



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Medicina

Klinikinės medicinos instituto,
Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinika

Agnė Sidabraitė, VI kursas, 15 grupė

VIENTISŲJŲ STUDIJŲ MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

CRISPR-Cas sistemos ir ankstyva cholangiokarcinomos diagnostika

Usage of CRISPR-Cas Systems for Early Cholangiocarcinoma Diagnostics

Darbo vadovas

Doc. dr. Aistė Kielaitė - Gulla

Klinikos vadovas

Prof. habil. dr. Kęstutis Strupas

Vilnius, 2025-05-10

agne.sidabraite@mf.stud.vu.lt

TURINYS

1. SANTRUMPOS.....	3
2. SANTRAUKA.....	4
3. SUMMARY	5
4. ĮVADAS.....	6
5. TIRIAMIEJI IR METODAI	9
6. REZULTATAI	10
6.1. Cholangiokarcinoma	10
6.1.1. Epidemiologija.....	11
6.1.2. Patogenezė ir rizikos veiksniai.....	12
6.1.3. Klinika ir diagnostika.....	12
6.2. CRISPR-Cas sistemų veikimo mechanizmas ir klasifikacija	14
6.3. Skystosios biopsijos biožymenys ankstyvai cholangiokarcinomos diagnostikai	17
6.3.1. Cirkuliuojančios navikinės ląstelės.....	18
6.3.2. Cirkuliuojanti navikinė DNR.....	18
6.3.3. MikroRNR	18
6.3.4. Ekstraląstelinės pūslelės.....	23
6.4. CRISPR-Cas sistemų ir mikroRNR vaidmuo cholangiokarcinomos ir kitų onkologinių ligų diagnostikoje	26
6.4.1. Tradiciniai miRNR aptikimo metodai.....	26
6.4.2. CRISPR-Cas sistemomis paremtų molekulinės diagnostikos metodų kūrimas...	27
6.4.3. CRISPR-Cas sistemos cholangiokarcinomos ir kitų onkologinių ligų diagnostikoje	28
6.4.4. CRISPR-Cas sistemos ir izoterminė amplifikacija	29
6.5. CRISPR-Cas sistemoms cholangiokarcinomos diagnostikoje: iššūkiai ir ateities perspektyvos	31
7. DISTALINĖS CHOLANGIOKARCINOMOS, KASOS LATAKŲ ADENOKARCINOMOS IR GERYBINIŲ TULŽIES LATAKŲ BŪKLIŲ DIFERENCINĖS DIAGNOSTIKOS TEORINIS PROTOKOLAS	32
7.1. Tiriamieji ir metodai	32
7.2. Tikėtini rezultatai ir reikšmė.	36
8. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS	36
9. IŠVADOS.....	38
10. PADĖKA.....	38
11. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	38

1. SANTRUMPOS

CC – Cholangiocharcinoma

iCC - Intrahepatinė cholangiocharcinoma

eCC - Ekstrahepatinė cholangiocharcinoma

pCC - Perihiliarinė cholangiocharcinoma

dCC - Distalinė cholangiokarcinoma

SB - Skystoji biopsija

miRNR – MikroRNR

EP - Ekstraląstelinė pūslelė

CRISPR - taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę palindrominiai pasikartojimai (angl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

Cas – su CRISPR asocijuoti baltymai (angl. CRISPR-associated proteins)

SpyCas9 - *Streptococcus pyogenes* Cas9

PAM - Proskirtukui artimas motyvas (angl. *proto-spacer adjacent motif*)

ncRNR - Nekoduojanti RNR (angl. non-coding RNA)

CTC - Cirkuliuojančios navikinės ląstelės

cfDNR - Laisvai cirkuliuojanti DNR (angl. *cell-free DNA*)

ctDNR - Cirkuliuojanti navikinė DNR (angl. *circulating tumor DNA*, ctDNA)

sgRNR – Kompleksas iš crRNR ir tracrRNR (angl. *single guide RNA*; sgRNA)

pre-crRNR - pirminė CRISPR RNR

crRNR - CRISPR RNR

tracrRNR - Transaktyvuojanti CRISPR RNR (angl. *Trans-activating CRISPR RNA*)

PSC - Pirminis sklerozuojantis cholangitas

CA 19-9 - Karbohidratinis antigenas 19-9

MMR - DNR neatitikčių taisymas (angl. *DNA mismatch repair*, MMR)

TNF- α - Naviko nekrozės faktorius alfa

IL-6 - Interleukinas-6

COX-2 - Ciklooksigenazė-2

Ago2 - Argonautas 2

PDAC - Kasos lataų adenokarcinoma (angl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*)

HCC - Hepatoceliulinė karcinoma

NSKL - Nealkoholinė suriebėjusių kepenų liga

NSCLC - Nesmulkių ląstelių plaučių karcinoma (angl. *Non-small cell lung cancer*)
PGR - Polimerazinė grandininė reakcija
AT-PGR - Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija
NKS - Naujos kartos sekoskaita
HR - Homologinė reparacija
NHEJ - Nehomologinis galų sujungimas (angl. *non-homologous end joining*)
RCA – Žiedinė amplifikacija (angl. *Rolling Circle Amplification*)
RACE - angl. *Rolling Circle Amplification-assisted CRISPR/Cas9 Cleavage*
SHERLOCK - angl. *Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter un-LOCKing*
DETECTR - angl. *DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*
LAMP - Kilpinė izoterminė amplifikacija (angl. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*)
EXPAR - Eksponentinė amplifikacijos reakcija (angl. *Exponential Amplification Reaction*)
SDA - Gijos poslinkio amplifikacija (angl. *Strand Displacement Amplification*)
HCR - Hibridinė grandinės reakcija (angl. *Hybridization chain reaction*)
CHA - Katalizuota kilpinė sąranka (angl. *Catalyzed hairpin assembly*)
FI - Fluorescencijos intensyvumas

2. SANTRAUKA

Įvadas. Cholangiokarcinoma (CC) – tai piktybinis navikas, kylantis iš intrahepatinių ar ekstrahepatinių tulžies latakų epitelio. Dėl savo etiologinio ir morfologinio heterogeniškumo bei asimptominės ligos pradžios, ankstyva CC diagnozė dažnai tampa apsunkinta, o gydymo galimybės ribotos. Tūrinio proceso sukeliama nespecifiniai klinikiniai simptomai ir panaši anatominė lokalizacija kelia papildomų diagnostinių iššūkių distalinės cholangiokarcinomos (dCC), kasos latakų adenokarcinomos (PDAC) ir kitų piktybinių ar gerybinių periampulinės srities būklių diferenciacijoje. Šiuo metu taikomi diagnostiniai metodai - radiologiniai tyrimai ir serumo naviko biožymenys (pvz., CA 19-9) - pasižymi ribotu jautrumu ir specifiškumu, todėl vis aktualesnė tampa naujų, patikimų bei minimaliai invazinių diagnostinių metodų paieška. Viena pažangiausių transliacinės medicinos kryptų yra skystoji biopsija (SB), leidžianti aptikti įvairius naviko biožymenis (pvz. mikroRNR (miRNR)) organizmo skysčiuose. CRISPR-Cas sistemų ir SB apjungimas gali reikšmingai prisidėti prie ankstyvos CC diagnostikos tikslumo gerinimo, sumažinti invazinių procedūrų poreikį ir taip gerinti pacientų išgytį.

Tiriamieji ir metodai. Atlikta išsami pastarųjų metų (2015–2025) mokslinės literatūros apžvalga, naudojant pagrindines medicinos duomenų bazes (PubMed, Web of Science, Google Scholar, Embase). Paieškai buvo naudojami šie MeSH terminai įvairiose kombinacijose: „*cholangiocarcinoma*“, „*liquid biopsy*“, „*microRNA*“, „*CRISPR-Cas*“. Tolesnei analizei buvo atrinkti tik originalūs straipsniai, publikuoti anglų kalba. Papildomai pristatomas teorinis diagnostikos protokolas paremtas žiedinės amplifikacijos (gausinimo) (angl. *rolling circle amplification*, RCA) ir CRISPR-Cas9 deriniu (RACE, angl. *Rolling Circle Amplification-assisted CRISPR/Cas9 Cleavage*). Šis metodas orientuotas į miRNR-16 ir miRNR-877, esančių kraujo plazmos kilmės egzosomose, analizę, siekiant patikimai atskirti dCCA nuo PDAC bei gerybinių tulžies latakų ligų.

Rezultatai. Atlikta mokslinės literatūros analizė atskleidžia, kad SB, nustatant kūno skysčiuose cirkuliuojančias miRNR (pvz., miRNR-21, miRNR-16, miRNR-877), būdingas didelis diagnostinis tikslumas, reikalingas ankstyvai CC diagnozei. Šį metodą papildžius inovatyviomis CRISPR-Cas technologijomis, kaip siūlomas RACE metodas, galima būtų dar labiau padidinti diagnostinį tikslumą ir paspartinti ankstyvų terapinių sprendimų priėmimą. Tai vienas esminių veiksnių siekiant nepalankių pacientų išiečių gerinimo.

Išvados. SB kartu su CRISPR-Cas sistemomis ateityje gali reikšmingai prisidėti prie tikslesnės CC diagnostikos, mažinant invazinių procedūrų poreikį ir taip gerinant pacientų gydymo rezultatus. Vis dėlto, šie metodai išlieka eksperimentiniai ir reikalauja išsamaus klinikinio patvirtinimo ir standartizavimo prieš diegiant juos į kasdienę klinikinę praktiką.

Raktažodžiai. Cholangiokarcinoma (CC), skystoji biopsija (SB), CRISPR-Cas, mikroRNR (miRNR), ankstyvoji diagnostika, biožymenys, minimaliai invazinė diagnostika.

3. SUMMARY

Background. Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant tumor arising from the epithelium of intrahepatic or extrahepatic bile ducts. Due to its etiological and morphological heterogeneity, as well as the asymptomatic onset of the disease, early diagnosis of CCA is often challenging, and treatment options are severely limited. The non-specific clinical symptoms caused by tumor mass effect and the similarity of anatomical localization pose additional diagnostic difficulties in differentiating distal cholangiocarcinoma (dCCA), pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and other malignant or benign periampullary conditions. Currently used diagnostic methods - radiological imaging and serum tumor markers (e.g., CA 19-9) - demonstrate limited sensitivity and specificity, thus highlighting the growing need for novel,

reliable, and minimally invasive diagnostic approaches. Liquid biopsy (LB) represents one of the most advanced and promising approaches in translational medicine, which allows for the detection of specific tumor biomarkers (e.g., microRNAs (miRNAs)) in body fluids. The integration of CRISPR-Cas systems with liquid biopsy may further enhance the accuracy of early CCA diagnostics, reduce the need for invasive procedures, and ultimately improve patient outcomes.

Methods. A comprehensive review of scientific literature published between 2015 and 2025 was conducted using major medical databases (PubMed, Web of Science, Google Scholar, and Embase). The following MeSH terms were used in various combinations: “cholangiocarcinoma,” “liquid biopsy,” “microRNA,” and “CRISPR-Cas.” Original research articles written in English were selected for analysis. Additionally, a theoretical diagnostic protocol utilizing Rolling Circle Amplification-assisted CRISPR-Cas9 cleavage (RACE) is proposed, focusing on miRNA-16 and miRNA-877 in plasma-derived exosomes to reliably differentiate dCCA from PDAC and benign biliary diseases.

Results. The literature analysis revealed that LB, particularly the detection of circulating miRNAs in body fluids (e.g., miR-21, miR-16, miR-877), demonstrates high diagnostic accuracy necessary for early CCA detection. When supplemented with innovative CRISPR-Cas technologies, such as the proposed RACE method, diagnostic accuracy could be further improved, facilitating earlier therapeutic decision-making. This is one of the key factors in improving unfavorable patient outcomes.

Conclusion. LB, in combination with CRISPR-Cas systems, could significantly contribute to more accurate CCA diagnosis in the future, reducing the need for invasive procedures and improving patient treatment outcomes. Nevertheless, these methods remain experimental and require thorough clinical validation and standardization before being widely implemented in routine clinical practice.

Keywords. Cholangiocarcinoma (CCA), Liquid biopsy (LB), CRISPR-Cas, microRNAs (miRNAs), early diagnostics, biomarkers, minimally invasive diagnostics.

4. ĮVADAS

Cholangiokarcinoma (CC) – tai heterogeniška piktybinių navikų grupė, išsivystanti iš tulžies latakų epitelinių ląstelių – cholangiocitų. Navikų heterogeniškumas, atsirandantis dėl įvairios anatomicinės lokalizacijos, klinikinių ypatumų ir molekulinės bei genetinės įvairovės, kelia specifinius diagnostinius iššūkius, lemiančius sudėtingą ankstyvos ligos diagnostiką.

Pagal anatominę lokalizaciją CC klasifikuojama į intrahepatinę (iCC), kuri susiformuoja kepenyse, bei ekstrahepatinę (eCC), kuri dar skirstoma į perihiliarinę (pCC) ir distalinę (dCC) potipius (1,2). Pastarasis kyla būtent iš distalinių ekstrahepatinių tulžies latakų, kurie lokalizuojasi greta kasos ir dvylikapirštės žarnos. Dėl šios priežasties liga kelia papildomų diagnostinių iššūkių tiek kliniškai, tiek atlikus vaizdinius tyrimus, itin primindama kasos latakų adenokarcinomą (angl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC), ar kitus gerybinius tulžies latakų susirgimus.

Pastaraisiais metais CC atvejų pasaulyje nuolat daugėja. Šiuo metu šis navikas sudaro mažiau nei 2 proc. visų piktybinių navikų, apie 3 proc. virškinamojo trakto piktybinių ligų ir 15 proc. visų pirminių kepenų navikų (2). Vakaruose metinis sergamumas siekia apie 2,1 atvejo 100 000 gyventojų, tuo tarpu Azijos šalyse, ypač Tailando šiaurės vakariniame regione, šis rodiklis yra ženkliai aukštesnis (85 atvejai 100 000 gyventojų) (3). Šiuos skirtumus lemia specifiniai regioniniai rizikos veiksniai, tokie kaip parazitinės infekcijos (pvz., *Opisthorchis viverrini*), taip pat genetinis polinkis (4,5). CC išsivystymą reikšmingai skatina lėtinis tulžies latakų uždegimas, cholestazė, kepenų cirozė, hepatito B ir C virusų infekcijos, cukrinis diabetas, nutukimas bei piktnaudžiavimas alkoholiu (2). Iš visų šių rizikos veiksnių reikšmingiausiais laikomi lėtinis uždegimas ir cholestazė, skatinantys ilgalaikį cholangiocitų kontaktą su uždegiminiais mediatoriais, pavyzdžiui, TNF- α , IL-6, Wnt ir COX-2. Dėl šio uždegiminio proceso palaipsniui kaupiasi genetinės mutacijos navikų slopinimo genuose, protoonkogenuose ir DNR neatitikčių taisymo (angl. *DNA mismatch repair*, MMR) genuose (3).

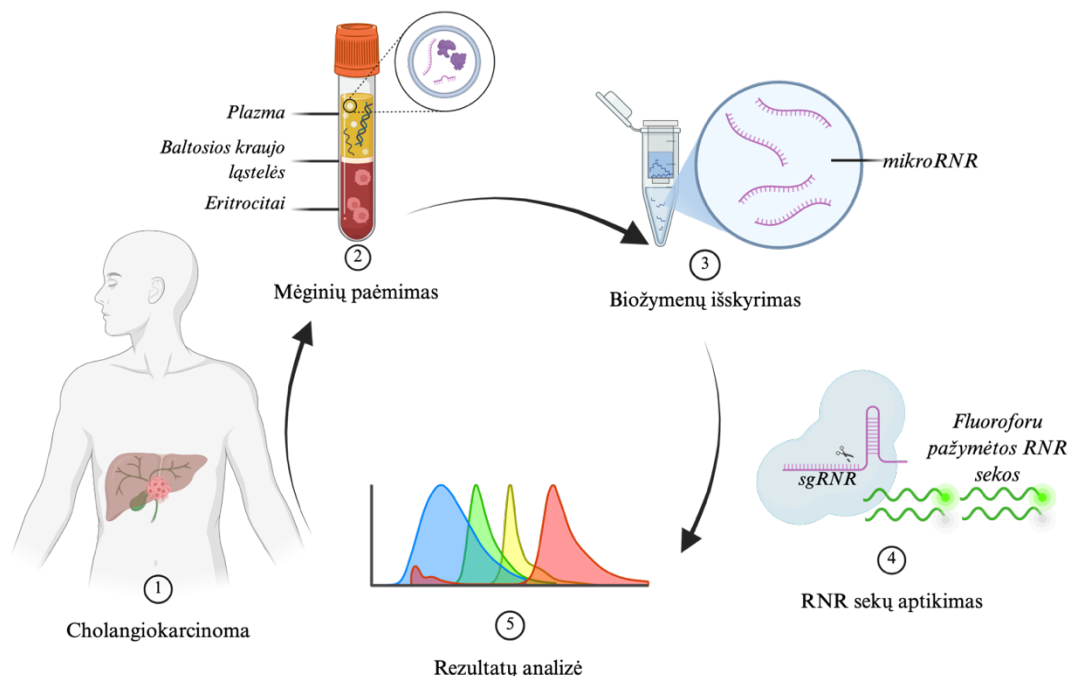
CC būdingas kliniškai nebylus ankstyvasis periodas, agresyvi eiga bei atsparumas chemoterapijai (6). Dėl šių savybių CC reikšmingai prisideda prie mirtingumo rodiklio - kasmet ji atsakinga už maždaug 2 proc. visų vėžio sukeltų mirčių pasaulyje (2). Net ir po radiklios chirurginės rezekcijos bendras 5 metų išgyvenamumas retai viršija 40 proc., o pacientams, kuriems chirurginis gydymas nėra įmanomas, šis rodiklis krenta žemiau 5 proc. (7).

Nors pastaraisiais metais vėžio diagnostikos metodų tikslumas sparčiai gerėja, dauguma CC atvejų vis dar diagnozuojami pavėluotai, kai chirurginis gydymas nebėra įmanomas. Prie diagnostinių iššūkių iš dalies prisideda tiek vėlyvas klinikinių simptomų pasireiškimas, apsunkinantis savalaikį ligos nustatymą, tiek tradicinių vaizdinių ir histologinių diagnostikos metodų ribotumas. CA19-9 yra dažniausiai CC diagnostikoje naudojamas serologinis biožymuo, kurio klinikinis pritaikomumas taip pat ribotas dėl gana menko specifškumo ir jautrumo, ypač uždegiminių ar cholestazinių būklių metu (8). Šiuo metu trūksta veiksmingų

diagnostinių biožymenų ankstyvajai CC diagnozei, o minimaliai invazinių diagnostikos metodų įdiegimui klinikinėje praktikoje reikalingi papildomi tyrimai. Dėl šios priežasties, itin svarbu kurti naujus, pažangius diagnostikos sprendimus, kurie leistų laiku nustatyti ligą ir tiksliau prognozuoti jos eigą (9).

Naujausiuose tyrimuose mikroRNR (miRNR) atsiskleidžia kaip daug žadantis diagnostinis biožymuo, pasižymintis stabilumu ir prieinamumu įvairiuose kūno skysčiuose (pvz. kraujo plazma, serumas, tulžis, ar šlapimas) (10). Šios mažos nekoduojančios RNR (ncRNR) reguliuoja genų raišką, o sergant CC pakeičia savo raišką, veikdamos kaip onkogenai arba naviką slopinantys veiksniai. miRNR turi keletą reikšmingų privalumų: jos gali būti lengvai išgaunamos iš biologinių mėginių, yra itin stabilios klinikinėse medžiagose, dėl apsauginių lipidinių barjerą turinčių ekstraląstelių pūslelių (EP) apsaugos ir pasižymi ligai būdingais raiškos modeliais, leidžiančiais atskirti CC nuo kitų gerybinių būklių.

Taikant SB technologijas kartu su naujos kartos molekulinės diagnostikos metodais, kaip CRISPR-Cas sistemos, kuriami itin jautrūs ir minimaliai invazyvūs diagnostiniai įrankiai. Šie pažangūs sprendimai gali reikšmingai prisidėti prie ankstyvos CC nustatymo bei pagerinti pacientų išgyvenamumo rodiklius.



1 pav. Klinikinės skystosios biopsijos ir CRISPR-Cas sistemų pritaikymas cholangiokarcinomos diagnostikoje. (1) Onkologinis procesas (pvz. Cholangiokarcinoma) išskiria į kraujotaką naviko genetinę medžiagą įvairiais pavidalais (pvz., miRNR, navikines

ląsteles ir kt.); (2) Iš paciento paimamas kraujo mėginys, kuriame aptinkamos laisvai cirkuliuojančios naviko sudedamosios dalys (miRNR, baltymai, egzomosos ir kt.); (3) Išskiriami biožymenys (pvz., miRNR), kurie bus naudojami tolimesnėms molekulinėms analizėms; (4) Specifinė RNR seka (sgRNR) nukreipia Cas baltymą, kuris sąveikauja su taikiniu – fluoroforu pažymėta miRNR seka; (5) Fluorescencinės kreivės rodo navikinių biožymenų aptikimo signalus – signalų intensyvumas priklauso nuo taikinio kiekio.

Darbo tikslas: detaliai išanalizuoti ir kritiškai įvertinti esamus cholangiokarcinomos diagnostinius iššūkius, apžvelgti mikroRNR bei CRISPR-Cas sistemų taikymo kartu galimybes, siekiant pagerinti ankstyvos diagnostikos tikslumą. Parengti distalinės cholangiokarcinomos, kasos latako adenokarcinomos ir gerybinių tulžies latako susirgimų diferencinės diagnostikos teorinio protokolo pavyzdį, kaip vieną iš galimų tolimesnių tyrimų krypčių.

Uždaviniai:

- 1) Apžvelgti cholangiokarcinomos anatominius, epidemiologinius ir molekulinis ypatumus, apsunkinančius ankstyvą diagnostiką;
- 2) Išanalizuoti CRISPR-Cas sistemų veikimo principus ir jų taikymo galimybes molekulinėje diagnostikoje;
- 3) Įvertinti skystosios biopsijos, daugiau dėmesio skiriant mikroRNR, diagnostinį pritaikomumą;
- 4) Parengti teorinį diagnostinį protokolą, kuris remtųsi skystosios biopsijos ir CRISPR-Cas9 technologijų deriniu, skirtą dCC, PDAC bei gerybinių tulžies latako ligų diferencinei diagnostikai.

5. TIRIAMIEJI IR METODAI

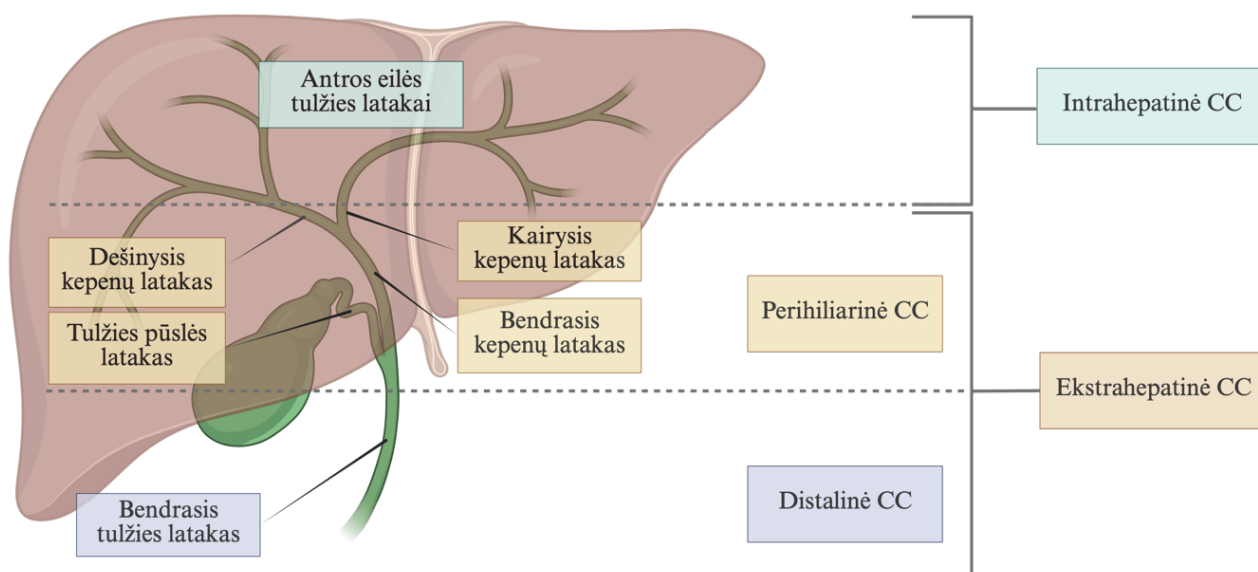
Šiame tyrime taikomas naratyvinės apžvalgos metodas, siekiant kritiškai įvertinti SB ir CRISPR-Cas sistemų derinio potencialų klinikinį pritaikomumą CC diagnostikoje. Taip pat pateikiamas teorinis dCC, PDAC bei gerybinių tulžies latako ligų diferencinės diagnostikos protokolas. Šiame protokole siūloma remtis žiedinės amplifikacijos (gausinimo) (angl. *Rolling Circle Amplification*, RCA) ir CRISPR-Cas9 sistema paremtu metodu (RACE, angl. *Rolling Circle Amplification-assisted CRISPR/Cas9 Cleavage*), kuriuo specifiskai kraujo plazmos kilmės egzomosose būtų aptinkami miRNR-16 ir miRNR-877.

Siekiant užtikrinti aktualią ir naujausią informaciją bei apimti reikšmingus šios srities pasiekimus, buvo įtraukti tik 2015–2025 m. publikuoti straipsniai. Literatūros analizė buvo atlikta naudojant pagrindines mokslines duomenų bazines, įskaitant *PubMed*, *Web of Science*, *Google Scholar* ir *Embase*. Paieškai naudoti šie MeSH terminai įvairiose kombinacijose: „*cholangiocarcinoma*“, „*liquid biopsy*“, „*microRNA*“, „*CRISPR-Cas*“. Analizei buvo atrinkti tik originalūs straipsniai, publikuoti anglų kalba. Papildoma kontekstinė literatūra gauta iš *PubMed*, *BioMed Central*, *Elsevier*, *Springer Nature*, *MDPI* ir *Journal of Hepatology* duomenų bazių. Visos apžvalgoje pateiktos iliustracijos sukurtos naudojant *BioRender.com* (Torontas, Kanada).

6. REZULTATAI

6.1. Cholangiokarcinoma

Cholangiokarcinoma (CC) – tai piktybinis navikas, kylantis iš intrahepatinių, ar ekstrahepatinių tulžies latakų epitelio. Ši liga reta - sudaro mažiau nei 2 proc. visų piktybinių navikų ir apie 3 proc. virškinamojo trakto piktybinių susirgimų. Vis dėlto tarp pirminių kepenų navikų CC yra antra pagal dažnumą po hepatoceliulinės karcinomos (HCC) ir yra atsakinga už 10-15 proc. visų pirminių kepenų navikų (2). Anatomiškai CC skirstoma į intrahepatinę (iCC) bei ekstrahepatinę (eCC), kuri apima perihiliarinę (pCC) ir distalinę (dCC) potipius. Dažniausia ligos forma laikoma pCC, nustatoma maždaug 60 proc. visų atvejų, tuo tarpu distalinės ir intrahepatinės lokalizacijos formos sudaro atitinkamai apie 20-30 proc. ir <10 proc. visų diagnozių (1). Riba skirianti iCC ir eCC, yra antros eilės tulžies latakai (už kairiojo ir dešiniojo tulžies latakų išsišakojimų), o riba skirianti pCC nuo dCC, yra tulžies pūslės latakų susiliejimo su bendruoju tulžies latakų sritis. Visiems potipiams būdingi skirtingi klinikiniai ir patologiniai požymiai, todėl jie turėtų būti nagrinėjami kaip atskiri nozologiniai vienetai (11).



2 pav. Anatomicinė cholangiokarcinomos klasifikacija pagal tulžies latakų medžio šakas.

6.1.1. Epidemiologija

CC paplitimas įvairiuose pasaulio regionuose labai priklauso nuo skirtingo rizikos veiksnių dažnio tose vietovėse. Itin didelis sergamumas fiksuojamas tokiose Pietryčių Azijos šalyse kaip Tailandas ir Laosas (85 atvejai per 100 000 gyventojų). Čia vienu pagrindinių rizikos faktorių laikomi kepenų trematodai - *Opisthorchiidae* šeimos parazitinės kirmėlės (pvz. *Opisthorchis viverrini* ar *Clonorchis sinensis*), kurios sukelia lėtinį uždegimą tulžies latakuose ir taip didina CC riziką (12). Tuo tarpu sergamumo rodikliai Vakarų šalyse daug mažesni (intervalas 0,5-3,4), o didžiausias rodiklis fiksuojamas Italijoje (3,4 atvejo 100 000 gyventojų) (13). Nepaisant to, pastaraisiais metais Vakarų šalyse stebimas augantis iCC atvejų skaičius, kuris, manoma, gali būti susijęs su lėtinėmis kepenų ligomis, metaboliniu sindromu ir gyvenimo būdo rizikos veiksniais (13). Didžiausias iCC atvejų augimas per pastarąjį dešimtmetį fiksuojamas būtent Baltijos šalyse, o Lietuvoje stebimi ypač dideli metiniai vidutiniai procentiniai pokyčiai: vyrams - 23,74 proc., moterims - 18,87 proc. (13). Dauguma CC atvejų diagnozuojami vėlyvose stadijose, ir tik apie 30 % susirgimų yra pagydomi diagnozės nustatymo metu. Dėl šių priežasčių pacientų prognozė yra prasta – penkerių metų išgyvenamumas siekia vos 7-20 proc. (2).

6.1.2. Patogenezė ir rizikos veiksniai

CC vystymasis yra nulemtas daugelio veiksnių, tarp kurių svarbūs aplinkos, molekuliniai ir genetiniai mechanizmai. Vakarų šalyse vienu reikšmingiausių patogenezės elementų laikomas lėtinis tulžies latakų uždegimas (3). Sergant pirminiu sklerozuojančiu cholangitu, uždegiminiai procesai sukelia pasikartojančius pažeidimų ir regeneracijos ciklus, kurie ilgainiui gali skatinti piktybinę ląstelių transformaciją. Tarp pagrindinių CC rizikos veiksnių įvardijamos ir Karoli liga, tulžies latakų cistos, kurios glaudžiai susijusios su visais trimis CC potipiais. Tuo tarpu kepenų cirozė, nealkoholinė suriebėjusių kepenų liga (NSKL) bei hepatito B viruso infekcija dažniau nustatomi iCC atvejais. Choledocholitiazė (tulžies latakų akmenligė) siejama išskirtinai su pCC ir dCC formomis. Manoma, jog pasaulinės nutukimo ir NSKL augimo tendencijos gali būti vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių iCC atvejų augimą (3,12).

Pietryčių Azijos regionams būdingų kepeninių siurbikių sukeliamos parazitinės infekcijos taip pat laikomos reikšmingu karcinogenezę skatinančiu veiksniu. Mechaninis poveikis tulžies latakams, toksinių metabolitų išskyrimas bei granulomatozinis uždegimas aplink audiniuose įstrigusius kiaušinėlius skatina fibrozę ir lėtinį uždegimą. Šie procesai lemia DNR pažeidimus ir ilgainiui gali prisidėti prie piktybinio naviko išsivystymo (3).

Molekuliniu lygmeniu CC progresija susijusi su mutacijomis pagrindiniuose reguliaciniuose genuose, tokiuose kaip KRAS, TP53, IDH1/2, bei su specifiniais genų susiliejimais - pavyzdžiui, FGFR2. Šie genetiniai pakitimai pažeidžia fiziologinius ląstelių proliferacijos ir apoptozės kontrolės mechanizmus, sudarydami sąlygas navikui formotis (3). Įdomu tai, kad genetinių pokyčių pobūdis priklauso nuo naviko lokalizacijos ir kilmės. IDH1/2 mutacijos bei FGFR2 susiliejimai dažniau nustatomi iCC Vakarų šalių pacientams, o TP53, KRAS mutacijos ir su jomis susiję signaliniai keliai (pvz., SMAD4) dažnesni pCC bei su parazitinėmis infekcijomis susijusiuose navikuose (14).

Be genetinių aspektų, CC vystymuisi didelę įtaką daro ir naviko mikroaplinka. Pastarajai būdinga tanki desmoplastinė stroma, aktyvuoti fibroblastai bei imuninę sistemą slopinančios ląstelės – pavyzdžiui, su naviku susiję makrofagai. Šie komponentai ne tik skatina naviko augimą, bet ir didina atsparumą taikomam gydymui (14).

6.1.3. Klinika ir diagnostika

Dėl klinikinių simptomų stokos ankstyvose stadijose, CC dažniausiai nustatoma tik pažengusios ligos metu, kai radikalus gydymas jau nebėra įmanomas. Klinikinė ligos išraiška

priklauso nuo naviko anatomicinės lokalizacijos: eCC sukelia beskausmę geltą dėl tulžies latako obstrukcijos bei kitus mechaninei obstrukcijai būdingus požymius – balkšvas išmatas, niežulį bei tamsų šlapimą. iCC pasireiškia kaip kepenų darinys, dažnai sukeliantis skausmą po dešiniu šonkaulių lanku. Abiem CC tipam būdingi ir kiti nespecifiniai simptomai, kaip bendras silpnumas, diskomfortas pilve, anoreksija, pykinimas bei svorio kritimas (4).

Dėl nespecifinių simptomų pasireiškimo, CC dažniausiai nustatoma atsitiktinio ultragarsinio patikrinimo (UG) metu. Diagnozės patikslinimui atliekami kompiuterinės tomografijos (KT), magnetinio rezonanso tomografijos (MRT), magnetinio rezonanso cholangiopankreatografijos (MRCP) bei endoskopinės retrogradinės cholangiopankreatografijos (ERCP) tyrimai (15).

Diagnostiniais tikslais taip pat dažnai pasitelkiami ir serumo naviko biožymenys, tarp kurių klinikinėje praktikoje plačiausiai naudojamas karbohidratinis antigenas 19-9 (CA 19-9). Vis dėlto, visavertį šio biožymens pritaikomumą riboja keli reikšmingi trūkumai. Dėl ne itin aukšto jautrumo ir specifiškumo pacientams gali būti nustatomos klaidingai teigiamos arba klaidingai neigiamos tyrimų reikšmės. Jautrumo trūkumas tampa ypač aktualūs ankstyvose ligos stadijose, kai biožymens koncentracija kraujyje gali būti per maža dėl nedidelio naviko tūrio. Taip, pat padidėję CA 19-9 kiekiai nėra specifiški tik CC ir gali būti aptinkami ir kitų piktybinių, ar gerybinių susirgimų metu (8). Svarbu paminėti, jog apie 5–7 proc. populiacijos turi Lewis (a-b-) kraujo grupę ir negali ekspresuoti CA19-9, taigi jiems niekada nenustatomas šio biožymens aktyvumo padidėjimas (16).

Nors histologiniai skirtumai gali daryti įtaką biožymenų lygiui, jie neleidžia aiškiai diferencijuoti CC potipių. Dėl šių priežasčių audinių mėginių biopsija ir histopatologinis ištyrimas išlieka diagnostikos „aukso standartu“ (7). Vis dėlto, navikinio audinio paėmimas dažniausiai reikalauja invazinių procedūrų, kurios, dėl silpnos pacientų būklės, gali būti rizikingos - padidėja kraujavimo ir navikinių ląstelių išsėjimo į pilvaplėvę rizika (17). Taip pat ne visada užtikrinamas pakankamas paimamo mėginio kiekis analizei, o dėl anatomicškai sunkiai pasiekiamos lokalizacijos, procedūros įgyvendinimo sėkmė nėra garantuota (6).

Diagnozuojant CC mažiau nei trečdaliui pacientų liga aptinkama ankstyvoje stadijoje, kai naviko židinybūna izoliuotas ir iki 3 cm dydžio. Beveik pusei pacientų diagnozės metu jau nustatomas naviko išplitimas į regioninius limfmazgius, o ketvirtadaliui – išplitusios tolimosios metastazės (18). Radikali chirurginė rezekcija, kuri laikoma efektyviausiu gydymo metodu, galima tik tuo atveju, kai navikas nėra išplitęs į kepenų audinius, didžiąsias kraujagysles, sritinius limfmazgius ar kitus organus. Dėl šios priežasties net iki 30 % pacientų, kuriems diagnozuota pažengusi CC, nėra tinkami chirurginiam gydymui ir jiems kaip pirmos

eilės gydymo metodas rekomenduojama sisteminė chemoterapija, dažniausiai gemcitabino ir cisplatinos derinys (19).

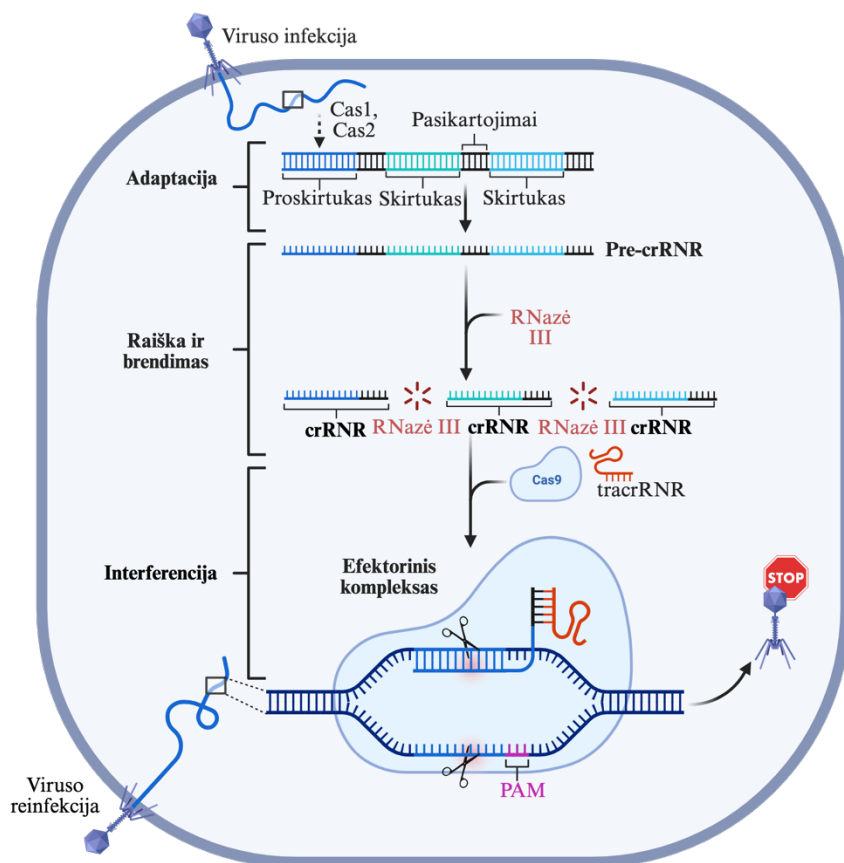
Visa tai pabrėžia skubų poreikį kurti inovatyvias, mažiau invazines diagnostines strategijas, kurios leistų anksti aptikti ligą ir pagerintų pacientų prognozę. SB metodai, derinami kartu su CRISPR-Cas sistemomis, gali ženkliai prisidėti prie ankstyvesnės CC diagnostikos ir individualizuoto gydymo strategijų kūrimo.

6.2. CRISPR-Cas sistemų veikimo mechanizmas ir klasifikacija

CRISPR (taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę palindrominiai pasikartojimai, angl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas (su CRISPR asocijuoti baltymai, angl. *CRISPR-associated proteins*) yra natūraliai prokariotuose (bakterijose ir archėjose) aptinkama adaptacinė imuninė sistema, apsauganti nuo bakteriofagų ir plazmidžių genetinės medžiagos patekimo į ląstelę (20). CRISPR sudarytas iš pasikartojančių sekų ir tarp jų įsiterpusių svetimos kilmės unikalių sekų (proskirtukų). Jos įrašomos į ląstelės genomą infekcijos metu ir veikia kaip „molekulinė atmintis“. Vėliau, pasikartojus infekcijai, Cas baltymai atpažįsta šias anksčiau užkoduotas sekas ir sukarpo skirtukui komplementarią seką turinčias nukleorūgštis, taip neutralizuodamas infekcijos židinį. Pagrindiniai šio imuninio proceso etapai – adaptacija, raiška ir brendimas bei interferencija (21).

Pirmojo, adaptacijos, etapo metu, fagui arba plazmidei patekus į bakterijos ląstelę, Cas1 ir Cas2 baltymai atlieka pagrindinį vaidmenį. Svetimoje genetinėje medžiagoje atpažinę proskirtukui artimą motyvą (angl. *protospacer adjacent motif*, PAM) - trumpą, 2 - 5 bazių ilgio seką, leidžiančią atskirti svetimą genetinę medžiagą nuo savosios, jie iškerpa trumpus virusinės DNR fragmentus - proskirtukus ir naujų skirtukų pavidalu įterpia į bakterijos genomą CRISPR srityje. Antrame etape - raiškos ir brendimo - CRISPR regionas yra nurašomas į ilgą pirminę CRISPR RNR (pre-crRNR), kuri vėliau fermentiškai suskaidoma į trumpesnes, vieno skirtuko seką turinčias RNR grandines – crRNR (22). Galiausiai, interferencijos fazėje, subrendusios crRNR molekulės susijungusios su Cas baltymais ir transaktyvuojančiąja CRISPR RNR (tracrRNR), sudaro efektorinį kompleksą. Jis atpažįsta ir sunaikina svetimą į ląstelę patekusią nukleogrūgštį, jei pastaroji turi komplementarią crRNR seką (23).

Pritaikius šį natūralų mechanizmą biotechnologijoje, buvo sukurti itin tikslūs ir efektyvūs genomo redagavimo įrankiai, iš esmės pakeitę molekulinės biologijos ir medicinos tyrimų kryptis. CRISPR-Cas sistemos šiuo metu plačiai naudojamos funkcinės genomikos, transgeninių organizmų kūrimo, genų terapijos ir molekulinės diagnostikos srityse (24,25).



3 pav. CRISPR-Cas sistemos veikimo mechanizmas. Viruso infekcijos metu į ląstelę patekęs svetimos DNR fragmentas (proskirtukas) adaptacijos fazėje yra atpažįstamas Cas1 ir Cas2 baltymų ir integruojamas į CRISPR lokusą tarp pasikartojančių sekų kaip naujas skirtukas. Raiškos ir brendimo metu visas CRISPR regionas transkribuojamas į pre-crRNA, kuri vėliau, RNazės III fermento pagalba, apdorojama į brandžias crRNA molekules. crRNA susijungia su tracrRNA ir Cas9 baltymu – taip susidaro efektorinis kompleksas. Interferencijos fazėje šis kompleksas atpažįsta svetimą nukleorūgštį pagal crRNA esančią skirtuko seką ir specifiskai ją sukarpo šalia PAM motyvo esančioje srityje, taip sustabdydamas viruso replikaciją.

Pagal interferenciją vykdančio komplekso sandarą CRISPR-Cas sistemos skirstomos į dvi pagrindines klases (26). Pirma klasė sudaro apie 90 proc. visų žinomų CRISPR-Cas sistemų ir pasižymi sudėtingais interferenciją atliekančiais kompleksais, sudarytais iš kelių skirtingų baltymų (27). Antra klasė, sudaranti likusius 10 proc., yra labiau mėgstama dėl paprastesnio manipuliavimo, nes funkcijas atlieka vienas efektorinis baltymas. Ši klasė apima tris tipus – II su Cas9 baltymu, V su Cas12 ir VI su Cas13. Visi jie pasižymi skirtingomis savybėmis ir veikimo mechanizmais (28).

Cas9 - pirmoji genomo redagavimui panaudota endonukleazė buvo išgauta iš *Streptococcus pyogenes* bakterijų (*SpyCas9*) (29). II tipui priklausanti CRISPR-Cas9, dėl paprastesnės sandaros ir lengvesnio manipuliavimo, yra viena plačiausiai tyrinėjamų sistemų, kurios pagrindinė funkcija – dvigrandės DNR perkirpimas (29). Komplexas sudarytas iš crRNR ir tracrRNR - sgRNR (angl. *single guide RNA*) - Cas9 baltymą nukreipia į taikininę DNR seką. Vis dėlto, kad tai įvyktų, taikininė seka turi būti arti specifinio 5' NGG 3' (N žymi bet kokį nukleotidą) PAM motyvo (30) ir tik tada sukeliamas dvigrandės DNR trūkis, po kurio aktyvuojasi ląstelės DNR pažeidimų taisymo mechanizmai. Pastarieji gali vykti dviem keliais: homologinės reparacijos (HR) arba nehomologinių galų sujungimo (angl. *non homologous end joining*, NHEJ) (31). Vis dėlto, CRISPR-Cas9 sistema turi ir tam tikrų trūkumų - dėl PAM sekos reikalavimų ne visose genomo vietose galimas sekų karpymas, taip pat galimi nepageidaujami ne taikinių DNR sekų trūkiai (angl. *off-target effects*) lemiantys prastesnį efektyvumą bei specifiškumą (32,33).

V tipo CRISPR sistemos, kurias dažniausiai atsovauja Cas12a (anksčiau vadinta Cpf1), taip pat taikosi į DNR, tačiau skirtingai nuo Cas9 atpažįsta 5'-TTTV-3' PAM motyvą ir nenaudoja tracrRNA. Kitaip nei Cas9, kuris suformuoja bukus (angl. *blunt*) DNR galus, Cas12a suformuoja persidengiančius (angl. *staggered*) galus 5' pusėje. Tai gali būti pranašumas kuriant genomo redagavimo sistemas, kuriose reikalingas tikslus DNR sekų įterpimas tam tikra kryptimi (34). 2018 m. Chen ir kt. nustatė, kad Cas12a pasižymi ir netiesioginio (trans) karpymo (angl. *trans-cleavage*) aktyvumu, kurio dėka įmanomas viengrandės DNR skaidymas (35). Ši savybė leido pritaikyti Cas12a virusinės DNR aptikimui pacientų mėginiuose ir išplėsti jo panaudojimą įvairių ligų diagnostikoje (36,37).

Tam pačiam, V tipui priskirami Cas12f (anksčiau vadinta Cas14) baltymai pasižymi itin mažu dydžiu ir gebėjimu taikytis į viengrandę DNR be būtinybės turėti PAM seką (38). Dėl didelio specifiškumo ir jautrumo Cas12f yra tinkami smulkių ir fragmentuotų DNR mėginių aptikimui, o mažas dydis palengvina jo pritaikomumą įvairiose diagnostinėse platformose (39).

VI tipo CRISPR sistemos, kurias reprezentuoja Cas13, išskirtinai taikosi į viengrandę RNR. Vedamas crRNR, Cas13a prisijungia prie taikininės RNR, aktyvuojama RNazė ir įvyksta nespecifinis greta esančių RNR molekulių trūkis (40). Toks Cas13a gebėjimas be atvirkštinės transkripcijos tiesiogiai aptikti RNR yra ypač vertingas siekiant greitai ir tiksliai nustatyti RNR virusus (pvz. SARS-CoV-2) (41,42), taip pat onkologinių ir kitų ligų diagnostikoje svarbias RNR molekules, kaip mikroRNR (miRNR). (43–45).

1 lentelė. Skirtingų CRISPR-Cas sistemų charakteristikos.

CRISPR-Cas sistema	Taikininė molekulė	PAM/PFS seka	Netiesioginis (trans) karpymas
<i>SpyCas9</i>	Dvigrandė DNR	3' NGG	Ne
<i>AsCas12a</i>	Dvigrandė DNR ir viengrandė DNR	5' TTTV	Taip
Cas12f	Dvigrandė DNR ir viengrandė DNR	Skiriasi priklausomai nuo potipio	Taip
Cas13d	Viengrandė RNR	Ne-G tipo PFS	Taip

PFS, angl. Protospacer flanking site.

6.3. Skystosios biopsijos biožymenys ankstyvai cholangiokarcinomos diagnostikai

Skystoji biopsija (SB) – tai minimaliai invazinis mėginių ėmimo metodas, kuriuo siekiama aptikti molekulinis pakitimus, navikines ląsteles ir metabolitus kraujyje ar kituose organizmo skysčiuose. Siekdami įveikti kylančius diagnostinius iššūkius, tyrėjai vis labiau orientuojasi į naujus SB biožymenis, kurie galėtų pagerinti CC diagnostikos tikslumą ir sumažintų invazinių procedūrų poreikį. Dažniausiai šiais metodais tiriami įvairūs baltymai, cirkuliuojanti navikinė DNR ir RNR, taip pat iš naviko atsiskyrusios vėžinės ląstelės, ar ekstraląstelinės pūslelės (EP) (46,47), o analizei pasitelkiami kraujo serumo, plazmos, šlapimo ar tulžies mėginiai (48,49).

Vienas iš pagrindinių SB privalumų - galimybė realiu laiku stebėti onkologinio proceso virsmą paciento organizme, pradedant nuo ankstyvos diagnostikos iki minimalios likutinės ligos nustatymo (47,50). Be to, SB pašalina invazinių procedūrų keliamą riziką (nėra kraujavimo, infekcijos ar naviko išplitimo pavojaus), yra greitai atliekama ir suteikia tikslią informaciją apie naviko genomiką, proteomiką ir metabolomiką (51). Ji taip pat padeda įvertinti naviko heterogeniškumą, leidžia identifikuoti biologinius mechanizmus taikinių terapijai, stebi atsaką į gydymą bei atsparumo chemoterapijai vystymąsi (6).

SB biožymenys tampa itin vertingais įrankiais siekiant pagerinti ankstyvą CC diagnostiką ir sekimą. Tarp jų reikšmingą vietą SB užima keli svarbūs komponentai (51).

6.3.1. Cirkuliuojančios navikinės ląstelės

Cirkuliuojančios navikinės ląstelės (angl. *circulating tumour cells*, CTC) yra iš pirminio naviko ar, rečiau, metastazinių židinių atsiskyrusios ląstelės, patenkančios į kraujotaką ir galinčios inicijuoti tolimųjų organų metastazes. Paprastai jos kraujyje išgyvena apie 1-2,5 valandos, kol yra sunaikinamos imuninės sistemos (52). Dėl šios priežasties tai yra itin vertingas biožymuo ankstyvai vėžio diagnostikai ir realaus laiko stebėsenai, vertinant naviko augimą, gydymo efektyvumą ir paciento prognozę (53,54). Vis dėlto, itin maža koncentracija kraujyje (nuo 1 iki 100 ląstelių 1 ml) apsunkina CTC aptikimą ir analizę. Siekiant geresnio tyrimo tikslumo, reikalingi papildomi filtracijos, centrifugavimo ar mikrofluidinių technologijų sprendimai (55,56). Nepaisant šių technologijų pažangos, procesas išlieka sudėtingas ir brangus, o tai riboja jo klinikinį pritaikomumą (52).

6.3.2. Cirkuliuojanti navikinė DNR

Laisvai cirkuliuojanti DNR (angl. *cell-free DNA*, cfDNA) - tai į kraujotaką patenkantys trumpi DNR fragmentai, kurių ilgis dažniausiai svyruoja nuo 140 iki 170 bazių porų. Jie atsiranda ląstelių apoptozės arba nekrozės metu ir gali būti kilę tiek iš sveikų, tiek vėžinių ląstelių (57). Cirkuliuojanti navikinė DNR (*circulating tumor DNA*, ctDNA) yra specifinis cfDNR pogrupis, kilęs būtent iš navikinių ląstelių, ir pasižymi būdingomis mutacijomis bei epigenetiniais pokyčiais, kaip specifiniai metilinimo modeliai (58). Dėl šių savybių ctDNR analizė tapo svarbiu diagnostikos įrankiu, leidžiančiu stebėti naviko genetinę dinamiką realiu laiku, vertinti gydymo efektyvumą ir aptikti atsparumo mechanizmus. Vis tik, dėl itin mažos koncentracijos kraujyje, jos aptikimui būtini taip pat labai jautrūs metodai, kaip naujos kartos sekoskaita (NKS) arba skaitmeninė polimerazinė grandininė reakcija (PGR).

6.3.3. MikroRNR

Pastraruojamu metu ypač reikšmingu tyrimų objektu tapo nekoduojančios RNR (angl. non-coding RNA, ncRNA), pasižyminčios didele diagnostine ir prognostine verte CC atvejais (59). Šios RNR molekulės yra transkribuojamos, tačiau nepaverčiamos baltymais, o jų funkcinės savybės priklauso nuo ilgio ir struktūros. Pagal šiuos kriterijus jos skirstomos į dvi pagrindines klases: mažas (18-200 nukleotidų (nt)) ir ilgas (>200 nt) ncRNR (60). Mažųjų ncRNR grupėje ypač tyrėjų dėmesį traukia miRNR - trumpi, 18-24 nt ilgio ncRNR fragmentai, reguliuojantys genų raišką posttranskripciniu lygmeniu. Šios molekulės yra stabiliai

aptinkamos biologiniuose skysčiuose, nes dažnai būna inkapsuliuotos EP arba kompleksuose su apsauginiais baltymais, kaip Argonautu-2 (Ago2), dėl ko užtikrinama jų apsauga nuo RNazių suardymo (61). Tulžies latakų karcinogenezėje miRNR atlieka svarbų vaidmenį, veikdamos kaip onkogenai (pvz., miRNR-21) arba naviko supresoriai (pvz., miRNR-150), o jų raiškos pokyčiai koreliuoja su ligos progresavimu, naviko dydžiu ir paciento prognoze (62,63). Be to, manoma, kad skirtingi vėžio tipai pasižymi unikaliu miRNR profiliu, kurį galima išnaudoti ankstyvai diagnostikai, ligos progresavimo stebėsenai ar gydymo atsako vertinimui. Dėl šių savybių miRNR išsiskiria kaip perspektyvūs SB biožymenys, galintys pagerinti CC diagnostiką, prognozę ir gydymo stebėseną (61).

6.3.3.1. MiRNR profilių identifikavimas

Atsižvelgiant į augantį miRNR diagnostinį potencialą, daugybė pastaraisiais metais atliktų tyrimų siekė identifikuoti specifines miRNR, kurios galėtų pasitarnauti ankstyvai CC diagnostikai. Vis dažniau atliekami ne tik pavienių miRNR analizės tyrimai, bet ir kuriami daugiakomponentiniai (angl. *multiplex*) diagnostiniai modeliai, apjungiantys kelių biožymenų panaudojimą siekiant didesnio jautrumo, specifiškumo ir klinikinio patikimumo. Meta-analizė, apimanti aštuonis nepriklausomus miRNR duomenų rinkinius, nustatė 70 miRNR, kurių raiška buvo padidėjusi, ir 48 miRNR, kurių raiška buvo sumažėjusi CC audiniuose, lyginant su normaliu tulžies latakų epitelium (64). Atlikta funkcinė analizė parodė, kad šios skirtinga raiška pasižymintys miRNR dalyvauja svarbiose vėžio patogenezės signalinėse grandinėse, tokiose kaip PI3K/Akt, MAPK ir Ras keliai, kurie reguliuoja ląstelių proliferaciją, išgyvenamumą ir metastazavimą (64).

6.3.3.2. MikroRNR audiniuose ir plazmos mėginiuose

Dauguma miRNR tyrimų anksčiau buvo atliekami navikiniuose audiniuose, kurie leidžia tiesiogiai vertinti naviko biologiją ir progresavimo žymenis. Pavyzdžiui, miRNR-21 - viena labiausiai ištirtų onkogeninių miRNR - pasižymi aukštu jautrumu ir specifiškumu, leidžiančiu atskirti CC nuo normalių audinių (95 proc. jautrumas ir 100 proc. specifiškumas) ir yra susijusi su blogesne bendra išgyvenamumo prognoze (HR = 1.88, 95 proc., PI 1.41–2.51) (65). CC audiniuose šis biožymuo identifikuotas kaip stiprus ligos progresavimo rodiklis, glaudžiai susijęs su naviko agresyvumu ir blogesne paciento prognoze (66).

Vis dėlto, mažiau invazinė prieiga leidžia stebėti ligą realiuoju laiku, įvertinti jos dinamiką bei pagerinti ankstyvosios diagnostikos galimybes, todėl analizėms vis dažniau

pasirenkami SB komponentai. Tyrimo, kuriame dalyvavo 1001 asmuo (359 pacientai, sergantys iCC, ir 642 kontroliniai asmenys), rezultatai parodė, kad plazmos mėginiuose miRNR-21 ir miRNR-122 koncentracijos iCC pacientams buvo statistiškai reikšmingai didesnės nei kontrolinėje grupėje, kurią sudarė sveiki asmenys, pacientai, sergantys gerybinėmis kepenų ligomis, ir asmenys, turintys kitų piktybinių kepenų navikų (67). Taip pat nustatyta, kad padidėjusi miRNR-21 koncentracija plazmoje buvo statistiškai reikšmingai susijusi su didesniu naviko dydžiu ($p = 0,030$), o pacientams, kurių navikai buvo didesni nei 5 cm, miRNR-21 lygis buvo dar aukštesnis ($p = 0,009$). Tai rodo, kad miR-21 gali būti ne tik diagnostinis, bet ir prognostinis žymuo, atspindintis naviko biologinį elgesį ir klinikinę eigą. Tyrimo metu buvo sukurtas trijų biožymenų diagnostinis modelis, apjungiantis miRNR-21, miRNR-122 ir tradicinį CA19-9. Šis modelis pasiekė aukštą diagnostinį tikslumą, atskiriant iCC nuo kontrolinės grupės - AUC (angl. *area under the curve*) siekė 0,853 mokymo kohortoje ir 0,866 validacijos kohortoje. Modelis taip pat buvo efektyvus diagnozuojant ankstyvasias iCC stadijas (0-I stadijos) bei CA19-9 neigiamus atvejus, kur AUC atitinkamai siekė 0,848 ir 0,795. Tuo tarpu Jiang ir kolegų (2020) atliktas tyrimas pateikė įžvalgų apie CC atvejus, susijusius su hepatolitiaze - būkle, kuri dažnai apsunkina CC diagnostiką dėl lėtinio uždegimo fono. Šiame tyrime analizuojant miRNR-21 ir miRNR-221 raiškos pokyčius kartu su ultragarsinio tyrimo rezultatais, buvo pasiektas itin aukštas diagnostinis tikslumas (AUC - 0,911, jautrumas - 77,42 proc., specifiškumas - 97,50 proc.) (68).

Atsižvelgiant į tai, kad CC diagnostika dažnai komplikuojama uždegiminių ar struktūrinių pokyčių, kurie būdingi pirminiam sklerozuojančiam cholangitui (PSC) ar kitoms gerybinėms patologijoms, miRNR gali būti ypač vertingi sprendžiant netipinius klinikinius atvejus. MiRNR derinimas su tradiciniais laboratoriniais biožymenimis ar vaizdiniais tyrimais leidžia sukurti kompleksiškesnius ir tikslesnius diagnostinius metodus, reikšmingai prisidedančius prie ankstyvos CC nustatymo. Vis dėlto būtina atkreipti dėmesį, jog pakitusi miRNR-21 raiška stebima ir kitų onkologinių ligų atvejais, todėl šio biožymens specifiškumas iCC atžvilgiu gali būti ribotas.

SB diagnostinį potencialą rodo ir Meijer bei bendraautorių (2019) tyrimas, kuriame daugiau nei 100 pacientų plazmos mėginiuose buvo analizuojama miRNR-16 ir miRNR-877 raiška. Nustatyta, kad miRNR-16 koncentracija dCC sergančiųjų grupėje buvo reikšmingai sumažėjusi, o miRNR-877 - padidėjusi, palyginti su PDAC ir gerybinių ligų grupėmis (69). Lyginant dCC ir gerybinių ligų atvejus, šių dviejų miRNR derinys pasižymėjo aukštu diagnostiniu tikslumu - AUC siekė 0,90, jautrumas - 79 proc., o specifiškumas - 90 proc. Taip

pat šis miRNR profilis buvo veiksmingas diferencijuojant dCC nuo PDAC - AUC reikšmė siekė 0,88.

Azijos šalyse, kur CC riziką didina *Opisthorchis viverrini* ir kitų parazitinių kirmėlių infekcijos, buvo identifiukuoti kiti reikšmingi biožymenys - miRNR-423-5p, miRNR-93-5p ir ypač miRNR-4532. Pastarasis pasiekė net 0,8983 AUC reikšmę, demonstruodamas aukštą diagnostinį patikimumą ir galimą regioninį specifiškumą (70).

6.3.3.3. *MikroRNR serume*

Dėl mažesnės ląstelinės kontaminacijos ir krešėjimo faktorių nebuvimo plazma dažnai laikoma pirmo pasirinkimo mėginiu miRNR analizei atlikti. Dėl krešėjimo metu vykstančios ląstelių lizės, serume dažnai pastebimas didesnis miRNR kiekio kintamumas, kuris gali veikti rezultatų patikimumą (71). Nepaisant to, dėl paprastesnio apdorojimo ir didesnio stabilumo mėginių saugojimo metu, serumas tebėra plačiai naudojamas klinikinėje praktikoje, o gauti miRNR profiliai praturtina diagnostinę ir prognostinę analizę papildomais aspektais.

Salem ir kolegų (2020) atliktame tyrime nustatyta, kad CC pacientų serume reikšmingai sumažėja miRNR-150 lygis ir tai leidžia pasiekti aukštą diagnostinį jautrumą (91,43 proc.) ir specifiškumą (80 proc.). Vis dėlto, dar didesnę diagnostinį tikslumą pasiekė miRNR kombinacija su CA19-9 - jautrumas pakilo iki 93,33 proc., o specifiškumas net iki 96,88 proc. (72).

Tarp kitų perspektyvių kandidatų išsiskiria miRNR-26a, kurio koncentracija serume yra statistiškai reikšmingai padidėjusi CC pacientams lyginant su sveikais asmenimis ($P < 0.01$) (73). Šio biožymens raiškos padidėjimas siejamas su pažengusia ligos stadija, metastazėmis bei trumpesne bendra išgyvenamumo trukme, todėl miRNR-26a vertinamas ir kaip nepriklausomas prognostinis žymuo. Vis dėlto, kito tyrimo duomenys pateikė priešingą tendenciją - serumo miRNR-26a lygis buvo sumažėjęs, lyginant su pacientais sergančiais PSC, o diagnostinis tikslumas, vertinant pagal AUC, siekė 0,780 (74). Šis rezultatų neatitikimas gali būti susijęs su skirtingais kontrolinių grupių pasirinkimais arba ligos biologiniu heterogeniškumu. Ypač svarbu tai, kad PSC laikomas CC rizikos veiksniu ir dažnai pasižymi uždegiminių procesų dominavimu, kurie gali lemti pakitusią miRNR raišką.

Reikšmingai padidėjusi miR-122, miR-192, miR-29b ir miR-155 koncentracija taip pat buvo nustatyta pacientų, sergančių CC, serume (75). Tyrimas parodė, kad šių miRNR raiškos lygiai buvo statistiškai reikšmingai didesni CC grupėje, lyginant tiek su sveikais kontroliniais asmenimis, tiek su pacientais, sergančiais nepiktybinėmis tulžies latakų ligomis, kaip PSC. Tai

rodo šių miRNR diagnostinį potencialą kaip papildomų biožymenų, galinčių prisidėti prie tikslesnės diferencinės diagnostikos tarp piktybinių ir neoplazinių būklių.

Išskirtinis ir kitas tyrimas, analizuojantss miRNR-18a ir miRNR-532 koncentracijas pacientų, sergančių eCC, serume (76). Rezultatai parodė, kad nors šių biožymenų individualus diagnostinis efektyvumas buvo vidutinis, jų padidėjusi raiška buvo reikšmingai susijusi su operabilumu - pacientams, kuriems šių miRNR lygis buvo aukštesnis, dažniau būdavo galima atlikti naviko rezekciją. Tai leidžia manyti, kad šie biožymenys gali būti vertingi ne tik diagnozuojant ligą, bet ir planuojant gydymo strategiją, ypač operacijos tinkamumo įvertinimui.

6.3.3.4. MikroRNR tulžies mėginiuose

Be serumo ir plazmos, nemažai dėmesio skiriama ir tulžies mėginių analizei diagnostiniais tikslais, dėl itin glaudaus kontakto su naviko mikroaplinka. Neseniai atliktame retrospektyviniame tyrime nustatyta, kad miRNR-1275 ir miRNR-6891-5p koncentracijos tulžyje buvo reikšmingai padidėjusios pacientams, sergantiems PDAC ir tulžies latakų vėžiu, lyginant su gerybinėmis būklėmis (77). Kitame tyrime išryškinta miRNR-340 ir miRNR-182 diagnostinė reikšmė – šie biožymenys pasirodė naudingi diferencijuojant piktybinius ir gerybinius pankreatobiliarinės sistemos susirgimus. Jų diagnostinis tikslumas, vertinant pagal AUC, siekė atitinkamai 0,79 ir 0,772 (78). Svarbią diagnostinę reikšmę parodė ir miRNR-125b-5p bei miRNR-194-5p derinys, kuris buvo efektyvus diferencijuojant PDAC ir CC pasiekdamas 0,815 AUC vertę (79). Šie rezultatai rodo, kad tulžies mėginių miRNR analizė gali būti itin naudinga specifinėse klinikinėse situacijose, ypač kai kiti diagnostiniai metodai (pvz., vaizdiniai tyrimai) nesuteikia pakankamai informacijos aiškiai diferencinei diagnostikai tarp panašių virškinamojo trakto navikų, o dėl tolimesnio klinikinio ištyrimo yra reikalinga invazinė tulžies mėginio paėmimo procedūra, (pvz., ERCP).

6.3.3.5. MikroRNR paremta cholangiokarcinomos diagnostika: iššūkiai ir ateities perspektyvos

Nepaisant reikšmingos pastarųjų metų pažangos, miRNR klinikinį pritaikymą CC diagnostikoje vis dar riboja keli esminiai iššūkiai. Šių biožymenų diagnostinis jautrumas ir specifiskumas dažnai svyruoja dėl metodologinio kintamumo, skirtingų eksperimentinių platformų naudojimo. Be to, dažnai trūksta standartizuotų kontrolinių grupių ir ilgalaikių stebėsenos duomenų, kurie leistų įvertinti biožymenų patikimumą klinikiname scenarijuje. Taigi, siekiant užtikrinti miRNR diagnostikos įvedimą į kasdienę medicinos praktiką, būtina

vykdyti daugiacentrius, gerai standartizuotus tyrimus, apimančius įvairias pacientų populiacijas. Lygiagrečiai turėtų būti atliekama šių metodų kaštų ir naudos analizė, siekiant įvertinti jų ekonominį pagrįstumą bei ilgalaikį efektyvumą.

6.3.4. Ekstraląstelinės pūslelės

Kita svarbi SB sudedamoji dalis - EP, ypač egzomosos, kurios vis dažniau įvardijamos kaip reikšmingi biologinės informacijos pernešėjai. Tai nano dydžio, lipidine membrana pasidengusios struktūros, išskiriamos gyvų ląstelių aktyvaus metabolizmo metu. EP yra klasifikuojamos pagal jų kilmę ir dydį: egzomosos (50–150 nm) susidaro susiliejus plazminei membranai ir daugiasluoksnėms pūslelėms (angl. *multivesicular bodies*), didesnės EP (100–1000 nm) tiesiogiai formuojasi iš plazminės membranos, o apoptoziniai kūneliai (500–5000 nm) atsiranda ląstelių žūties metu (80). Skirtingai nuo ctDNR, išsiskiriančios mirštant ląstelėms, egzomosos yra išskiriamos gyvų ląstelių, todėl jos geriau atspindi aktyvų navikinį procesą ir yra stabilesnės dėl lipidinės membranos apsaugos (81,82). Egzomosos perneša įvairius molekulinis komponentus, įskaitant RNR, DNR fragmentus, baltymus ir lipidus, kurie gali būti izoliuojami iš kraujo, tulžies ar kitų biologinių skysčių (83).

Ypač perspektyvi CC diagnostikos kryptis yra EP viduje esančių miRNR analizė įvairiuose biologiniuose mėginiuose. Egzomosos, aptinkamos tulžyje, pasižymi išskirtiniu diagnostiniu tikslumu dėl savo artimo sąlyčio su naviko mikroaplinka. Viename iš tyrimų miRNR-200c-3p buvo identifikuotas kaip patikimas ankstyvosios CC diagnostikos biožymuo (59). Ši miRNR, aptikta iš tulžies išskirtose egzomosose, pasiekė AUC 0,87, o jos derinys su CA19-9 padidino diagnostinį tikslumą iki 0,906. Kitame tyrime nagrinėta miRNR-451a ir miRNR-3619-3p svarba - jos taip pat buvo reikšmingai padidėjusios tulžies lataų navikus turinčių pacientų tulžies mėginiuose (84). Išskirtinai miR-3619-3p koreliavo su prastesniu pacientų išgyvenamumu, taip pasižymėdamas ne tik diagnostiniu jautrumu, bet ir prognostine verte. Be to, atlikta šių dviejų miRNR funkcinė analizė atskleidė jų aktyvų dalyvavimą RAS signalizacijos kelyje – onkogeniniame mechanizme, kuris būdingas CC patogenezei (85).

Daug dėmesio sulaukia ir iš kraujo plazmos ar serumo išskirtų egzomų miRNR analizė. Viename iš tyrimų nustatyta, kad egzominė miRNR-200c-3p, išgauta iš serumo, pasižymėjo itin aukštu diagnostiniu tikslumu diagnozuojant CC – AUC siekė 0,93, o jos raiška koreliavo su naviko stadija ir metastazių buvimu, taip suteikdama ir prognostinę vertę (86). Kito tyrimo metu, naudojant NKS, plazmos egzomosose buvo identifikuotos miR-192-5p ir miR-194-5p, kurios skyrėsi savo raiškos lygiu tarp CC sergančiųjų, *O. viverrini* infekuotų

pacientų ir sveikų asmenų (87). Gauti rezultatai parodė, kad abiejų šių miRNR raiška buvo padidėjusi *O. viverrini* infekuotų asmenų grupėje. Tuo tarpu CC grupėje miR-192-5p raiška buvo padidėjusi, o miR-194-5p sumažėjusi, kas rodo jų diagnostinę vertę kaip biožymenų tiek CC, tiek su parazitu susijusiai infekcijai nustatyti, ypač endeminiuose *O. viverrini* paplitimo regionuose. Papildomai atlikta bioinformatinė analizė atskleidė šių miRNR sąsajas su onkogeninio signalinio PI3K/AKT kelio reguliacija, kas gali reikšmingai prisidėti prie CC vystymosi mechanizmų supratimo (87).

Apibendrinant svarbu paminėti, jog tiek iš tulžies, tiek iš serumo ar plazmos išskirtos egzozomos turi diagnostinę vertę, tačiau iš tulžies mėginiai dažnai pasižymi aukštesniu specifiškumu dėl artimo kontakto su naviko aplinka ir gali būti prioritetiškai naudojami lokalizuotai diagnostikai. Tuo tarpu iš kraujo mėginių gautos egzozomos yra tinkamesnės plačiai patikrai ir atvejais, kai reikalingas minimaliai invazyvus mėginių paėmimas. Vis dėlto egzozomų kiekis biologiniuose mėginiuose yra itin mažas, todėl jų analizei būtinos ypač jautrios ir standartizuotos izoliavimo technologijos, kurios šiuo metu dar nėra plačiai taikomos klinikinėje praktikoje.

2 lentelė. CC diagnozei reikšmingų miRNR apžvalga skirtinguose biologiniuose mėginiuose

Aptikimo vieta	miRNA	Raiškos pokytis CC	Lyginamos grupės	AUC	Jautrumas (proc.)	Specifiškumas (proc.)	Šaltinis
Audinys	miRNA-21	↑	CC (N = 18) ir sveiki asmenys (N = 12)	0.995	95	100	(65)
	miRNA-21	↑	Hepatolitiazė su CC (N = 31) ir hepatolitiazė be CC (N = 40)	0.610	96.77	30.00	(68)
Plazma	miRNA-21 and miRNA-22	↑	iCC (N = 359) ir kontrolinė grupė (N = 642)	0.790	63.9	84.7	(67)
	miRNA-221	↑	Hepatolitiazė su CC (N = 31) ir hepatolitiazė be CC (N = 40)	0.767	54.84	95.00	(68)
	miRNA-21, miRNA-221 ^a	↑	Hepatolitiazė su CC (N = 31) ir	0.911	77.42	97.50	(67)

			hepatolitiazė be CC (N = 40)				
Serumas	miRNA-16 and miRNA- 877	↑	dCC (N = 24) ir nepiktybiniai susirgimai (N = 20)	0.90	79	90	(69)
		↑	dCC (N = 24) ir PDAC (N = 24)	0.88	70.83	90	(69)
	miRNA-423- 5p, miRNA- 93-5p, and miRNA-4532	↑	CC (N = 30) ir sveiki asmenys (N = 30) ir <i>Opisthorchis viverrini</i> (N = 30)	-	85.71	76.92	(70)
	miRNA-150- 5p	↓	CC (N = 35) ir sveiki asmenys (N = 35)	-	91,43	80	(72)
	miRNA-26a	↑	CC (N = 66) ir sveiki asmenys (N = 66)	0.899	84.8	81.8	(73)
		↓	CC (N = 30) ir PSC (N = 30)	0.780	52	88	(74)
	miRNA-122, miRNA-192, miRNA-29b, and miRNA- 155 ^b	↑	CC (N = 94) ir sveiki asmenys (N = 40)	-	98.3	100	(75)
	miRNA-18a	↑	eCC (N = 27) ir sveiki asmenys (N = 13)	0.36	51.8	84.6	(76)
	miRNA-532	↑	eCC (N = 27) ir sveiki asmenys (N = 13)	0.35	66.6	69.2	(76)
Tulžis	miRNA-1275	↑	Tulžies latakų navikai (N = 38) ir kontrolinė grupė (N = 35)	0.63	52.6	80	(77)
	miRNA-340 and miRNA- 182	↑	CC (N= 14) ir nepiktybiniai susirgimai (N = 37)	0.79	64.6	82.1	(78)

Egzosominė miRNR iš tulžies	miRNA-125b- 5p and miRNA-194- 5p	↑	PDAC (N = 28) ir CC (N = 6)	0.815	-	-	(79)
	miRNA-200c- 3p	↑	CC (N = 50) ir tulžies akmenys (N = 50)	0.87	83.3	86.7	(59)
	miRNA-451a and miRNA- 3619-3p	↑	Tulžies lataų navikai (N = 45) ir nepiktybiniai susirgimai (N = 43)	0.819	73.5	88.2	(84)
	miRNA-200c- 3p	↑	CC (N = 36) ir sveiki asmenys (N = 12)	0.93	-	-	(88)
	miRNA-194- 5p ^c	↓	CC (N = 15) ir sveiki asmenys (N = 15) ir	-	-	-	(87) ^e
Egzosominė miRNR iš plazmos	miRNA-192- 5p ^d	↑	<i>Opisthorchis viverrini</i> (N = 15)	-	-	-	

^a Derinyje su ultragarso vaizdiniais tyrimais;

^b Bent 2 miRNR buvo serologiškai teigiamos;

^c Sumažėjusi CC grupėje lyginant su sveikais asmenimis;

^d Padidėjusi tiek CC, tiek *O. viverrini* infekuotų pacientų grupėse

^e Kiekybiniai diagnostinio veiksmingumo rodikliai šiame tyrime nebuvo pateikti. Biožymenų reikšmingumas buvo nustatytas remiantis sekoskaitos dažniu ir išraiškos pokyčio (angl. fold change) analize.

AUC, kreivės po ROC (angl. receiver operating curve) plotu reikšmė; CC, cholangiokarcinoma; PDAC, kasos lataų adenokarcinoma (angl. pancreatic ductal adenocarcinoma); PSC, pirminis sklerozuojantis cholangitas.

6.4. CRISPR-Cas sistemų ir mikroRNR vaidmuo cholangiokarcinomos ir kitų onkologinių ligų diagnostikoje

6.4.1. Tradiciniai miRNR aptikimo metodai

Šiuo metu miRNR nustatymui SB mėginiuose dažniausiai naudojami metodai - *Northern blot* analizė, atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR), mikrogardelių tyrimai ir NKS. Vienu seniausių ir patikimiausių miRNR aptikimo metodų vis dar laikomas *Northern blot* tyrimas. Šis metodas leidžia be amplifikacijos sukeltų paklaidų aptikti tiek brandžias, tiek prekursorines miRNR formas, nustatyti jų dydį, taip pat pokyčius,

atsirandančius dėl potranskripcinių RNR modifikacijų. Vis dėlto tai yra gana sudėtingas, daug laiko ir darbo sąnaudų reikalaujantis metodas, todėl šiuo metu retai taikomas klinikinėje praktikoje (89).

Mikrogardelės išsiskiria tuo, jog leidžia analizuoti daug skirtingų miRNR vienu metu, tačiau tuo pačiu pasižymi mažesniu jautrumu ir specifiškumu, taip pat dažnai susiduria su hibridizacijos metu sukeltais netikslumais (89). Tuo tarpu NGS technologijos leidžia nustatyti tiek žinomas, tiek naujas miRNR formas, tačiau šis metodas yra itin brangus, sudėtingas, todėl sunkiai pritaikomas kasdienėje praktikoje (89).

Abiejų pastarųjų metodų rezultatų patvirtinimui dažnai pasitelkiama AT-PGR. Dėl savo aukšto jautrumo ir specifiškumo šiuo metu ji yra laikoma molekulinės diagnostikos „auksiniu standartu“, tačiau, tenka pripažinti, turi ir tam tikrų trūkumų. Nevienodi pradmenų dizaino kūrimo metodai ar skirtingi duomenų analizės ir normalizavimo kriterijai, gali neigiamai paveikti šio metodo tikslumą. Kitaip tariant, jei eksperimentai nėra kruopščiai standartizuoti, skirtingose laboratorijose rezultatai gali būti sunkiai pakartojami. Taip pat šis metodas reikalauja specializuotos įrangos, kvalifikuoto personalo, todėl mėginių analizė gali būti atliekama tik specialiai tam paruošiose laboratorijose (89).

6.4.2. CRISPR-Cas sistemomis paremtų molekulinės diagnostikos metodų kūrimas

Reaguojant į šiuos iššūkius, vis daugiau dėmesio sulaukia CRISPR sistemų pagrindu sukurti molekulinės diagnostikos metodai (90). CRISPR-Cas sistema iš pradžių buvo panaudota kaip itin preciziškas genomo redagavimo įrankis, leidžiantis selektyviai iškirpti (angl. *knock-out*) arba įterpti (angl. *knock-in*) norimus genus. Ši technologija remiasi Cas baltymų, veikiančių kaip molekulinės žirklys, gebėjimu atpažinti specifines DNR ar RNR sekas ir inicijuoti jų skaidymą (91,92). Vis dėlto šių sistemų panaudojimo spektras greitai peržengė vien tik genų redagavimo ribas. CRISPR-Cas kompleksai dabar sėkmingai taikomi nukleorūgščių aptikimui, kas leidžia kurti naujus, itin greitus, aukštu jautrumu ir specifiškumu pasižyminčius vėžio biožymenų diagnostikos metodus (93,94).

Komplekse su sgRNR, Cas baltymai geba itin tiksliai atpažinti specifines miRNR sekas. Atpažinus taikinį, Cas fermentai aktyvuoja ir skaido, pavyzdžiui, fluorescenciniu žymekliu (fluoroforu) pažymėtas molekules, taip sukeldami lengvai išmatuojamą signalą. CRISPR technologijos veikia izoterminėmis sąlygomis, nereikalauja brangios laboratorinės įrangos ir leidžia atlikti diagnostiką greitai bei ekonomiškai. Ateityje šių sistemų apjungimas su biojutiklių platformomis ir dirbtiniu intelektu gali iš esmės transformuoti šiuolaikinę požiūrį

į vėžio diagnostiką, atveriant kelią greitesniems, tikslesniems ir labiau personalizuotiems diagnostiniams sprendimams (95).

Daugybė įvairių platformų įrodė, kad CRISPR pagrįsta diagnostika pasižymi plačiu diagnostiniu pritaikomumu ir universalumu. Vienas iš primųjų šios srities atradimų - DETECTR platforma (angl. *DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*) (35). Tai daugiafunkcė viengrandės DNR aptikimo sistema, kuri remiasi Cas12a fermento netiesioginio (trans) karpymo aktyvumu. Platforma buvo pritaikyta kliniškai reikšmingų patogenų diagnostikai, pavyzdžiui, žmogaus papilomos viruso. Kitas ryškesnis šios technologijos pritaikymo pavyzdys – Broughton ir kolegų (2020) atliktas tyrimas, kurio metu sukurtas COVID-19 diagnostikos testas, leidžiantis per mažiau nei 40 minučių nustatyti SARS-CoV-2 virusą tiesiogiai iš pacientų mėginių (96).

Panašų proveržį pademonstravo Gootenberg ir kolegų (2017) sukurta SHERLOCK (angl. *Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*) platforma, kurioje kartu su rekombinazės polimerazine amplifikacija pasitelktas Cas13a baltymas (97). Cas13a taip pat pasižymi netiesioginio (trans) karpymo gebėjimu, tačiau šiuo atveju - viengrandžių RNR. Toks derinys leidžia itin jautriai ir tiksliai aptikti net labai mažus RNR ar DNR kiekius. Tokia savybė yra itin vertinga diagnozuojant ne tik infekcijas, bet ir navikinius biožymenis - srityje, kur dažnai susiduriama su ribotu taikininių molekulių kiekiu mėginiuose.

6.4.3. CRISPR-Cas sistemos cholangiokarcinomos ir kitų onkologinių ligų diagnostikoje

Be patogenų aptikimo, CRISPR technologija vis plačiau taikoma ir vėžio diagnostikoje, ypač tiriant miRNR - svarbius genų raiškos reguliatorius, susijusius su navikų progresavimu. Vienu iš reikšmingiausių šios srities proveržių laikomas Qiu ir kt. (2018) tyrimas, kuriame pristatyta inovatyvi izoterminės amplifikacijos ir CRISPR-dCas9 technologijų pagrindu veikianti platforma (98). Ši metodika leidžia itin jautriai (fM lygiu) ir specifiskai (vienos bazės tikslumu) aptikti cirkuliuojančias miRNR molekules žmogaus serume. Tai buvo sėkmingai pritaikyta aptinkant let-7a miRNR – biožymenį, susijusį su nesmulkių ląstelių plaučių karcinoma (angl. *Non-small cell lung cancer*, NSCLC). Taip pat nustatyta, kad metodas geba aiškiai atskirti sveikų ir sergančiųjų miRNR raiškos profilius. Tai pirmasis atvejis, kai CRISPR-Cas9 technologija buvo pritaikyta miRNR aptikimui ir buvo atvertos durys naujiems tyrimams šia molekulinės diagnostikos kryptimi (98).

Neilgai trukus buvo sukurta dar pažangesnė diagnostinė platforma, apjungianti CRISPR-Cas9 ir žiedinės amplifikacijos (angl. *Rolling circle amplification*, RCA) teikiamas

galimybes (99). Šis metodas išsiskyrė tuo, jog vienu metu leido aptikti kelias skirtingas miRNR išskirtas iš EP plazmos mėginiuose. Tokia daugiakomponentinė analizė yra itin svarbi onkologinių ligų, ypač CC diagnostikoje. Dėl naviko molekulinio heterogeniškumo pavienių miRNR žymenų taikymas dažnai neužtikrina pakankamo jautrumo ir specifiškumo, todėl reikalingi tiksliai parinkti kelių biožymenų rinkiniai (panelės), leidžiantys tiksliai atskirti ligą nuo kitų būklių. Tai įrodo ir Lapitz bei kolegų (2020) atliktas tyrimas, kuriame išsamiai ištirtas serumo ir šlapimo EP transkriptominis profilis, išskirtas iš sergančiųjų CC, PSC ir sveikų asmenų (100). Tyrimo metu nustatyta, kad pacientų, sergančių CC, EP RNR profilis aiškiai skyrėsi nuo kontrolinių grupių ir atitiko navikinių audinių transkriptomą.

Vis dėlto, nepaisant šių pažangių sprendimų, Cas9 pagrįsta analizė vis dar susiduria su techniniais iššūkiais. Vienas esminių trūkumų - būtinybė taikinyje turėti specifinę PAM seką, kuri riboja potencialių taikinių pasirinkimą. Be to, daugiakomponentės analizės sistemose kyla signalo „persidengimo“ rizika ir susiduriama su sudėtingesniais pradmenų dizaino reikalavimais.

Dėl Cas9 būdingų apribojimų, diagnostinėms platformoms vis dažniau pasirenkami alternatyvūs Cas fermentai, ypač Cas12a ar Cas13a, kurie veikia be PAM sekos reikalavimų ir turi būdingas netiesioginio (trans) karpymo savybes. Vienas iš pavyzdžių, Zhang ir bendraautorių komandos (2025) tyrimas. Jie sukūrė CRISPR-Cas13a pagrindu veikiančią sistemą, sujungtą su mašininio mokymosi algoritmais, kuri skirta fekalinių EP miRNR rinkinio aptikimui. Ši platforma (FEVOR) leido ne invaziniu būdu diagnozuoti storosios žarnos vėžį su daugiau nei 97 % tikslumu, viršijant tradicinių biožymenų galimybes (101).

6.4.4. CRISPR-Cas sistemos ir izoterminė amplifikacija

Įvairūs izoterminės amplifikacijos metodai buvo sukurti siekiant palengvinti miRNR aptikimą, ypač tais atvejais, kai norima sumažinti specializuotos įrangos poreikį ir analizės sudėtingumą. Tarp tokių metodų dažniausi kilpinės izoterminės amplifikacijos (angl. *loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) (102), eksponentinės amplifikacijos reakcijos (angl. *exponential amplification reaction*, EXPAR) (103), hibridinės grandinės reakcijos (angl. *hybridization chain reaction*, HCR) (104), katalizuotos kilpinės sąrankos (angl. *catalyzed hairpin assembly*, CHA) (105,106) bei RCA (107) metodai. Visi jie patrauklūs dėl paprastos reakcijos eigos, galimybės veikti pastovioje temperatūroje, todėl nebūtina ir termociklerinė įranga. Vis dėlto, šie metodai vis dar dažnai susiduria su ribotu jautrumu ir nespecifinės amplifikacijos rizika, dėl ko mažėja klinikinis pritaikomumas.

Pastariesiems iššūkiams spręsti buvo pasiūlyti kombinuoti metodai, kurie sujungia izoterminę amplifikaciją su CRISPR-Cas sistemomis viename mėgintuvėlyje (angl. *one-pot*). Tai leidžia dar reikšmingiau prisidėti prie aptikimo specifiškumo ir jautrumo didinimo. Vienas pavyzdžių - Cas14SDA analizės sistema, kurioje CRISPR-Cas14a derinama su grandies išstūmimu paremta amplifikacija (angl. *strand displacement amplification*, SDA) (108). Šis metodas per vieną valandą aptiko miRNR-21 ir galėjo veiksmingai atskirti CC sergančius pacientus nuo sveikų kontrolinės grupės asmenų.

Be šios inovacijos ir kiti izoterminiai metodai buvo sėkmingai pritaikyti kartu su CRISPR-Cas sistemomis: EXPAR (109), RCA (99,110) LAMP (111) ir CHA (112). Šių platformų kūrimas yra svarbus žingsnis miRNR diagnostikos srityje, tačiau dauguma jų vis dar reikalauja papildomų miRNR išskyrimo etapų ir nebūtinai leidžia aptikti kelis taikinius vienu bandymu. Tai riboja jų pritaikomumą realioje klinikinėje praktikoje ar greituosiuose diagnostiniuose testuose.

Šiuos apribojimus bando spręsti, dar inovatyvesnės, vieno žingsnio ir vieno mėgintuvėlio sistemos (angl. *one-step and one-pot*). Viena jų - EXTRA-CRISPR - buvo sukurta apjungiant RCA metodą kartu su Cas12a endonukleaze. Ši platforma sėkmingai pritaikyta kelių specifinių miRNR aptikimui EP, gautose iš PDAC pacientų plazmos su itin aukštu jautrumu ir specifiškumu (113). Metodas pasižymi greitu įgyvendinimu – nuo mėginio paruošimo iki rezultato užtrunkama nuo 20 min. iki 3 val. Be to, jam nereikalinga specializuota įranga - rezultatai gali būti nustatomi tiek naudojant išmaniojo telefono fluorescencinį jutiklį, tiek greituosius imunochromatografinius metodus. Dar visai neseniai literatūroje pristatyta ir kita panaši sistema, besiremianti Cas13a fermentu - *CRISPR-circuit* (114). Ši metodika leidžia atlikti daugiakomponentę miRNR analizę vos per vos 15 minučių, pasiekiant jautrumą atomoliniu (aM) lygiu. Be to, sistema pašalina sudėtingą analizės eigą, sumažina užteršimo riziką ir leidžia vienu metu aptikti kelis miRNR žymenis. Tai didelis žingsnis į priekį vystant greitąją vėžio diagnostiką klinikiniam kontekste.

Sparčiai tobulėjant CRISPR technologijoms, jų taikymas vėžio diagnostikoje tampa vis reikšmingesnis. Šios inovatyvios sistemos leidžia pasiekti itin aukštą jautrumą ir specifiškumą bei atveria naujas galimybes kuriant plačiai prieinamus, greitus ir tikslius SB ir CRISPR-Cas sistemomis paremtus įrankius, skirtus ankstyvai vėžio diagnostikai ir prognozei gerinti (115).

6.5. CRISPR-Cas sistemomos cholangiokarcinomos diagnostikoje: iššūkiai ir ateities perspektyvos

Nepaisant CRISPR technologijų pažangos SB srityje, vis dar išlieka svarbių žinių spragų. Dabartiniai tyrimai patvirtina CRISPR sistemų potencialą *in vitro* sąlygomis laboratorijose, tačiau būtina atlikti klinikinį šių metodų patikrinimą platesnėse, demografiškai įvairiose pacientų grupėse. Klinikinėje praktikoje šių technologijų integravimas susiduria su organizaciniais iššūkiais, ypač susijusiais su procedūrų standartizavimu ir reguliacinių reikalavimų atitikimu (116). Pastaraisiais metais CRISPR-Cas pagrindu veikiančiose aptikimo sistemose dažniausiai taikyti fluorescenciniu signalu grįsti metodai, pasižymintys dideliu jautrumu, tačiau jų rezultatų analizė dažnai reikalauja specializuotos įrangos, kuri ribotų išteklių aplinkoje, ne visada yra lengvai prieinama (117). Taip pat, nors CRISPR sistemos geba aptikti itin mažas taikinių koncentracijas, jų jautrumas ir specifiskumas vis dar riboti. Tai iš dalies gali lemti įvykstančios kryžminės reakcijos su ne taikinėmis sekomis. Dėl šios priežasties atsiranda klaidingai teigiami ar neigiami rezultatai - tai ypatingai sudėtingas iššūkis klinikinės diagnostikos ir etinių klausimų kontekste (117).

Ateities tyrimai turėtų koncentruotis į ilgalaikį biožymenų stebėjimą CC pacientų grupėse, siekiant įvertinti ligos progresiją ir atsaką į terapinius sprendimus. Taip pat vertinga būtų ištirti sąveiką tarp miRNR ir kitų molekulinų signalinių kelių CC vystymosi – tai galėtų suteikti naujų įžvalgų apie naviko mikroaplinką ir padėti identifikuoti naujus taikinius terapijai. Galiausiai, tam kad CRISPR sistemos būtų integruotos į rutininius diagnostinius protokolus, būtina sukurti standartizuotas analizės procedūras, užtikrinančias rezultatų pakartojamumą skirtingose laboratorijose ir klinikiniuose padaliniuose (117).

Svarbu paminėti, jog atliekant literatūros analizę pastebėtas akivaizdus CRISPR-Cas technologijomis paremtų tyrimų trūkumas skirtas CC diagnostikai, nors tai agresyvus ir dažnai per vėlai aptinkamas navikas (15). Atsižvelgiant į tai, šiame darbe siūlomas teorinis, CRISPR-Cas9 ir RCA sprendimus apjungiantis protokolai, skirtas iš EP išskirtų miRNR nustatymui dCC pacientų plazmos mėginiuose, kaip galima tolimesnių tyrimų kryptis.

7. DISTALINĖS CHOLANGIOKARCINOMOS, KASOS LATAKŲ ADENOKARCINOMOS IR GERYBINIŲ TULŽIES LATAKŲ BŪKLIŲ DIFERENCINĖS DIAGNOSTIKOS TEORINIS PROTOKOLAS

Distalinės cholangiokarcinomos (dCC) diagnozė išlieka diagnostiniu iššūkiu dėl savo klinikinių simptomų ir radiologinių vaizdų panašumo į kasos latakų adenokarcinomą (PDAC), o tai dažnai lemia klaidingą diagnozę ir netinkamą gydymo pasirinkimą (118).

Neseniai mikroRNR (miRNR) išryškėjo kaip perspektyvūs, mažiau invazyvūs biožymenys, galintys pagerinti onkologinių ligų diagnostinį tikslumą. Po išsamios literatūros paieškos nuspręsta pasitelkti miRNR-16 ir miRNR-877 kaip daug žadančius diagnostinius biožymenis. Šių dviejų miRNR grupė buvo patvirtinta kaip dCC specifiskų biožymenų profilis, leidžiantis atskirti dCC nuo gerybinių susirgimų (AUC = 0,90) ir nuo PDAC (AUC = 0,88) (69). Lyginant su iš plazmos gauta laisvai cirkuliuojančia miRNR, ekstraląstelinėse pūslelėse (EP) esanti miRNR yra stabilesnė dėl egzosomų teikiamos apsaugos, todėl pastarasis metodas tampa patrauklesnis vėžio diagnostikai ir buvo pasirinktas šiam tyrimui.

Nors įprastai cirkuliuojančioms miRNR kiekybiškai nustatyti naudojamas atvirkštinės transkripcijos polimerazinės grandininės reakcijos (AT-PGR) metodas, jis apima daug sudėtingų etapų (RNR išskyrimą, atvirkštinę transkripciją ir amplifikaciją), todėl nėra patrauklus būdas mažos koncentracijos molekulėms aptikti. Siekiant įveikti šiuos diagnostinius iššūkius, kuriami nauji nukleorūgščių nustatymo metodai, besiremiantys inovatyviomis CRISPR-Cas sistemomis. Vienas iš jų – *RACE* (angl. *Rolling Circle Amplification (RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage*) metodas, leidžiantis ypač jautriai ir specifiskai aptikti miRNR molekules (99).

Pagrindinis šio tyrimo tikslas – nustatyti, ar RACE metodas gali pagerinti diagnostinį tikslumą diferencijuojant dCCA nuo PDAC ir gerybinių tulžies takų ligų. Antriniai tikslai – palyginti RACE ir AT-PGR metodus bei įvertinti RACE platformos pritaikomumą kasdienėje klinikinėje praktikoje.

7.1. Tiriamieji ir metodai

Pacientų atranka. Į prospektyvinį tyrimą bus įtraukti ≥ 18 metų pacientai, suskirstyti į keturias grupes:

- 1) **Distalinės cholangiokarcinomos (dCC) grupė:** pacientai, kuriems diagnozuota dCC. Įtraukimo kriterijai: navikas lokalizuotas distalinėje ekstrahepatinių tulžies lataku

dalyje (nuo ampulinės srities iki tulžies pūslės latako jungties), patvirtintas histopatologiškai (chirurginė rezekcija arba biopsija) arba multidisciplinio konsiliumo metu pagal vaizdinius ir klinikinius duomenis, jei biopsija neįmanoma;

- 2) **Kasos latakų adenokarcinomos grupė (PDAC):** pacientai, sergantys PDAC, patvirtinta pataloginiais arba klinikiniais/vaizdiniais kriterijais, atitinkantys dCC grupę pagal amžių, lytį ir, jei yra duomenų, ligos stadiją;
- 3) **Gerybinių tulžies latakų ligų grupė:** pacientai, sergantys ne piktybinėmis ligomis, sukeliančiomis distalinę tulžies latakų obstrukciją ar cholestazę, kaip tulžies latakų akmenligę, pirminis sklerozuojantis cholangitas, autoimuninė cholangiopatija ar lėtinis pankreatitas. Ši grupė naudojama kaip kontrolė uždegiminiams arba obstrukciniams procesams, galintiems paveikti biožymenų lygius;
- 4) **Sveikų kontrolinių asmenų grupė:** sveiki savanoriai, parinkti pagal amžių ir lytį, neturintys vėžio ar reikšmingų kepenų ir tulžies latakų ligų anamnezėje. Ši grupė naudojama pamatiniams biožymenų intervalams nustatyti.

Kraujo mėginių surinkimas ir plazmos paruošimas. Iš kiekvieno paciento paimama apie 10 ml periferinio kraujo į mėgintuvėlius su EDTA antikoagulantu. Siekiant išsaugoti RNR vientisumą, mėginiai apdorojami per 2 valandas nuo paėmimo. Plazma atskiriama centrifuguojant 1500 aps./min. greičiu 10 minučių, pašalinant ląsteles. Atliekama papildoma centrifugacija didesniu greičiu – $10\,000 \times g$ 10 minučių, siekiant pašalinti ląstelių likučius. Gauta plazma saugoma -80°C temperatūroje iki EP išskyrimo.

EP ir miRNR išskyrimas: EP iš plazmos ir tolimesniam miRNR išskyrimui bus naudojami specialūs rinkiniai skirti biologiniams skysčiams (pvz., *Qiagen miRNeasy Serum/Plasma*, *Norgen biotek Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Kit* ar kt.). Išskirtų miRNR mėginiai trumpam laikotarpiui (greitai analizei) bus saugomi -20°C temperatūroje, o ilgam laikotarpiui -80°C , kad būtų išvengta daugybinių šaldymo-atšildymo ciklų, taip siekiant išsaugoti nukleorūgščių vientisumą.

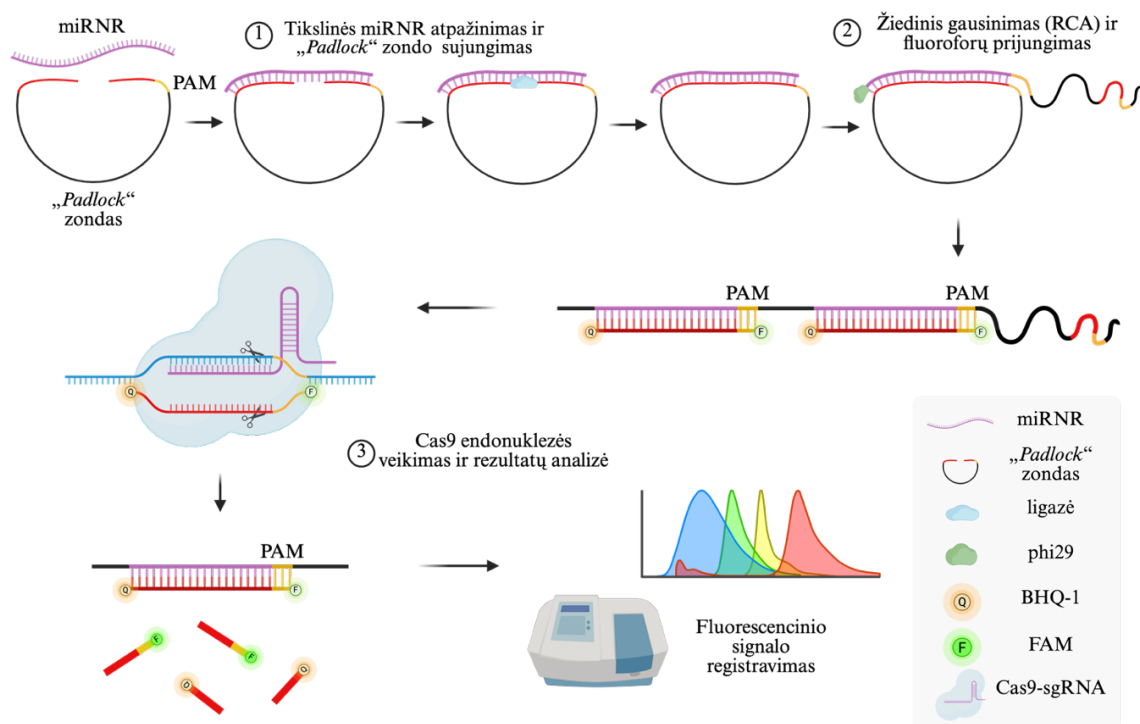
RACE metodika miRNR nustatymui. Ši dalis atliekama pagal Wang ir kt. aprašytą metodą pritaikant miR-16 ir miR-877 taikiniams. Metodika apima du pagrindinius etapus:

- 1) **„Padlock“ zondo ligavimas ir RCA:** kiekvienai tikslinei miRNR (miRNR-16 ir miRNR-877) sukuriama „padlock“ zondas (žiedinė DNR oligonukleotidų grandinė), turintis komplementarią seką miRNR 5' ir 3' galuose ir PAM seką Cas9 endonukleazei prisijungti. Aptikus tikslinę miRNR, „padlock“ zondas prie jos prisijungia, pridedama DNR ligazė (pvz., HiFi Taq ligazė) ir mišinys inkubuojamas 37°C temperatūroje 30

min. Žiedinis DNR zondas suformuojamas tik tuo atveju, jei jis tiksliai atitinka miRNR (bet koks vieno nukleotido neatitikimas neleidžia susidaryti žiedui, taip užtikrintant specifiskumą).

Gautas žiedinis DNR zondas tampa matrica RCA. Naudojant phi29 DNR polimerazę, RCA vykdoma pastovioje 37 °C temperatūroje apie 60 min. perteklinėje dNTP koncentracijoje. Šio proceso metu žiedinė matrica nuolat replikuojama, generuojant ilgą viengrandę DNR molekulę su daugybe tikslinės miRNR sekos pakartojimų. Phi29 polimerazės aktyvumas sustabdomas mišinį pakaitinus 65°C temperatūroje 10 min.

- 2) **CRISPR-Cas9 aptikimas:** antrajame etape iš anksto suformuojamas sgRNR ir Cas 9 (sgRNA/Cas9) kompleksas (25°C temperatūroje 10 min). Kompleksas sumaišomas su amplifikacijos produktais ir TaqMan tipo fluorescenciniu zonu. Cas9/sgRNR prisijungus prie atitinkamos sekos, Cas9 endonukleazė sukarpo DNR šalia PAM lokuso. Kad šis skėlimo įvykis būtų paverstas aptinkamu signalu, bus naudojama fluorescencinė reporterinė sistema: trumpa dvigrandė DNR reporterinė seka bus suformuota hibridizuojant TaqMan tipo zoną, pažymėtą 5' fluoroforu (pvz., FAM) ir 3' gesikliu (pvz., BHQ1), su RCA produktu. Iki Cas9 veikimo gesiklis slopina fluorescenciją, o perkirpus dvigrandę DNR fluoroforas atsiskiria nuo gesiklio ir taip sukeliamas spektroskopu išmatuojamas švytėjimas. Inkubacija vyksta 37°C temperatūroje 30 min tamsiomis sąlygomis. Fluorescencijos intensyvumas (FI) stebimas realiuoju laiku naudojant fluorescencinį spektrometrą.



4 pav. RACE metodo scheminė iliustracija. (1) Tikslinės sekos atpažinimas ir „padlock“ zondo prisijungimas: zondas su PAM sritimi prisijungia prie tikslinės miRNR, ir abu laisvi galai sujungiami į žiedinę struktūrą naudojant HiFi Taq DNR ligazę. (2) Žiedinė amplifikacija (RCA): naudojant phi29 DNR polimerazę suformuojama ilga dvigrandė DNR, prie kurios hibridizuojami TaqMan zondai. (3) Cas9 kirpimas ir aptikimas: sgRNR/Cas9 kompleksas atpažįsta ir perkerpa taikinį šalia PAM srities dvigrandėje DNR struktūroje, atskirdamas fluoroforą nuo gesiklio. Taip sukeliamas išmatuojamas fluorescencijos signalas.

AT-PGR patvirtinimas. Kartu su RACE metodu visiems mėginiams bus atliekama standartinė AT-PGR, naudojant tuos pačius RNR mėginius. Tam bus pasitelkiami specialūs TaqMan pradmenys (angl. *stem-loop*), kurie atpažįsta būtent miRNR-16 ir miRNR-877, vadovaujantis gamintojo instrukcijomis. Gautos slenksčio ciklo (Ct) reikšmės bus tiesiogiai lyginamos su RACE metodo metu gautomis FI reikšmėmis, siekiant įvertinti metodo patikimumą. FI tikimasi koreliuos su pradine miRNR koncentracija, taip pat bus sudarytos kalibracinės kreivės su sintetinėmis miRNR standartinėmis koncentracijomis.

Duomenų analizė. Aprašomoji statistika: Pirmiausia bus apibendrintos kiekvienos grupės pacientų charakteristikos (amžius, lytis, ligos stadija ir kt.), siekiant užtikrinti, kad grupės būtų palyginamos.

Lyginamoji analizė: miRNR raiškos skirtumai tarp grupių bus analizuojami naudojant t-testą arba Mann-Whitney U testą. Diagnostiniam tikslumui įvertinti bus sudarytos ROC kreivės (apskaičiuojant AUC, jautrumą ir specifiškumą).

7.2. Tikėtini rezultatai ir reikšmė.

Tikimės, kad RACE platforma padės pasiekti aukštą diagnostinį tikslumą nustatant dCCA atvejus, viršijant esamus biožymenis (pvz., CA19-9) jautrumo ir specifiškumo atžvilgiu. Jautrumas gali būti dar didesnis, jei RACE dėl savo itin didelio jautrumo (fM lygio detekcija) užfiksuos žemesnio lygio miRNR signalus. Be to, šis metodas pasižymi vieno nukleotido specifiškumu ir palyginus greitai gaunamu rezultatu (atliekamas ~37 °C temperatūroje, nereikalaudamas termociklerinės įrangos), todėl gali būti pritaikomas ir greitosios diagnostikos (angl. *point-of-care*) sistemose.

Sėkmingas šio metodo įdiegimas galėtų iš esmės pakeisti kasos ir tulžies lataų navikų diferencinę diagnostiką, suteikiant galimybę atlikti minimaliai invazyvų kraujo tyrimą, kuris padėtų atskirti dCCA nuo PDAC bei kitų gerybinių būklių. Tai galėtų paankstinti tinkamo gydymo pasirinkimą ir pagerintų pacientų išgytį.

8. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Cholangiokarcinoma (CC) išlieka vienu iš sudėtingiausių onkologinių susirgimų dėl savo biologinės įvairovės ir komplikuočių molekulinį mechanizmų. Šie aspektai ne tik trukdo tiksliai diagnozuoti ligą, bet ir apsunkina individualizuotų, veiksmingų gydymo strategijų parinkimą, todėl dažnai nulemia nepalankias pacientų prognozes. Nors invazinė audinių biopsija ir histopatologinis ištyrimas, vaizdiniai tyrimai ir serumo navikinių biožymenų (CA 19-9) tebėra laikomi diagnostikos „aukso standartu“, pastarojo taikymas susiduria su esminiais iššūkiais. Esant žemai biožymenų koncentracijai kraujyje, šis metodas dažnai stokoja pakankamo jautrumo ir specifiškumo, todėl ligos aptikimas ankstyvose stadijose išlieka nepatikimas. Be to, dabartiniai klinikinėje praktikoje taikomi metodai nesugeba patikimai atskirti piktybinių ir gerybinių navikų, tiksliai nustatyti jų anatomicinės kilmės ar įvertinti morfologinio naviko kintamumo ligos eigoje. Visa tai lemia, jog dabartinės diagnostikos priemonės yra nepakankamos ankstyvai CC diagnozei ir verčia ieškoti naujų, pažangesnių diagnostinių strategijų.

Šiuo požiūriu skystoji biopsija (SB) iškyla kaip daug žadantis diagnostinis metodas, leidžiantis išvengti histopatologinių mėginių heterogeniškumo ir fiksavimo procedūrų sukeltų pokyčių – vietoj to naudojami švieži kūno skysčių mėginiai (pvz., plazma, serumas, tulžis). Šis metodas yra mažiau invazyvus, saugesnis ir greitesnis nei tradicinė biopsija, o tuo pačiu leidžia surinkti vertingą informaciją apie naviko genomiką, proteomiką ir metabolomiką. Pastaruoju metu miRNR išryškėjo kaip vienas iš daugiausiai vilčių teikiančių biožymenų. Pavyzdžiui, miRNR-21 raiška CC tiek audiniuose, tiek SB mėginiuose pasižymi aukštu jautrumu ir specifiškumu, padėdama atskirti vėžinius audinius nuo sveikų. Vis dėlto, tradiciniai miRNR aptikimo metodai kaip atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR) susiduria su iššūkiais - trumpas sekų ilgis, žema jų gausa organizmo skysčiuose bei didelis protokolų jautrumas techninėms variacijoms lemia reikšmingus netikslumus, tarp jų ir klaidingai neigiamus rezultatus.

Čia reikšmingą proveržį siūlo CRISPR-Cas sistemomis pagrįsta diagnostika, kuri leidžia tiksliai ir jautriai identifikuoti SB biožymenis be būtinybės atlikti sudėtingą DNR ar RNR amplifikaciją. Šie metodai remiasi programuojamomis nukleazėmis, tokiomis kaip Cas12 ir Cas13, kurios geba atpažinti specifines nukleorūgščių sekas ir inicijuoti signalinius atsakus. Kai CRISPR-Cas technologijos yra derinamos su izoterminės amplifikacijos metodais, signalas generuojamas realiuoju laiku ir pasiekiamas itin aukštas jautrumas. Tai reiškia, kad net itin mažos biožymenų koncentracijos gali būti aptiktos greitai ir patikimai. Šiomis savybėmis pasižymi ir diagnostiniame protokole siūloma RACE (angl. *Rolling Circle Amplification (RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage*) platforma, skirta miR-16 ir miR-877 aptikimui. Šis metodas leidžia atlikti daugiakomponentę analizę be sudėtingos laboratorinės įrangos ir galėtų būti lengvai pritaikomas ribotų išteklių aplinkose.

Nors CRISPR-Cas sistemos, pirmiausia, buvo atrastos ir panaudotos kaip genomo redagavimo įrankis, jų veikimo ir pritaikymo spektras išsiplėtė labai greitai, tarp kurių atsirado ir precizinė minimaliai invazyvi vėžio diagnostika. Vis dėlto, dabartiniai miRNR aptikimo metodai turi savų trūkumų. MiRNR diagnostinė vertė vis dar ne iki galo iširta ir gali skirtis priklausomai nuo onkologinės ligos stadijos ar kitų gretutinių būklių. Taip pat išlieka kryžminių reakcijų su ne tikslinėmis sekomis, kurios gali lemti klaidingai teigiamus ar neigiamus rezultatus, galimybė. Sudėtingas ir procesų standartizavimas tarp laboratorijų, kuriems reikalingas išsamus klinikinis patvirtinimas. Siekiant, kad CRISPR-Cas sistemos būtų saugiai ir efektyviai integruotos į klinikinę praktiką, būtina standartizuoti tyrimų protokolus, investuoti į technologinę plėtrą ir užtikrinti plataus masto specialistų mokymus. Tik tokiu būdu bus galima visapusiškai išnaudoti CRISPR-Cas sistemų teikiamą potencialą ankstyvai

cholangiokarcinomos ir kitų onkologinių ligų diagnostikai bei taip užtikrinti savalaikį ir veiksmingą gydymo strategijų pasirinkimą pacientams.

9. IŠVADOS

Apibendrinant galima teigti, kad skystosios biopsijos taikymas kartu su CRISPR-Cas sistemomis yra itin perspektyvi sritis ankstyvojoje cholangiokarcinomos diagnostikoje. Skystoji biopsija sumažina invazinių procedūrų keliamą riziką ir leidžia greitai gauti informaciją apie naviko biologiją, o CRISPR-Cas sistemos suteikia galimybę itin tiksliai ir ankstyvoje ligos stadijoje aptikti specifinius biožymenis, kaip miRNR. Šių metodų sintezė gali paspartinti diagnostinį procesą, sumažinti ekonominius kaštus ir sudaryti sąlygas laiku pradėti gydymą. Vis dėlto, šių procedūrų taikymas realiuose klinikiuose scenarijuose vis dar reikalauja išsamaus patvirtinimo. Ateities tyrimai turėtų būti nukreipti į klinikinių protokolų standartizavimą ir technologinių sprendimų patvirtinimą, siekiant užtikrinti saugų ir veiksmingą šių inovatyvių sprendimų įtraukimą į kasdienę klinikinę praktiką.

10. PADĖKA

Nuoširdi padėka Gyvybės mokslų centro, EMBL partnerystės instituto laboratorijos mokslininkams dr. Stephen Knox Jones Jr. ir doktorantui Uzair Ahmed už konsultacijas ir visokeriopą pagalbą diagnostinio protokolo kūrimo metu.

11. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma-evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2018;15(2):95–111. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.157>
2. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020;17(9):557–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-0310-z>
3. Labib PL, Goodchild G, Pereira SP. Molecular Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. Vol. 19, *BMC Cancer*. BioMed Central; 2019.
4. Forner A, Vidili G, Rengo M, Bujanda L, Ponz-Sarvisé M, Lamarca A. Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver International*. 2019;39(S1):98–107.
5. Khan SA, Tavorari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver International* [Internet]. 2019;39(S1):19–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30831002/>

6. Rompianesi G, Martino M Di, Gordon-Weeks A, Montalti R, Troisi R. Liquid Biopsy in Cholangiocarcinoma: Current Status and Future Perspectives. *World J Gastrointest Oncol*. 2021 May 1;13(5):332–50.
7. Macias RIR, Banales JM, Sangro B, Muntané J, Avila MA, Lozano E, et al. The search for novel diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2018;1864(4):1468–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.08.002>
8. Rodrigues PM, Vogel A, Arrese M, Balderramo DC, Valle JW, Banales JM. Next-generation biomarkers for cholangiocarcinoma. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
9. Weiskirchen S, Weiskirchen R. Unraveling the future: hot topics shaping molecular diagnostics today. *Expert Rev Mol Diagn*. 2025;
10. Shegekar T, Vodithala S, Juganavar A. The Emerging Role of Liquid Biopsies in Revolutionising Cancer Diagnosis and Therapy. *Cureus*. 2023 Aug 17;
11. Uijterwijk BA, Lemmers DH, Ghidini M, Wilmink H, Zaniboni A, Salvia R, et al. The Five Periapillary Cancers, not Just Different Siblings but Different Families: An International Multicenter Cohort Study. *Ann Surg Oncol*. 2024 Sep 1;31(9):6157–69.
12. Brindley PJ, Bachini M, Ilyas SI, Khan SA, Loukas A, Sirica AE, et al. Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2021;7(1). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41572-021-00300-2>
13. Qurashi M, Vithayathil M, Khan SA. Epidemiology of cholangiocarcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*. 2023 Feb 1;
14. Putatunda V, Jusakul A, Roberts L, Wang XW. Genetic, Epigenetic, and Microenvironmental Drivers of Cholangiocarcinoma. Vol. 195, *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc.; 2025. p. 362–77.
15. Moazzami B, Majidzadeh-A K, Dooghaie-Moghadam A, Eslami P, Razavi-Khorasani N, Iravani S, et al. Cholangiocarcinoma: State of the Art. Vol. 51, *Journal of Gastrointestinal Cancer*. Springer; 2020. p. 774–81.
16. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. Vol. 18, *Current Opinion in Cell Biology*. 2006. p. 565–71.
17. Lapitz A, Azkargorta M, Milkiewicz P, Olaizola P, Zhuravleva E, Grimsrud MM, et al. Liquid biopsy-based protein biomarkers for risk prediction, early diagnosis, and prognostication of cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2023 Jul 1;79(1):93–108.
18. Izquierdo-Sanchez L, Lamarca A, La Casta A, Buettner S, Utpatel K, Klumpen HJ, et al. Cholangiocarcinoma landscape in Europe: Diagnostic, prognostic and therapeutic insights from the ENSCCA Registry. *J Hepatol*. 2022 May 1;76(5):1109–21.

19. Bertuccio P, Malvezzi M, Carioli G, Hashim D, Boffetta P, El-Serag HB, et al. Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 2019 Jul 1;71(1):104–14.
20. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. Vol. 18, *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.; 2020. p. 2401–15.
21. Anzalone A V., Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. Vol. 38, *Nature Biotechnology*. Nature Research; 2020. p. 824–44.
22. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011 Mar 31;471(7340):602–7.
23. Hille F, Charpentier E. CRISPR-cas: Biology, mechanisms and relevance. Vol. 371, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society of London; 2016.
24. Wright A V., Nuñez JK, Doudna JA. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. Vol. 164, *Cell*. Cell Press; 2016. p. 29–44.
25. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* (1979). 2016 Aug 5;353(6299).
26. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Vol. 18, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2020. p. 67–83.
27. Jolany Vangah S, Katalani C, Booneh HA, Hajizade A, Sijercic A, Ahmadian G. CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. Vol. 22, *Biological Procedures Online*. BioMed Central Ltd; 2020.
28. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Feb 13;15(3):169–82.
29. Mengstie MA, Wondimu BZ. Mechanism and applications of crispr/ cas-9-mediated genome editing. Vol. 15, *Biologics: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd; 2021. p. 353–61.
30. Hirano S, Nishimasu H, Ishitani R, Nureki O. Structural Basis for the Altered PAM Specificities of Engineered CRISPR-Cas9. *Mol Cell.* 2016 Mar 17;61(6):886–94.
31. Pawelczak KS, Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Turchi JJ. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. Vol. 13, *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society; 2018. p. 389–96.

32. Mengstie MA, Azezew MT, Dejenie TA, Teshome AA, Admasu FT, Teklemariam AB, et al. Recent Advancements in Reducing the Off-Target Effect of CRISPR-Cas9 Genome Editing. Vol. 18, *Biologics: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd; 2024. p. 21–8.
33. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. Vol. 11, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
34. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. Vol. 20, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 490–507.
35. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
36. Li SY, Cheng QX, Li XY, Zhang ZL, Gao S, Cao RB, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. Vol. 4, *Cell Discovery*. Nature Publishing Groups; 2018.
37. Zhou J, Li Z, Seun Olajide J, Wang G. CRISPR/Cas-based nucleic acid detection strategies: Trends and challenges. *Heliyon*. 2024 Feb;10(4):e26179.
38. Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes.
39. Son H. Harnessing CRISPR/Cas Systems for DNA and RNA Detection: Principles, Techniques, and Challenges. Vol. 14, *Biosensors*. 2024.
40. Zhao L, Qiu M, Li X, Yang J, Li J. CRISPR-Cas13a system: A novel tool for molecular diagnostics. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
41. Zhang L, Li S, Li R, Qiu X, Fan T, Wang B, et al. Advances in application of CRISPR-Cas13a system. Vol. 14, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media SA; 2024.
42. Zhou Q, Chen Y, Wang R, Jia F, He F, Yuan F. Advances of CRISPR-Cas13 system in COVID-19 diagnosis and treatment. Vol. 10, *Genes and Diseases*. KeAi Communications Co.; 2023. p. 2414–24.
43. Chen Y, Zhang Y, Luo S, Yang X, Liu C, Zhang Q, et al. Foldback-crRNA-Enhanced CRISPR/Cas13a System (FCECas13a) Enables Direct Detection of Ultrashort snRNA. *Anal Chem*. 2023 Oct 24;95(42):15606–13.
44. Durán-Vinet B, Araya-Castro K, Calderón J, Vergara L, Weber H, Retamales J, et al. CRISPR/Cas13-based platforms for a potential next-generation diagnosis of colorectal cancer through exosomes micro-RNA detection: A review. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
45. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. Vol. 37, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 730–43.
46. Ma L, Guo H, Zhao Y, Liu Z, Wang C, Bu J, et al. Liquid biopsy in cancer current: status, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2024 Dec 2;9(1):336. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39617822>

47. Arrichiello G, Nacca V, Paragliola F, Giunta EF. Liquid biopsy in biliary tract cancer from blood and bile samples: current knowledge and future perspectives. Vol. 3, Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy. Open Exploration Publishing Inc; 2022. p. 362–74.
48. Macias RIR, Kanzaki H, Berasain C, Avila MA, Marin JJG, Hoshida Y. The Search for Risk, Diagnostic, and Prognostic Biomarkers of Cholangiocarcinoma and Their Biological and Clinicopathologic Significance. *Am J Pathol*. 2024 Mar;
49. Shotton R, Lamarca A, Valle J, McNamara MG. Potential utility of liquid biopsies in the management of patients with biliary tract cancers: A review. *World J Gastrointest Oncol*. 2021;13(9):1073–85.
50. Kotsifa E, Saffioti F, Mavroeidis VK. Cholangiocarcinoma: The era of liquid biopsy. Vol. 31, World Journal of Gastroenterology. Baishideng Publishing Group Inc; 2025.
51. Connal S, Cameron JM, Sala A, Brennan PM, Palmer DS, Palmer JD, et al. Liquid biopsies: the future of cancer early detection. Vol. 21, Journal of Translational Medicine. BioMed Central Ltd; 2023.
52. Allen TA. The Role of Circulating Tumor Cells as a Liquid Biopsy for Cancer: Advances, Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. Vol. 16, Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
53. Gopinathan P, Chiang NJ, Bandaru A, Sinha A, Huang WY, Hung SC, et al. Exploring Circulating Tumor Cells in Cholangiocarcinoma Using a Novel Glycosaminoglycan Probe on a Microfluidic Platform. *Adv Healthc Mater*. 2020 May 1;9(10).
54. Nguyen TNA, Huang PS, Chu PY, Hsieh CH, Wu MH. Recent Progress in Enhanced Cancer Diagnosis, Prognosis, and Monitoring Using a Combined Analysis of the Number of Circulating Tumor Cells (CTCs) and Other Clinical Parameters. Vol. 15, Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
55. Edd JF, Mishra A, Smith KC, Kapur R, Maheswaran S, Haber DA, et al. iScience Isolation of circulating tumor cells. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci>.
56. Xu C, Du D, Han Z, Si H, Li W, Li L, et al. Separation and Analysis of Rare Tumor Cells in Various Body Fluids Based on Microfluidic Technology for Clinical Applications. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society; 2025.
57. Zhu D, Wang H, Wu W, Geng S, Zhong G, Li Y, et al. Circulating cell-free DNA fragmentation is a stepwise and conserved process linked to apoptosis. *BMC Biol*. 2023 Dec 1;21(1).
58. Sorbini M, Carradori T, Togliatto GM, Vaisitti T, Deaglio S. Technical Advances in Circulating Cell-Free DNA Detection and Analysis for Personalized Medicine in Patients' Care. Vol. 14, Biomolecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
59. Pan Y, Shao S, Sun H, Zhu H, Fang H. Bile-derived exosome noncoding RNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers for cholangiocarcinoma. *Front Oncol*. 2022 Aug 24;12.

60. Andrade R, Ribeiro IP, Carreira IM, Tralhão JG. The Diagnostic and Prognostic Potentials of Non-Coding RNA in Cholangiocarcinoma. Vol. 25, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
61. Laschos K, Lampropoulou DI, Aravantinos G, Piperis M, Filippou D, Theodoropoulos G, et al. Exosomal noncoding RNAs in cholangiocarcinoma: Laboratory noise or hope? *World J Gastrointest Surg.* 2020 Oct 27;12(10):407–24.
62. Pan Y, Shao S, Sun H, Zhu H, Fang H. Bile-derived exosome noncoding RNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers for cholangiocarcinoma. *Front Oncol.* 2022 Aug 24;12.
63. Sun C, Zhu J, Wu B, Chen J, Zhu Z, Cai P, et al. Diagnostic and prognostic value of microRNAs in cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:2125–39.
64. Likhitrattanapisal S, Kumkate S, Ajawatanawong P, Wongprasert K, Tohtong R, Janvilisri T. Dysregulation of microRNA in cholangiocarcinoma identified through a meta-analysis of microRNA profiling. *World J Gastroenterol.* 2020 Aug 7;26(29):4356–71.
65. Selaru FM, Olaru A V., Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, et al. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology.* 2009 May;49(5):1595–601.
66. Sun C, Zhu J, Wu B, Chen J, Zhu Z, Cai P, et al. Diagnostic and prognostic value of microRNAs in cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2018;10:2125–39. Available from: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S158155>
67. Hu J, Wang YN, Song DJ, Tan JP, Cao Y, Fan J, et al. A high-accuracy model based on plasma mirnas diagnoses intrahepatic cholangiocarcinoma: A single center with 1001 samples. *Diagnostics.* 2021;11(4).
68. Jiang W, Deng X, Zhu T, Wei Y, Lei Z, Guo M, et al. Identification of cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis via the combination of miRNA and ultrasound. *Cancer Manag Res.* 2020;12:1845–53.
69. Meijer LL, Puik JR, Le Large TYS, Heger M, Dijk F, Funel N, et al. Unravelling the diagnostic dilemma: A microrna panel of circulating MIR-16 and MIR-877 as a diagnostic classifier for distal bile duct tumors. *Cancers (Basel).* 2019 Aug 1;11(8).
70. Supradit K, Prasopdee S, Phanaksri T, Tangphatsornruang S, Pholhelm M, Yusuk S, et al. Differential circulating miRNA profiles identified miR-423-5p, miR-93-5p, and miR-4532 as potential biomarkers for cholangiocarcinoma diagnosis. *PeerJ.* 2024;12(12).
71. Dufourd T, Robil N, Mallet D, Carcenac C, Boulet S, Brishoual S, et al. Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. *Biol Methods Protoc.* 2019 Dec 27;4(1).
72. Salem PES, Ghazala RA, El Gendi AM, Emara DM, Ahmed NM. The association between circulating MicroRNA-150 level and cholangiocarcinoma. *J Clin Lab Anal.* 2020 Nov 1;34(11).

73. Wang LJ, Zhang KL, Zhang N, Ma XW, Yan SW, Cao DH, et al. Serum miR-26a as a diagnostic and prognostic biomarker in cholangiocarcinoma. These authors have contributed equally to this work [Internet]. Vol. 6, *Oncotarget*. 2015. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
74. Voigtländer T, Gupta SK, Thum S, Fendrich J, Manns MP, Lankisch TO, et al. MicroRNAs in serum and bile of patients with primary sclerosing cholangitis and/or cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2015 Oct 2;10(10).
75. Loosen SH, Lurje G, Wiltberger G, Vucur M, Koch A, Kather JN, et al. Serum levels of miR-29, miR-122, miR-155 and miR-192 are elevated in patients with cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2019 Jan 1;14(1).
76. Orzan RI, Țigu AB, Nechita VI, Nistor M, Agoston R, Gonciar D, et al. Circulating miR-18a and miR-532 Levels in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Clin Med*. 2024 Oct 1;13(20).
77. Kuniyoshi N, Imazu H, Masuzaki R, Yamazaki M, Hamana S, Nomura S, et al. Diagnostic utility of quantitative analysis of microRNA in bile samples obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography for malignant biliary strictures. *PLoS One*. 2023 Aug 1;18(8 AUGUST).
78. Liu DSK, Puik JR, Venø MT, Mato Prado M, Rees E, Patel BY, et al. MicroRNAs as Bile-based biomarkers in pancreaticobiliary cancers (MIRABILE): a cohort study. *International Journal of Surgery*. 2024 Oct 23;
79. Mato Prado M, Puik JR, Castellano L, López-Jiménez E, Liu DSK, Meijer LL, et al. A bile-based microRNA signature for differentiating malignant from benign pancreaticobiliary disease. Vol. 12, *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2023.
80. Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
81. Yu W, Hurley J, Roberts D, Chakraborty SK, Enderle D, Noerholm M, et al. Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. Vol. 32, *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 466–77.
82. Yu J, Ostowari A, Gonda A, Mashayekhi K, Dayyani F, Hughes CCW, et al. Exosomes as a Source of Biomarkers for Gastrointestinal Cancers. Vol. 15, *Cancers*. MDPI; 2023.
83. Drula R, Ott LF, Berindan-Neagoe I, Pantel K, Calin GA. MicroRNAs from liquid biopsy derived extracellular vesicles: Recent advances in detection and characterization methods. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020. p. 1–24.
84. Yoshida M, Yukawa H, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Hori Y, et al. Clinical impact of bile-derived exosomal microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers for biliary tract cancers. *Cancer Sci*. 2023 Jan 1;114(1):295–305.

85. Han JY, Ahn KS, Kim YH, Kim TS, Baek WK, Suh S Il, et al. Circulating micrnas as biomarkers in bile-derived exosomes of cholangiocarcinoma. *Ann Surg Treat Res.* 2021 Sep 1;101(3):140–50.
86. Shen L, Chen G, Xia Q, Shao S, Fang H. Exosomal miR-200 family as serum biomarkers for early detection and prognostic prediction of cholangiocarcinoma [Internet]. Vol. 12, *Int J Clin Exp Pathol.* 2019. Available from: www.ijcep.com/
87. Supradit K, Wongprasert K, Tangphatsornruang S, Yoocha T, Sonthirod C, Pootakham W, et al. microRNA profiling of exosomes derived from plasma and their potential as biomarkers for *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Acta Trop.* 2024 Oct 1;258.
88. Shen L, Chen G, Xia Q, Shao S, Fang H. Exosomal miR-200 family as serum biomarkers for early detection and prognostic prediction of cholangiocarcinoma [Internet]. Vol. 12, *Int J Clin Exp Pathol.* 2019. Available from: www.ijcep.com/
89. Siddika T, Heinemann IU. Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells. Vol. 8, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
90. Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic Acid Detection Using CRISPR/Cas Biosensing Technologies. *ACS Synth Biol.* 2020 Jun 19;9(6):1226–33.
91. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (1979).* 2013 Feb 15;339(6121):819–23.
92. Lau CH, Tin C, Suh Y. CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction. *Fac Rev.* 2020 Dec 4;9.
93. Song R, Chen Z, Xiao H, Wang H. The CRISPR-Cas system in molecular diagnostics. Vol. 561, *Clinica Chimica Acta.* Elsevier B.V.; 2024.
94. Verma MK, Roychowdhury S, Sahu BD, Mishra A, Sethi KK. CRISPR-based point-of-care diagnostics incorporating Cas9, Cas12, and Cas13 enzymes advanced for SARS-CoV-2 detection. Vol. 36, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* John Wiley and Sons Inc; 2022.
95. Metcalf GAD. MicroRNAs: circulating biomarkers for the early detection of imperceptible cancers via biosensor and machine-learning advances. Vol. 43, *Oncogene.* Springer Nature; 2024. p. 2135–42.
96. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020 Jul 1;38(7):870–4.
97. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (1979).* 2017 Apr 28;356(6336):438–42.
98. Qiu XY, Zhu LY, Zhu CS, Ma JX, Hou T, Wu XM, et al. Highly Effective and Low-Cost MicroRNA Detection with CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2018;7(3):807–13.

99. Wang R, Zhao X, Chen X, Qiu X, Qing G, Zhang H, et al. Rolling Circular Amplification (RCA)-Assisted CRISPR/Cas9 Cleavage (RACE) for Highly Specific Detection of Multiple Extracellular Vesicle MicroRNAs. *Anal Chem*. 2020 Jan 21;92(2):2176–85.
100. Lapitz A, Arbelaiz A, O'Rourke CJ, Lavin JL, Casta A La, Ibarra C, et al. Patients with Cholangiocarcinoma Present Specific RNA Profiles in Serum and Urine Extracellular Vesicles Mirroring the Tumor Expression: Novel Liquid Biopsy Biomarkers for Disease Diagnosis. *Cells*. 2020;9(3).
101. Zhang Z, Liu X, Peng C, Du R, Hong X, Xu J, et al. Machine Learning-Aided Identification of Fecal Extracellular Vesicle microRNA Signatures for Noninvasive Detection of Colorectal Cancer. *ACS Nano* [Internet]. 2025 Mar 3; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40033785>
102. Talap J, AL-maskri AAA, Shen M, Liu H, Jiang X, Xiao G, et al. Ultrasensitive detection of serum miRNA biomarkers related to papillary thyroid cancer using ligation-initiated phosphorothioated primer-based loop-mediated isothermal amplification. *Sens Actuators B Chem*. 2023 Jan 1;374.
103. Guo H, Chen J, Feng Y, Dai Z. A Simple and Robust Exponential Amplification Reaction (EXPAR)-Based Hairpin Template (exp-Hairpin) for Highly Specific, Sensitive, and Universal MicroRNA Detection. *Anal Chem*. 2024 Feb 13;96(6):2643–50.
104. Bai Y, Wang X, Xiang M, Mao Z, Zhang F. Artificial nanochannels for highly selective detection of miRNA based on the HCR signal amplification. *Chemical Engineering Journal*. 2024 May 15;488.
105. Feng X, Yang K, Feng Z, Xie Y, Han W, Chen Q, et al. Selective and sensitive detection of miRNA-198 using single polymeric microfiber waveguide platform with heterogeneous CHA amplification strategy. *Talanta*. 2022 Apr 1;240.
106. Huang Q, Wang K, Wang Y. Highly sensitive miRNA-21 detection with enzyme-free cascade amplification biosensor. *Talanta*. 2024 Jun 1;273.
107. Fan T, Mao Y, Liu F, Zhang W, Lin JS, Yin J, et al. Label-free fluorescence detection of circulating microRNAs based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling coupled with rolling circle amplification. *Talanta*. 2019 Aug 1;200:480–6.
108. Chi Z, Wu Y, Chen L, Yang H, Khan MR, Busquets R, et al. CRISPR-Cas14a-integrated strand displacement amplification for rapid and isothermal detection of cholangiocarcinoma associated circulating microRNAs. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2022;1205:339763. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339763>
109. Zhou M, Li C, Wei R, Wang H, Jia H, Yan C, et al. Exponential Amplification-Induced Activation of CRISPR/Cas9 for Sensitive Detection of Exosomal miRNA. *Anal Chem*. 2024 Mar 12;96(10):4322–9.

110. Wang L, Pu G, Liu T, Chen G, Li H, Amuda TO, et al. Parasite-derived microRNA let-7-5p detection for metacestodiasis based on rolling circular amplification-assisted CRISPR/Cas9. *FASEB Journal*. 2024 May 31;38(10).
111. Zhang M, Wang H, Wang H, Wang F, Li Z. CRISPR/Cas12a-Assisted Ligation-Initiated Loop-Mediated Isothermal Amplification (CAL-LAMP) for Highly Specific Detection of microRNAs. *Anal Chem*. 2021 Jun 8;93(22):7942–8.
112. Chen P, Wang L, Qin P, Yin BC, Ye BC. An RNA-based catalytic hairpin assembly circuit coupled with CRISPR-Cas12a for one-step detection of microRNAs. *Biosens Bioelectron*. 2022 Jul 1;207.
113. Yan H, Wen Y, Tian Z, Hart N, Han S, Hughes SJ, et al. A one-pot isothermal Cas12-based assay for the sensitive detection of microRNAs. *Nat Biomed Eng*. 2023 Dec 1;7(12):1583–601.
114. Zhang Y, Su R, Zhang Z, Jiang Y, Miao Y, Zhou S, et al. An ultrasensitive one-pot Cas13a-based microfluidic assay for rapid multiplexed detection of microRNAs. *Biosens Bioelectron*. 2025 Apr 15;274.
115. Zhang Q, Zhang X, Zou X, Ma F, Zhang CY. CRISPR/Cas-Based MicroRNA Biosensors. Vol. 29, *Chemistry - A European Journal*. John Wiley and Sons Inc; 2023.
116. Lee J, Jeong C. Single-molecule perspectives of CRISPR/Cas systems: target search, recognition, and cleavage. Vol. 58, *BMB reports*. 2025. p. 8–16.
117. Sahel DK, Giriprasad G, Jatyan R, Guha S, Korde A, Mittal A, et al. Next-generation CRISPR/Cas-based ultrasensitive diagnostic tools: current progress and prospects. Vol. 14, *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry; 2024. p. 32411–35.
118. Uijterwijk BA, Lemmers DH, Fusai GK, Groot Koerkamp B, Koek S, Zerbi A, et al. Different Periapillary Types and Subtypes Leading to Different Perioperative Outcomes of Pancreatoduodenectomy: Reality and Not a Myth; An International Multicenter Cohort Study. *Cancers (Basel)*. 2024 Mar 1;16(5).

PASTABOS

Tyrimo rezultatai buvo ir bus pristatomi tarptautinėse konferencijose (žr. 49-51 lapus):

- 1) “Improving Diagnostic Precision in Distal Cholangiocarcinoma with CRISPR/Cas9” - Akademinės Chirurgijos kongresas (angl. *Academic Surgical Congress, ASC*), 2025.02.11-13 d., Las Vegase, Jungtinėse Amerikos valstijose.
<https://www.mf.vu.lt/apie-mf/naujienos/33-bendros-naujienos/4759-mf-studente-agne-sidabraite-pristate-inovatyvu-tyrima-akademines-chirurgijos-kongrese-jungtinese-amerikos-valstijose>
- 2) “Advancing Cholangiocarcinoma Diagnosis: The Role of Liquid Biopsy and CRISPR/Cas Systems in Biomarker Detection” - Europos hepatopankreatobiliarinės asociacijos kongresas E-AHPBA 2025 (angl. *European Hepato-Pancreato-Biliary Association, E-AHPBA 2025*) 2025.06.10-12 d., Dubline, Airijoje.

academic surgical congress abstracts archive (<https://www.asc-abstracts.org/>)

The very best in surgical science

ASC 2024 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/)	ASC 2023 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2023-searchable-abstracts/)
ASC 2022 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2022-searchable-abstracts/)	ASC 2021 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2021-searchable-abstracts/)
ASC 2020 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2020-searchable-abstracts/)	ASC 2019 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2019-searchable-abstracts/)
ASC 2018 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2018-searchable-abstracts/)	ASC 2017 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2017-searchable-abstracts/)
ASC 2016 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2016-searchable-abstracts/)	ASC 2015 Abstracts (https://www.asc-abstracts.org/asc-2015-searchable-abstracts/)

2025 Academic Surgical Congress Session Presentation

Congratulations!

Your abstract: **Improving Diagnostic Precision in Distal Cholangiocarcinoma with CRISPR/Cas9**, has been **accepted** as a **Quickshot Presentation** at the 20th Annual Academic Surgical Congress (ASC).

The 20th Annual Academic Surgical Congress (ASC) will take place February 11-13, 2025 in Las Vegas, NV.

Your abstract is scheduled for presentation in the following session:

Session Title: 1 - Basic Science: Multidisciplinary Quickshot Session I

Session Day: Tuesday, February 11, 2025

Session Time: 7:30 AM - 9:45 AM (Pacific Time)

Presenter: Agne Sidabraitė

We cannot adjust presentation order or move your presentations to other sessions/days to accommodate travel arrangements. Please plan your travel arrangements accordingly and plan to be in your session for the entirety of the session.

Quickshot presentations are limited to 3 minutes with a maximum of 5 slides and 2 minutes for discussion. (Disclosure slide and title slide do not count towards the slide maximum for Quickshot presentations)

To change your reply or presenter you must now contact abstract-reply@academicsurgicalcongress.org (mailto:abstract-reply@academicsurgicalcongress.org?subject=2025%20Abstract%20Control%20Number%3A%20ASC20252938)

Let the AAS know about your accomplishment! Post on X! (<https://x.com/share?&text=My%20abstract%20was%20accepted%20for%20presentation%20at%20the&url=https://academicsurgicalcongress.org>)

Let the SUS know about your accomplishment! Post on X! (<https://x.com/share?&text=My%20abstract%20was%20accepted%20for%20presentation%20at%20the&url=https://academicsurgicalcongress.org>)

Presentation Uploading Instructions

In preparation for your upcoming presentation during the 2025 Academic Surgical Congress, please review the important Audio/Visual information provided below.

NEW: You will no longer have access to the online presentation upload website after Saturday, February 8, 2025 @ 5:00 PM EST. The only way to upload a presentation after the site is closed is through the Speaker Ready Room, located in **The Parlor Room**.

Hotel Reservation Scam

We would like to make you aware of a situation that has been affecting conferences nationwide. There are companies (Convention Housing Services, Global Housing, Global Travel, etc.) who claim to be the official housing bureau and ask to "assist" you with hotel reservations. They may disguise themselves as part of the ASC or may claim to represent the conference hotel. They may note they can get better rates, the room block is filled, or uses other sales pitch methods. They are **NOT** the official housing bureau nor affiliated with ASC.

If you receive a call from any company claiming to represent the ASC or Virgin Hotels Las Vegas, be aware that this is probably a scam and **do not make the reservation or provide your credit card information.**

If you are contacted by any such company, please ask for the company name, phone number, address, and contact who called (email if possible) and to send it to rebecca@academicsurgicalcongress.org (<mailto:rebecca@academicsurgicalcongress.org?subject=ASC%20Hotel%20Reservation%20Scam>)

Conference Registration Scam Warning

Scam Emails have been sent to attendees or exhibitors asking them to provide Credit Card Information via Docusign. ASC does not send emails asking for your credit card details or send Docusign links for conference attendees. **Conference Registration is only through the ASC Registration Website.** Any payments, if applicable, go through the Registration Website linked on this page.

If you are ever unsure, contact registrations@academicsurgicalcongress.org (<mailto:registrations@academicsurgicalcongress.org?subject=ASC%20Conference%20Registration%20Scam>) or call 310-986-6444 ext. 128.

If you have any questions or need any assistance, please contact:

Rebecca Cranor, Senior Meeting Planner; Phone: 310-986-6444 x158

Email: rebecca@academicsurgicalcongress.org (<mailto:rebecca@academicsurgicalcongress.org>)

Abstract

IMPROVING DIAGNOSTIC PRECISION IN DISTAL CHOLANGIOCARCINOMA WITH CRISPR/CAS9

A. Sidabraitė¹, U. Ahmed², S.K. Jones², A.K. Gulla³ ¹Vilnius University, Faculty Of Medicine, Vilnius, VILNIUS, Lithuania ²Vilnius University, VU LSC-EMBL Partnership For Genome Editing Technologies, Life Sciences Center, Vilnius, VILNIUS, Lithuania ³Vilnius University, Faculty Of Medicine, Institute Of Clinical Medicine, Vilnius, VILNIUS, Lithuania

Introduction: Cholangiocarcinoma (CCA) includes heterogeneous tumours with complex diagnoses, management, and poor prognoses. Diagnosing distal CCA (dCCA) is particularly challenging in clinical cases where it presents a diagnostic dilemma due to its clinical and imaging similarities to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and benign diseases. Current diagnostic methods are inadequate, necessitating the development of more sensitive, specific, and non-invasive biomarker detection techniques. MicroRNAs show promise as biomarkers, and innovative approaches like CRISPR/Cas9-mediated detection may enhance diagnostic capabilities.

Methods: We propose using Rolling Circle Amplification (RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage (RACE) to detect miRNA-16 and miRNA-877 panel in exosomes derived from plasma samples. Exosomes will be isolated from patients with CCA, PDAC, benign diseases, and healthy controls. The miRNAs will be analyzed using RACE and results will be compared to those obtained via reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The RACE method involves two key steps: replication, where a long double-stranded DNA (dsDNA) assembly is generated through the interaction between the padlock probe with the PAM domain and the target miRNA; and detection, where the sgRNA/Cas9 complex cleaves the dsDNA, leading to a measurable fluorescence signal.

Results: We anticipate that RACE will exhibit superior sensitivity and specificity compared to RT-qPCR, or at least show high consistency, while offering advantages in processing time and cost-effectiveness.

Conclusion: RACE technology has the potential to significantly improve miRNA detection, offering clinicians a robust tool for differentiating dCCA from other diseases with similar clinical and radiological presentations. This method could reduce the reliance on invasive biopsies, ultimately enhancing patient outcomes through earlier and more accurate diagnosis.



Abstract Confirmation

E-AHPBA 2025

Preview

Reference:	AS-EAHPBA-2025-00575
Title:	Advancing Cholangiocarcinoma Diagnosis: The Role of Liquid Biopsy and CRISPR/Cas Systems in Biomarker Detection
Preferred presentation type:	Poster presentation
Authors:	A. Sidabraitė ¹ , P. Mosert ¹ , U. Ahmed ² , S.K. Jones Jr. ² , A. Gulla ³ ¹ Vilnius University Faculty of Medicine, Vilnius, Lithuania, ² Vilnius University Life Sciences Center, VU LSC-EMBL Partnership for Genome Editing Technologies, Vilnius, Lithuania, ³ Vilnius University Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine, Vilnius, Lithuania
Topic: *	3: Biliary
Abstract body	
Text: *	Introduction: Cholangiocarcinoma (CCA) is a heterogeneous group of tumors that is characterized by challenging and inaccurate diagnosis, leading to late detection and poor prognosis. With this review we aim to analyse the limitations of current diagnostics and examine the potential of liquid biopsy and CRISPR/Cas systems to improve the accuracy of diagnosis. Method: This literature review evaluates the effectiveness of liquid biopsy combined with CRISPR/Cas systems based on biomarker detection in diagnosing Cholangiocarcinomas. Research was conducted in major databases like PubMed and MDPI, focusing on articles published from 2018 to 2024 using relevant keywords. Results: Current non-invasive CCA biomarkers, such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9), and carbohydrate antigen 125 (CA 125), often lack sensitivity and specificity. Due to deviations in accuracy, the diagnosis must be confirmed by invasive histopathological biopsy procedures, which pose significant risks to the patient. The current challenges express the need for innovative diagnostic approaches. Liquid biopsy is a promising method in distinguishing between CCA tissues and healthy tissues with a high sensitivity (95%) and specificity (100%) by detecting biomarkers like micro-RNAs (miRNAs). Incorporating CRISPR/Cas systems shows enhancement in the rapid and cost-efficient detection of CCA biomarkers. Conclusion: The introduction of LB combined with CRISPR/Cas systems could potentially revolutionize early and accurate diagnosis of CCA and therefore advance the overall management strategy. However, this method is still under development and requires further testing before the introduction into routine diagnostics.
Conflict of interest to declare?: *	I and/or the Additional Authors have no disclosures to make
1. I confirm that the abstract and all the information is correct.: *	Yes
2. I confirm that the abstract constitutes consent to publication.: *	Yes
3. I confirm that I submit this abstract on behalf of all authors.: *	Yes
4. I herewith confirm that my abstract has not been previously published and/or previously presented at E-AHPBA.: *	Yes
5. Submission of your abstract constitutes your consent to transfer the abstract to an alternative theme/session if the Scientific Programme Committee considers this to be more appropriate.: *	Yes
7. I confirm that I have read and accept the privacy policy .: *	Yes

