

Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*, 2022;162(3):715-730.e3.

Shaukat A, Kahi CJ, Burke CA, Rabeneck L, Sauer BG, Rex DK. ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021. *Am J Gastroenterol*, 2021;116(3):458–479.

Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022;19(8):521-531.

Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*, 2016;11:967–76.

Svjetska zdravstvena organizacija, 2023., www.who.int, pristupljeno 22. srpnja 2025.

Tao XY, Li QQ, Zeng Y. Clinical application of liquid biopsy in colorectal cancer: detection, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*, 2024;23(1):145.

Titu S, Gata VA, Decea RM, Mocan T, Dina C, Irimie A, et al. Exosomes in Colorectal Cancer: From Physiology to Clinical Applications. *Int J Mol Sci*, 2023;24(5):4382.

Transforming growth factor β -1 proprotein, 2023., www.uniprot.org, pristupljeno 11. kolovoza 2025.

Tsukanov VV, Vasyutin AV, Tonkikh JL. Risk factors, prevention and screening of colorectal cancer: A rising problem. *World J Gastroenterol*, 2025;31(5):98629.

Understanding Your Pathology Report: Invasive Adenocarcinoma of the Colon, www.cancer.org, pristupljeno 29. srpnja 2025.

Verbanac D, Čeri A, Hlapčić I, Shakibaei M, Brockmueller A, Krušlin B, Ljubičić N, Baršić N, Detel D, Batičić L, Rumora L, Somborac Bačura A, Štefanović M, Čelap I, Demirović A, Petlevski R, Petrik J, Grdić Rajković M, Hulina Tomašković A, Rako I, Saso L, Barišić K. Profiling Colorectal Cancer in the Landscape Personalized Testing - Advantages of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci*, 2021;22(9):4327.

Xie F, Ling L, van Dam H, Zhou F, Zhang L. TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018;50(1):121–32.

Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*, 2021;14(10):101174.

Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer*, 2022;21(1):56.

Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci*, 2018;14(2):111–123.

Zhou H, Zhu L, Song J, Wang G, Li P, Li W, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2022;21(1):86.

9. SAŽETAK

Ema Žanić

Usporedba koncentracija TGF- β 1 proteina u egzosomima dobivenima metodom tekuće biopsije iz plazme bolesnika s pre-kolorektalnim karcinomom i kolorektalnim karcinomom

Kolorektalni karcinom (CRC) je bolest koja zbog stalnog porasta u prevalenciji predstavlja veliki javnozdravstveni problem. U ranoj fazi bolesnik je bez simptoma te je rana dijagnostika ključna za otkrivanje ove bolesti u početnom stadiju kada je preživljenje još visoko. Postojeće dijagnostičke metode, kao što su kolonoskopija i tkivna biopsija, su poznate po svojoj invazivnosti. Iz tog je razloga razvijena tekuća biopsija, neinvazivna metoda koja uključuje mogućnost izolacije egzosoma iz periferne krvi bolesnika. Egzosomi prenose brojne molekule koje se mogu koristiti u dijagnostici i praćenju bolesti, a TGF- β 1 protein je upravo takva molekula. Ovaj protein regulira procese poput rasta, proliferacije i diferencijacije stanica, a mutacije u njegovoj signalizaciji dovode do nekontroliranog rasta stanica, proliferacije, progresije do faze tumora te razvoja metastaza.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike u koncentracijama TGF- β 1 proteina u egzosomima dobivenima metodom tekuće biopsije iz plazme bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.

Egzosomi su iz uzoraka plazme bolesnika s pre-CRC-om (N = 24) i CRC-om (N = 40) izolirani pomoću komercijalno dostupnog kompleta reagensa. Koncentracija proteina je u svim uzorcima određena spektrofotometrijskom metodom s bicinkoniničnom kiselinom nakon čega je provedena Western blot analiza. U svim uzorcima je dokazana prisutnost TGF- β 1 proteina te je napravljena relativna kvantifikacija vrpce TGF- β 1 proteina.

Statističkom obradom podataka utvrđeno je da nema razlike između bolesnika s pre-CRC-om i bolesnika s CRC-om u relativnim intenzitetima vrpce TGF- β 1 proteina na oko 135 kDa. Međutim, zbroj relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na oko 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa kao i omjer zbroja relativnih intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na 44 kDa, 25 kDa i 12 kDa i relativnog intenziteta vrpce TGF- β 1 proteina na 135 kDa statistički su značajno veći u egzosomima bolesnika s CRC-om i u odnosu na egzosome bolesnika s pre-CRC-om.

Navedeno pokazuje veliki potencijal tekuće biopsije kao neinvazivne metode pomoću koje bi moglo biti moguće praćenje progresije tumora i razvoja metastaza kod bolesnika s CRC-om.

Ključne riječi: egzosomi, kolorektalni karcinom, pre-kolorektalni karcinom, tekuća biopsija, TGF- β 1 protein

10. SUMMARY

Ema Žanić

Comparison of TGF- β 1 protein concentrations in exosomes obtained by liquid biopsy from the plasma of patients with pre-colorectal cancer and colorectal cancer

Colorectal cancer (CRC) is a major public health problem due to its constant increase in prevalence. In the early stages, the patient is asymptomatic, and early diagnosis is crucial for detecting this disease in its initial stages when survival is still high. Existing diagnostic methods, such as colonoscopy and tissue biopsy, are known for their invasiveness. For this reason, liquid biopsy, a non-invasive method that includes the possibility of isolating exosomes from the patient's peripheral blood, was developed. Exosomes carry numerous molecules that can be used in the diagnosis and monitoring of the disease, and the TGF- β 1 protein is such a molecule. This protein regulates processes such as cell growth, proliferation, and differentiation. Mutations in its signaling pathway lead to uncontrolled cell growth, proliferation, progression to the tumor stage, and the development of metastases.

The aim of this study was to examine the differences in concentrations of TGF- β 1 protein in exosomes obtained by the liquid biopsy from the plasma of patients with pre-CRC and CRC.

Exosomes were isolated from plasma samples of patients with pre-CRC (N = 24) and CRC (N = 40) using a commercially available reagent kit. Protein concentration in all samples was determined by the spectrophotometric method with bicinchoninic acid, followed by Western blot analysis. The presence of TGF- β 1 protein was confirmed in all samples, and the relative quantification of TGF- β 1 protein bands was performed.

Statistical data processing revealed no difference between patients with pre-CRC and patients with CRC in the relative intensities of TGF- β 1 protein bands at around 135 kDa. However, the sum of the relative intensities of the TGF- β 1 protein bands at around 44 kDa, 25 kDa and 12 kDa, as well as the ratio of the sum of the relative intensities of the TGF- β 1 protein bands at 44 kDa, 25 kDa and 12 kDa and the relative intensity of the TGF- β 1 protein bands at 135 kDa were statistically significantly higher in the exosomes of patients with CRC as compared to the exosomes of patients with pre-CRC.

The above shows the great potential of liquid biopsy as a non-invasive method that could be used to monitor tumor progression and the development of metastases in patients with CRC.

Keywords: exosomes, colorectal cancer, pre-colorectal cancer, liquid biopsy , TGF- β 1 protein