

Molekularna dijagnostika i ciljano liječenje karcinoma debelog crijeva

Primorac, Korina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:199179>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Korina Primorac

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA I CILJANO LIJEČENJE
KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

Završni rad

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Korina Primorac

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA I CILJANO LIJEČENJE
KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

**MOLECULAR DIAGNOSTICS AND TARGETED
TREATMENT OF COLON CANCER**

Završni rad/Bachelor's thesis

Mentor:

Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Split, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Molekularna dijagnostika i ciljano liječenje karcinoma debelog crijeva

Korina Primorac, 0346011256:

Sažetak

Cilj: Cilj ovog rada je prikazati molekularno testiranje kojim se utvrđuje status gena KRAS, NRAS i BRAF kao prediktivnih biomarkera kod pacijenata s karcinomom debelog crijeva radi primjene ciljane terapije u njihovu liječenju.

Materijal i metode: Materijal koji se koristi za analizu je tumorsko tkivo pacijenta. Opisan je postupak izolacije DNA, mjerenja koncentracije DNA te umnožavanje DNA uz pomoć komercijalno dostupnih kitova.

Rezultati: Rezultati koji se dobiju metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) obrađuju se softverski, a potom se analiziraju postojeće mutacije u uzorku pacijenta.

Zaključak: U ovom radu prikazana je važnost molekularnog testiranja gena KRAS, NRAS i BRAF kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom u svrhu primjene ciljane terapije. Kako bi se provela analiza i utvrdila prisutnost mutacija, potrebno je iz uzorka tumorskog tkiva izolirati DNA, odrediti njenu koncentraciju, a zatim ju umnožiti.

Ključne riječi: karcinom debelog crijeva; KRAS; NRAS; BRAF; personalizirano liječenje

Rad sadrži: 37 stranica, 6 tablica, 15 slika i 25 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović
2. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk Jeličić
3. Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Datum obrane: 17. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

University Department of Health Studies

Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health

Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Molecular diagnostics and targeted treatment of colon cancer

Korina Primorac, 0346011256:

Summary

Objectives: The aim of this paper is to present molecular testing that determines the status of KRAS, NRAS and BRAF genes as predictive biomarkers in patients with colon cancer for the purpose of applying targeted therapy in their treatment.

Material and methods: The material used for analysis is the patient's tumor tissue. The procedure for DNA isolation, measurement of DNA concentration and DNA amplification with the help of commercially available kits is described.

Results: The results obtained by the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method are processed by software, and then the existing mutations in the patient's sample are analysed.

Conclusion: This paper shows the importance of molecular testing of KRAS, NRAS and BRAF genes in patients with colorectal cancer for the purpose of applying targeted therapy. In order to carry out the analysis and determine the presence of mutations, it is necessary to isolate DNA from the tumor tissue sample, determine its concentration, and then multiply it.

Key words: colon cancer; KRAS; NRAS; BRAF; personalized medicine

Thesis contains: 37 pages, 6 tables, 15 figures and 25 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović
2. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk Jeličić
3. Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Defense date: July 17th, 2023

SADRŽAJ

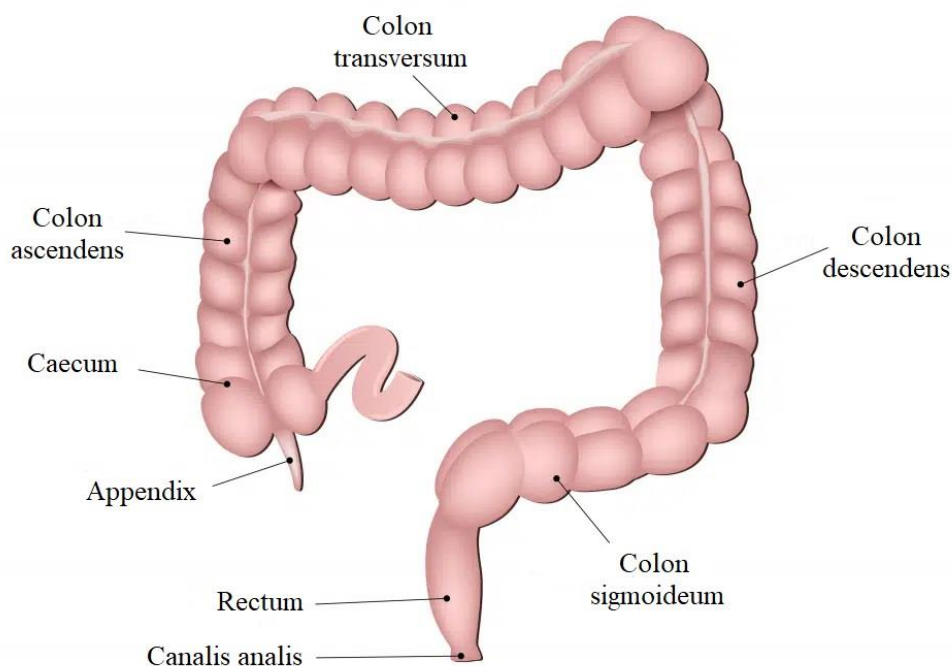
| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Debelo crijevo..... | 1 |
| 1.2. Karcinogeneza..... | 3 |
| 1.3. Karcinom debelog crijeva..... | 4 |
| 1.4. Personalizirana medicina..... | 7 |
| 1.5. Molekularno testiranje gena u karcinomu debelog crijeva..... | 8 |
| 1.5.1. Gen <i>KRAS</i> | 9 |
| 1.5.2. Gen <i>NRAS</i> | 11 |
| 1.5.3. Gen <i>BRAF</i> | 11 |
| 2. CILJ RADA | 13 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 14 |
| 3.1. Materijal..... | 14 |
| 3.2. Metode..... | 15 |
| 3.2.1. Izolacija DNA..... | 15 |
| 3.2.2. Kvantifikacija DNA..... | 16 |
| 3.2.3. Umnožavanje DNA..... | 18 |
| 4. REZULTATI | 22 |
| 4.1. <i>KRAS</i> mutacijski test (LSR)..... | 22 |
| 4.2. <i>BRAF/NRAS</i> mutacijski test (LSR)..... | 24 |
| 5. RASPRAVA | 26 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 6. ZAKLJUČAK..... | 27 |
| 7. LITERATURA..... | 28 |
| 8. ŽIVOTOPIS..... | 31 |

1. UVOD

1.1. Debelo crijevo

Debelo crijevo (lat. *intestinum crassum*) započinje ilealnim ušćem, a završava analnim otvorom. Građeno je od četiri dijela, a to su: slijepo crijevo (lat. *caecum*), obodno crijevo (lat. *colon*), ravno crijevo (lat. *rectum*) i analni kanal (lat. *canalis analis*). Nadalje, obodno crijevo je građeno od četiri dijela: uzlaznog (lat. *colon ascendens*), poprečnog (lat. *colon transversum*), silaznog (lat. *colon descendens*) i sigmoidnog dijela (lat. *colon sigmoideum*) (Slika 1). (1)



Slika 1. Anatomija debelog crijeva

Izvor: <https://teachmeanatomy.info/abdomen/gi-tract/colon/>

Slijepo crijevo se nalazi u desnoj bočnoj udubini, a distalno se proteže u uzlazni dio debelog crijeva. Uzlazni dio započinje u ravnini gdje ileum ulazi u debelo crijevo, proteže se prema gore u desnom lateralnom trbušnom području, te u zavoju prelazi u poprečni dio debelog crijeva. Poprečni dio se proteže do donjeg pola slezene, a potom u zavoju prelazi u silazni dio, koji je lokaliziran u lijevom lateralnom trbušnom području. Nastavlja se u sigmoidni dio debelog crijeva koji u visini trećeg križnog kralješka prelazi u ravno crijevo. (1)

Stijenku debelog crijeva čini više slojeva: sluznica, submukoza, mišićni sloj i seroza. Ovi slojevi doprinose pokretljivosti debelog crijeva. (2)

Sluznica debelog crijeva obložena je Lieberkühnovim kriptama, ali se u njoj ne nalaze resice, kao što je slučaj u tankom crijevu. Epitelne stanice luče samo sluz i uopće ne sadržavaju probavne enzime. Sluz štiti stijenku debelog crijeva od oštećenja i bakterijskih aktivnosti u fecesu te služi za povezivanje fekalne mase. Sluznica također sadrži hidrogenkarbonatne ione koje izlučuju epitelne stanice, pri čemu se istovremeno apsorbiraju kloridni ioni. Na taj način se neutraliziraju kiseli proizvodi nastali bakterijskom aktivnošću. (3)

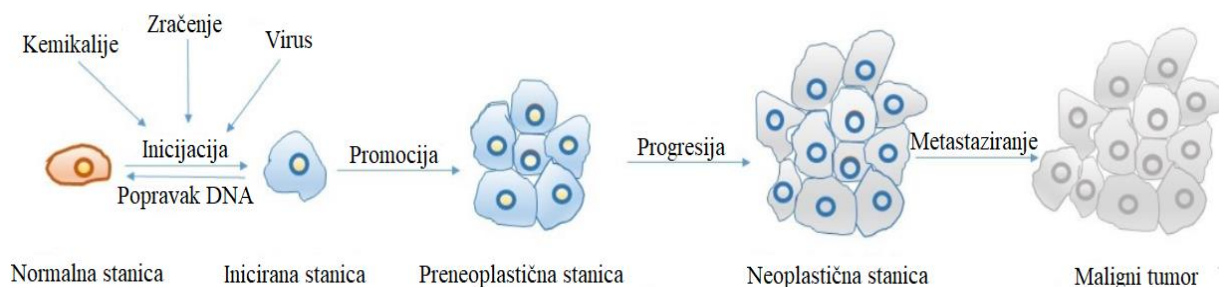
Glavne funkcije debelog crijeva su apsorpcija vode i elektrolita iz himusa te stvaranje čvrstog fecesa, kao i pohrana fekalnih masa sve do njihova izbacivanja iz organizma. Apsorpcija se odvija u proksimalnoj polovini debelog crijeva, a pohrana u distalnoj polovini. U slijepo crijevo svakodnevno dospije između 1,5 i 2 L himusa, pri čemu se iz organizma izbacuje samo 80 do 200 mL fecesa. (3)

1.2. Karcinogeneza

Patološke tvorbe koje nastaju zbog prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica i nadmašuju rast normalnih stanica nazivaju se tumori. Dije se na benigne i maligne. Benigni tumori značajno ne narušavaju zdravlje. Ograničeni su na organ u kojem su nastali i ne metastaziraju. Za razliku od njih, maligni tumori imaju lošiju prognozu i šire se po tijelu. (4)

Metastaziranje je proces u kojem tumorske stanice iz primarnog tkiva migriraju u druge dijelove tijela. Za ovaj proces neophodna je angiogeneza, odnosno stvaranje novih krvnih žila od već postojećih. Na ovaj način se osigurava preživljavanje i rast tumora. (5)

Maligni tumor se razvija kroz četiri stadija: inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje. Prvi stadij je inicijacija u kojoj iz jedne zloćudno preobražene stanice nastaje klon takvih stanica. Slijedi promocija koja ovisi o kancerogenim čimbenicima i njihovoj količini. Neki od kancerogena su zračenje, virus i kemikalije. Progresija je stadij u kojem nastaju genomske promjene i započinje stvaranje primarnog tumora. Posljednji stadij je metastaziranje u kojem tumorske stanice migriraju u okolna tkiva (Slika 2). (6)



Slika 2. Proces karcinogeneze

Izvor:

https://chem.libretexts.org/Courses/Maryville_College/Essential_Chemistry_for_Poisons_Potions_and_Pharmaceuticals/09%3A_Poisons/9.06%3A_Carcinogens_and_Teratogens

Vogelstein je objasnio model karcinogeneze u kojem je opisana progresija benignog adenoma u maligni karcinom. Dokazao je da tumor nastaje kao posljedica genetskih promjena koje rezultiraju rastom i proliferacijom stanica, te klonalnim razvojem tumora. Procesi koji dovode do nastanka karcinoma su aktivacija onkogeni, inaktivacija tumor supresorskog gena, kromosomska i mikrosatelitna nestabilnost. (7)

Protoonkogeni su geni koji kodiraju proteine koji sudjeluju u staničnoj diobi te imaju veliku ulogu u kontroli proliferacije i preživljenja stanice. Mutacijom se mogu pretvoriti u onkogene koji uzrokuju pretvorbu normalnih stanica u tumorske stanice. Rezultat toga je gubitak kontrole rasta i nekontrolirano dijeljenje stanica. Onkogeni nastaju na više načina: točkastim mutacijama, translokacijama, insercijom virusnog gena i prekomjernim izražavanjem. (4)

Tumor supresorski geni su geni koji zaustavljaju rast tumora. Djeluju kao antionkogeni i onemogućuju prekomjernu proliferaciju stanica te potiču apoptozu, odnosno programiranu staničnu smrt. Normalne stanice se transformiraju u tumorske ukoliko se ovi geni izgube delecijom ili prestanu funkcionirati. (4)

1.3. Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva jedan je od češćih u svijetu i čini 90% malignih tumora debelog crijeva. Njegova incidencija je u stalnom porastu. Najčešće se javlja od 60. do 79. godine života, a u manje od 20% slučajeva se javlja kod osoba mlađih od 50 godina. Kod mlađih osoba obično nastaje kao posljedica određenih prekanceroznih stanja, kao što su ulcerozni kolitis ili sindrom obiteljske adenomatozne polipoze. (4)

Stope incidencije i mortaliteta u Hrvatskoj slične su vrijednostima u razvijenim dijelovima svijeta. Registar za rak Republike Hrvatske prati broj novih slučajeva. U 2020. godini karcinom kolona bio je na trećem mjestu po učestalosti kod muškaraca (10% svih tumora) iza karcinoma prostate i pluća, te treći kod žena (8% svih tumora) iza karcinoma dojke i pluća. (8)

Rizik za nastanak tumora povećava se u starijoj životnoj dobi, uglavnom nakon 50. godine, a vršak incidencije doseže otprilike u 75. godini. Osim toga, rizični čimbenici su i upalne bolesti debelog crijeva, od kojih se ističe ulcerozni kolitis, te prethodno operirani karcinomi debelog crijeva i genetički čimbenici. (4)

Incidencija karcinoma debelog crijeva povezana je i sa ekonomskim razvojem ili „zapadnjačkim stilom života“. Pretilost, smanjena tjelesna aktivnost, konzumacija alkohola i duhana su također važni rizični čimbenici. Nedavna istraživanja su utvrdila da su hiperinzulinemija i diabetes mellitus tip II izravno povezani s nastankom karcinoma debelog crijeva. Zaštitnu ulogu imaju: vitamini C i E, karotenoidi, selen i hrana bogata vlaknima. (9)

Najveći broj karcinoma debelog crijeva nastaje iz adenoma, a taj slijed se naziva adenomsko-karcinomskim slijedom. Postoje urođena stanja koja su povezana sa visokim rizikom nastanka kolorektalnog karcinoma, a to su sindrom urođenih ravnih adenoma i sindrom urođenog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (Lynchov sindrom), te obiteljska adenomatozna polipoza.

Svi karcinomi debelog crijeva se šire u okolne strukture izravno kroz crijevnu stijenku i metastaziraju kroz limfne i krvne žile. Najprije se širi u limfne čvorove, zatim po peritoneju, te portalnom venom u jetru. Nisko smješteni rektalni karcinomi se šire donjom šupljom venom u pluća. Kasnije može doći do metastaziranja i u druge organe. (4)

Stadij bolesti se određuje prema TNM klasifikaciji iz 2009. T označava tumor, N limfni čvor i regionalne metastaze, a M udaljene metastaze (Tablica1).

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma debelog crijeva

| | |
|---------|------------------------------------|
| T1 – T4 | Dubina invazije |
| N0 | Limfni čvorovi negativni |
| N1 | Metastaze u 1 – 3 limfna čvora |
| N2 | Metastaze u više od 3 limfna čvora |
| M0 | Nema udaljenih metastaza |
| M1 | Prisutne udaljene metastaze. |

Izvor: <https://hrcak.srce.hr/154167>

Također se koristi histološka klasifikacija prema postojanju tumora, limfnih čvorova i metastaza. Klasifikaciju koja se najčešće koristi predložio je 1932. Cuthbert Dukes. Dopunjena je Astler-Collerovom klasifikacijom s podskupinama B1 i C1 (Tablica2).

Tablica 2. Klasifikacija prema Dukesu; odnos proširenosti karcinoma debelog crijeva i stope preživljenja

| Klasifikacija prema Dukesu | Stopa preživljavanja |
|--|----------------------|
| A - tumor ograničen na sluznicu | 80-95 % |
| B - tumor proširen na cijelu stijenku <ul style="list-style-type: none"> • B1 tumor ograničen na mukozu i submukozu • B2 tumor zahvaća i mišićni sloj | 65 % |
| C - tumor proširen na limfne čvorove <ul style="list-style-type: none"> • C1 mišićni sloj i regionalni limfni čvorovi • C2 tumor probija cijelu stijenku crijeva i ovojnicu uz regionalne limfne čvorove | 50 % |
| D - postoje udaljene metastaze | < 0 % |

Izvor: <https://hrcak.srce.hr/154167>

Najbitniji prognostički čimbenik je proširenost tumora u vrijeme postavljanja dijagnoze. Ostali čimbenici koji ukazuju na lošu prognozu su: nalaz tumora unutar limfnih i krvnih žila, infiltrativni način rasta i slaba diferencijacija tumora.

Klinička slika pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva ovisi o lokalizaciji tumora i stupnju razvoja. Većina bolesnika u ranoj fazi nema karakteristične simptome te se oni postepeno razvijaju. Za desnostrane karcinome karakteristični su zamor, slabost i sideropenična anemija, a za lijevostrane osim sideropenične anemije i opstrukcija. Gubitak tjelesne mase i povišena temperatura upućuju na uznapredovalu bolest. (4)

Karcinom debelog crijeva se najčešće odstranjuje kirurški. Vrsta zahvata ovisi o lokalizaciji samog tumora, a osim dijela kolona, potrebno je odstraniti i krvne žile i limfne čvorove. Nakon kirurškog zahvata provodi se kemoterapija, uglavnom u stadijima B i C prema Dukesovoj klasifikaciji. Osim toga, provodi se i radioterapija te liječenje biološkim lijekovima, odnosno ciljane biološka terapija. Nakon liječenja je potrebno pratiti stanje pacijenta, što uključuje: kliničke preglede, radiološka snimanja, laboratorijske testove i mjerenje razine karcinoembrijskog antigena (CEA). (11)

1.4. Personalizirana medicina

Personalizirana medicina novi je pristup skrbi za pacijente u kojem karakteristike pojedinca, uključujući njegov genetski profil, vode kliničke odluke, s ciljem pravog liječenja za pravog pacijenta u pravo vrijeme. To je područje u medicini koje se razvija s mnogo resursa posvećenih traženju dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih biomarkera. (12)

Personalizirana medicina zauzela je važno mjesto u onkologiji. Osnovna koncepcija ovog pristupa je optimizacija terapije upotrebom precizno ciljanih lijekova, čime se izbjegavaju nuspojave i optimiziraju troškovi zdravstvene zaštite, budući da ciljane terapija smanjuje rizik od primjene neučinkovite ili štetne terapije. Koriste se

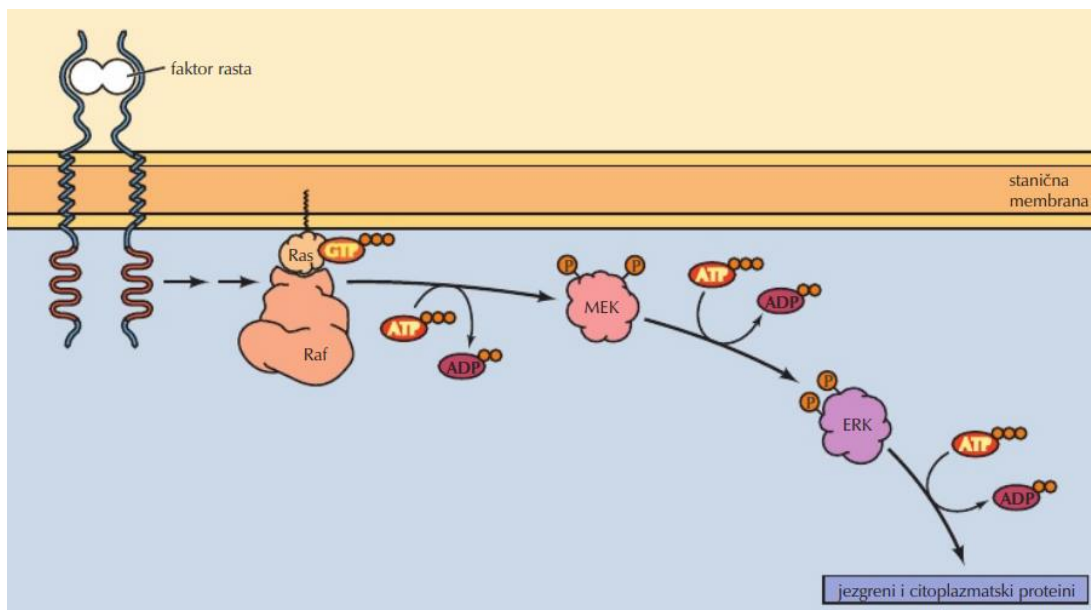
monoklonska protutijela koja dospijevaju do tumorskih stanica i nemaju učinak na zdrave stanice.

Identifikacija genetičkih promjena u stanicama tumora omogućila je bolje razumijevanje molekularnih mehanizama neoplastične transformacije, a time klasificiranje karcinoma i razvoj ciljane terapije. Stanice raka mogu se testirati primjenom DNA izolirane iz primarnih ili metastatskih tumorskih stanica ili iz stanica raka ili kancerogene DNA koja kruži u krvi pacijenta. (13)

1.5. Molekularno testiranje gena u karcinomu debelog crijeva

Molekularna testiranja se sve više koriste u probiru, dijagnostici i pri izboru terapije za liječenje malignih tumora kao što je karcinom debelog crijeva. Kontinuirano se provode istraživanja koja su usmjerena na identificiranje novih molekularnih markera. (14)

KRAS, *NRAS* i *BRAF* geni su molekularni markeri koji se analiziraju kod pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva radi primjene ciljane terapije, odnosno pametnih lijekova. Signalni put MAP-kinaze (engl. mitogen-activated protein kinases) je odgovoran za prijenos signala u svim eukariotskim stanicama i u njega su uključeni RAS i RAF proteini. Signalni put MAP-kinaze aktiviraju razni faktori rasta te spada u porodicu ERK (engl. extracellular signal-regulated kinase). Aktivirani RAS proteini aktiviraju RAF koji potom fosforilira i aktivira protein kinazu MEK (MAP kinaza/ERK kinaza). MEK zatim aktivira članove porodice ERK tako što fosforilira tirozinske i treoninske ostatke. Aktivirani ERK na kraju fosforilira ciljane proteine u citoplazmi i jezgri (Slika 3). (15)



Slika 3. Signalni put MAP-kinaze

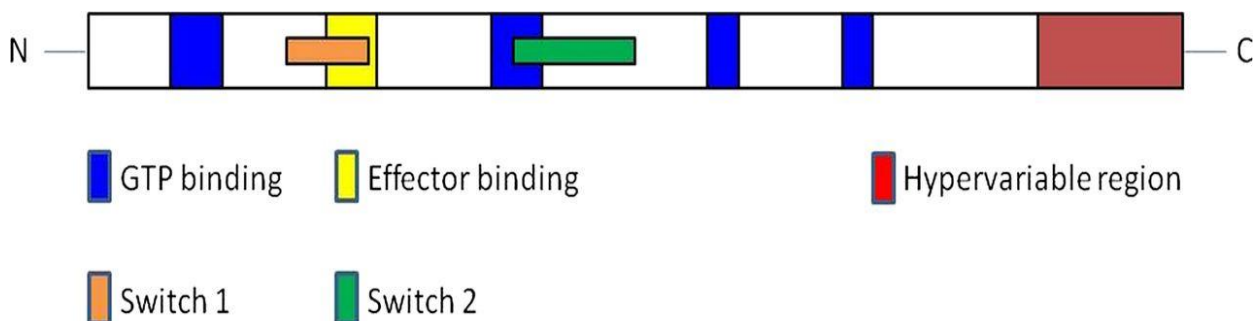
Izvor: Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010

1.5.1. Gen KRAS

Onkogeni *RAS* imaju važnu ulogu u rastu i regulaciji stanica, a njihovi proteinski produkti utječu na mnoge stanične funkcije, kao što su: stanična proliferacija, apoptoza, preživljavanje, diferencijacija i prijenos signala. Svi RAS proteini postoje u aktivnom i neaktivnom stanju. Aktiviraju se kada se obližnji transmembranski receptor veže odgovarajućim ligandom. Nakon toga slijedi unutarstanična signalna kaskada koja uključuje čimbenike izmjene gvanina koji omogućuju aktivaciju proteina zamjenom neaktivnog GDP-a s GTP-om. RAS se deaktivira kada se GTP pretvori natrag u GDP. (16)

KRAS gen nalazi se na 12. kromosomu i sastoji se od šest egzona. Kodira protein od 189 aminokiselina. Postoji u dvije varijante *KRAS 4A* i *KRAS 4B*. Sastoji se od dvije domene, a to su N-kraj i C-kraj. N-kraj sadrži vezna mjesta za GTP, efektorsko vezanje i

switch 1 i switch 2 petlje. C-kraj sadrži hipervarijabilnu regiju koja određuje posttranslacijske modifikacije. (17)



Slika 4. *KRAS* gen

Izvor: Chetty R, Govender D. Gene of the month: KRAS. *Journal of Clinical Pathology* 2013;66:548-550

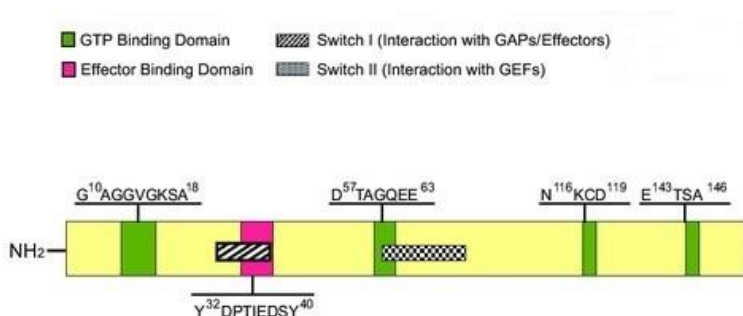
KRAS mutacije se nalaze u gotovo 40% slučajeva kolorektalnog karcinoma. Kada je *KRAS* mutiran, ostaje u GTP stanju i pridonosi aktivaciji nizvodnih signalnih puteva, što dovodi do proliferacije tumorskih stanica. Zbog toga su tumori koji nose *KRAS* mutacije povezani sa slabom diferencijacijom tumora, udaljenim metastazama i lošijom prognozom. (17)

Uglavnom se točkaste mutacije nalaze na kodonima 12, 13, 59 i 61, dok je najučestalija na kodonu 12. Najčešća promjena je prijelaz GGT u GAT. Prisutnost glicinskog ostatka u kodonu 12 je kritičan za normalno funkcioniranje *KRAS* proteina.

KRAS mutacije povezane su sa smanjenim stopama odgovora na kemoterapiju, zbog čega je status mutacije *KRAS* ključan čimbenik kada se razmatra upotreba ciljane terapije. Povezanost mutacije gena *KRAS* i odgovora na terapiju prvi je put opisana kod pacijenata s metastatskim kolorektalnim karcinomom liječenih lijekovima protiv receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR). Dokazan je smanjeni odgovor na anti-EGFR terapiju, pri čemu su pacijenti s divljim tipom *KRAS* reagirali bolje na terapiju i imali bolje ukupno preživljenje, u odnosu na pacijente koji nose mutirani *KRAS*. (16)

1.5.2. Gen NRAS

NRAS gen nalazi se na 1. kromosomu i sastoji se od šest egzona (Slika 5). Kodira protein od 189 aminokiselina. Blisko je povezan s *KRAS*-om. *NRAS* mutacije se nalaze u 3-5% slučajeva karcinoma debelog crijeva, a najviše su zastupljene u kodonu 61. (18)



Slika 5. *NRAS* gen

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Primary-structure-of-Ras-proteins-The-structure-of-Ras-proteins-includes-highly_fig2_51511925

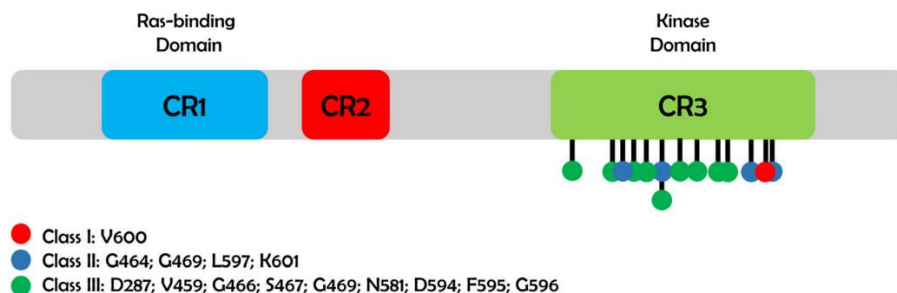
Za razliku od mutacija *KRAS*-a koje se pojavljuju u ranim fazama karcinogeneze te potiču prijelaz iz adenoma u adenokarcinom, mutacije *NRAS*-a inhibiraju apoptozu epitelnih stanica. Pacijenti s divljim tipom *NRAS*-a također imaju bolje ukupno preživljenje, u odnosu na one s mutiranim *NRAS*-om. (19)

Pacijenti s *NRAS* mutacijama koji se liječe monoklonskim anti-EGFR protutijelima imaju znatno nižu stopu odgovora i kraće ukupno preživljenje.

1.5.3. Gen BRAF

Nakon što višestruki signali aktiviraju RAS protein, posljedično se aktivira RAF protein kinaza, u koje spada *BRAF*. *BRAF* gen nalazi se na 7. kromosomu i sastoji se od

18 egzona. Kodira protein BRAF koji se sastoji od 766 aminokiselina. Sastoji se od tri regije: CR1, CR2 i CR3. CR1 i CR2 su smještene na N-kraju. CR1 je glavna vezna domena za *RAS*, a CR2 je glavna regulatorna domena. CR3 posjeduje dvije regije koje su važne za aktivaciju *RAF*-a, a to su aktivacijski segment i regulatorna regija. (20)



Slika 6. BRAF gen

Izvor: Śmiech M, Leszczyński P, Kono H, Wardell C, Taniguchi H. Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. *Genes* [Internet]. 2020 Nov 12;11(11):1342.

Do danas je dokazano više od 30 *BRAF* mutacija, pri čemu je najčešća mutacija *BRAF* V600E. U ovom slučaju dolazi do transverzije timina u adenin na poziciji 1799, zbog čega dolazi do supstitucije valina u glutamat. Ova mutacija se odvija unutar aktivirajućeg segmenta kinazne domene, te čini *BRAF* aktivnim, što povećava aktivnost kinaze u odnosu na divlji tip *BRAF*-a.

BRAF mutacije se pojavljuju u 7-10% slučajeva metastatskog karcinoma debelog crijeva. Uglavnom se pojavljuje kod žena i starijih od 70 godina, a nikako nije povezan s dobi u trenutku dijagnoze kod mlađih od 60 godina. *BRAF* mutacije se uglavnom nalaze u tumorima proksimalnog debelog crijeva i povezane su s visokom stopom peritonealnih metastaza. Važno je napomenuti da je mutirani *BRAF* snažno povezan s lošijim preživljenjem u odnosu na divlji tip *BRAF*-a. (20)

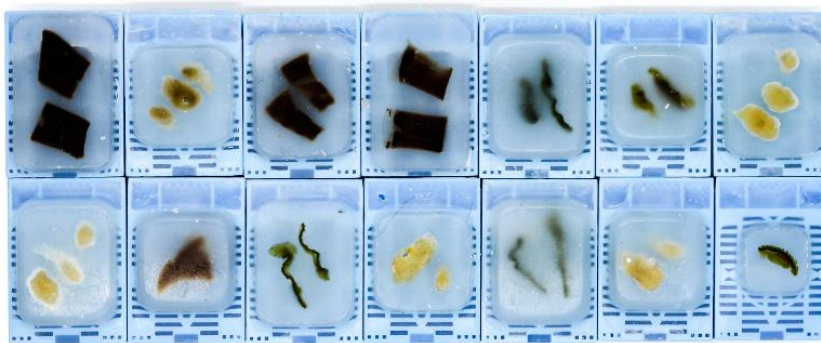
2. CILJ

Cilj ovog rada je prikazati molekularno testiranje kojim se utvrđuje status gena *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* kao prediktivnih biomarkera kod pacijenata s karcinomom debelog crijeva radi primjene ciljane terapije u njihovu liječenju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Materijal koji se koristi za molekularnu analizu *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* gena je tumorsko tkivo pacijenata s karcinomom debelog crijeva uklopljeno u parafinske blokove. Tumorsko tkivo se fiksira u formalinu i uklapa u parafinske blokove (Slika 7).



Slika 7. Parafinski blokovi

Izvor: <https://www.referencemedicine.com/our-process>

Zatim se režu rezovi debljine oko 5 mikrona koji sadrže više od 50% tumorskih stanica (Slika 8).



Slika 8. Rez na predmetnom stakalcu

Izvor: <https://www.istockphoto.com/photos/pathology-slides>

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafinski blok koristi se komplet reagensa *cobas*® *DNA Sample Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Njemačka).

Kit sadrži:

- Pufer za lizu tkiva
- Proteinazu K
- Pufer za vezanje parafina
- Pufere za ispiranje DNA
- Pufer za otapanje DNA
- Filter tubice s membranom
- Tubice za otpad



Slika 9. Kit za izolaciju DNA

Izvor: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-dna-sample-preparationkit.html>

Izolacija DNA odvija se u nekoliko koraka. Najprije je potrebno ukloniti parafin iz reza debljine 5 mikrona pomoću ksilena i etanola. Deparafinizirani uzorak se lizira inkubacijom na povišenoj temperaturi u puferu za liziranje uz dodatak proteinaze K. Zatim se dodaje izopropanol u smjesu za lizu, a centrifugiranjem se DNA veže za membranu filter tubice. Koristeći pufere za ispiranje sve nečistoće, kao što su soli i proteini uklanjaju se centrifugiranjem. Nakon izolacije određuje se kvaliteta i mjeri količina izolirane DNA. (21)

3.2.2. Kvantifikacija DNA

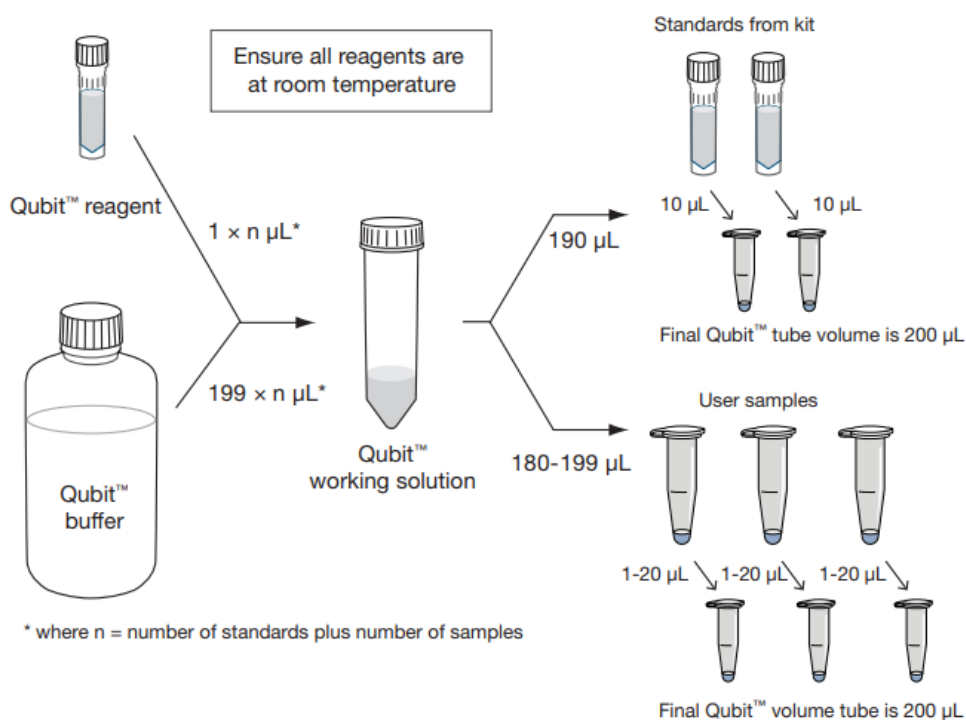
Koncentracija DNA može se odrediti pomoću uređaja Qubit fluorometer, (Thermo Fisher Scientific, SAD) na način da uređaj detektira intenzitet fluorescencije fluorescentne boje koja se veže na dvolančanu DNA (dsDNA) i ona je proporcionalna količini DNA. Pri mjerenju koncentracije koristi se kit *Qubit™ dsDNA Assay Kit* .)



Slika 10. Qubit 4.0 Fluorometer i komplet za analizu

Izvor: <https://www.fishersci.se/shop/products/qubit-4-ngs-starter-kit/15743679>

Mjerenje koncentracije radi se prema protokolu proizvođača. Prije početka mjerenja koncentracije DNA potrebno je pripremiti radnu otopinu na način da se Qubit® dsDNA HS Reagent razrijedi u Qubit® dsDNA HS Buffer-u u omjeru 1:200. U analizi se koriste dva standarda i u dvije odvojene tubice dodaje se po 10 µl standarda te 190 µl radne otopine. Za kvantifikaciju DNA koriste se vrlo mali volumeni uzorka (1-20 µl), pri čemu se prilagođava volumen radne otopine (180-199 µl). Nakon završene pripreme, tubice se inkubiraju 2 minute na sobnoj temperaturi. Potom se stavljaju u Qubit fluorometer i očitavaju rezultati (Slika 11). (22)



Slika 11. Qubit protokol

Izvor: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0017210_Qubit_4_Assays_QR.pdf

3.2.3. Umnožavanje DNA

Nakon što je DNA izolirana i izmjerena joj je koncentracija, potrebno ju je umnožiti da bi se mogla odrediti prisutnost točkastih mutacija u *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* genu.

Za analizu *KRAS* gena koristi se test KRAS Mutation Test v2 (LSR) (Roche Diagnostics Ltd, Njemačka), a za *BRAF* i *NRAS* test BRAF/NRAS Mutation Test (LSR) (Roche Diagnostics Ltd, Njemačka).

KRAS Mutation Test v2 je alel specifičan RT-PCR test koji služi za otkrivanje mutacija u *KRAS* genu u egzonima 2, 3 i 4. Ovim testom se može otkriti 28 različitih mutacija. Test za detekciju BRAF/NRAS mutacija je također RT-PCR test koji služi za otkrivanje mutacija u *BRAF* genu u egzonima 11 i 15, te u egzonima 2, 3 i 4 *NRAS* gena. Ovim testom se može otkriti 36 različitih mutacija. U spomenutim testovima koriste se početnice koje definiraju specifične sekvence parova baza određene mutacije. Ciljane *KRAS* sekvence sastoje se uglavnom od 79 - 114 parova baza, *BRAF* sekvence od 101 - 120, a *NRAS* od 94 - 121 parova baza. (23, 24)

Oba kompleta za umnožavanje i detekciju sadrže sljedeći reagense:

- master mix (MMX-1, MMX-2 and MMX-3)
- magnezijev acetat,
- kontrola-mutanta KRAS (odnosno BRAF-NRAS)
- pufer za razrjeđivanje uzorka DNA

Osim navedenih kitova potreban je i sljedeći materijal:

- reakcijske PCR-pločice s 96 jažica volumena 0,2 mLi pripadajućim folijama
- epruvete za pripremu reakcijske smjese
- pipete i nastavci za pipete različitih volumena
- sterilna voda

Prije umnažanja koncentracija svakog uzorka mora se podesiti na 2ng/μl, a to se postiže razrjeđivanjem uzoraka s puferom za razrjeđivanje. Zatim slijedi prema izračunu priprema reakcijske smjese koja sadrži master mix i magnezijev acetat:

1. Potreban volumen MMX-1 ili MMX-2 ili MMX-3 = (Broj uzoraka + pozitivna kontrola + negativna kontrola +1) x 20 μ L

2. Potreban volumen MgAc = (Broj uzoraka + pozitivna kontrola + negativna kontrola +1) x 7 μ L

U PCR pločicu se pipetira 25 μ L reakcijske smjese i 25 μ L uzorka prema točno označenom rasporedu. Pozitivne kontrole se stavljaju u jažice A01-A03, a negativne kontrole u jažice B01-B03. Razrijeđeni uzorci naciepljuju se u nizovima od tri stupca, počevši od C01-C03 do H09-H12 (Slika 12).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A | MC MMx1 | MC MMx2 | MC MMx3 | Spcmn7 MMx1 | Spcmn7 MMx2 | Spcmn7 MMx3 | Spcmn15 MMx1 | Spcmn15 MMx2 | Spcmn15 MMx3 | Spcmn23 MMx1 | Spcmn23 MMx2 | Spcmn23 MMx3 |
| B | NC MMx1 | NC MMx2 | NC MMx3 | Spcmn8 MMx1 | Spcmn8 MMx2 | Spcmn8 MMx3 | Spcmn16 MMx1 | Spcmn16 MMx2 | Spcmn16 MMx3 | Spcmn24 MMx1 | Spcmn24 MMx2 | Spcmn24 MMx3 |
| C | Spcmn1 MMx1 | Spcmn1 MMx2 | Spcmn1 MMx3 | Spcmn9 MMx1 | Spcmn9 MMx2 | Spcmn9 MMx3 | Spcmn17 MMx1 | Spcmn17 MMx2 | Spcmn17 MMx3 | Spcmn25 MMx1 | Spcmn25 MMx2 | Spcmn25 MMx3 |
| D | Spcmn2 MMx1 | Spcmn2 MMx2 | Spcmn2 MMx3 | Spcmn10 MMx1 | Spcmn10 MMx2 | Spcmn10 MMx3 | Spcmn18 MMx1 | Spcmn18 MMx2 | Spcmn18 MMx3 | Spcmn26 MMx1 | Spcmn26 MMx2 | Spcmn26 MMx3 |
| E | Spcmn3 MMx1 | Spcmn3 MMx2 | Spcmn3 MMx3 | Spcmn11 MMx1 | Spcmn11 MMx2 | Spcmn11 MMx3 | Spcmn19 MMx1 | Spcmn19 MMx2 | Spcmn19 MMx3 | Spcmn27 MMx1 | Spcmn27 MMx2 | Spcmn27 MMx3 |
| F | Spcmn4 MMx1 | Spcmn4 MMx2 | Spcmn4 MMx3 | Spcmn12 MMx1 | Spcmn12 MMx2 | Spcmn12 MMx3 | Spcmn20 MMx1 | Spcmn20 MMx2 | Spcmn20 MMx3 | Spcmn28 MMx1 | Spcmn28 MMx2 | Spcmn28 MMx3 |
| G | Spcmn5 MMx1 | Spcmn5 MMx2 | Spcmn5 MMx3 | Spcmn13 MMx1 | Spcmn13 MMx2 | Spcmn13 MMx3 | Spcmn21 MMx1 | Spcmn21 MMx2 | Spcmn21 MMx3 | Spcmn29 MMx1 | Spcmn29 MMx2 | Spcmn29 MMx3 |
| H | Spcmn6 MMx1 | Spcmn6 MMx2 | Spcmn6 MMx3 | Spcmn14 MMx1 | Spcmn14 MMx2 | Spcmn14 MMx3 | Spcmn22 MMx1 | Spcmn22 MMx2 | Spcmn22 MMx3 | Spcmn30 MMx1 | Spcmn30 MMx2 | Spcmn30 MMx3 |

Slika 12. Izgled pločice za test KRAS mutacija v2 (LSR). MC-pozitivna kontrola, NC-negativna kontrola, Spcmn-uzorak, MM-Master Mix

Izvor:<https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/kras-mutation-test-v2-lsr-rmd-4800-lsr-002.html>

Pripremljena pločica se postavlja u uređaj cobas z 480 (Roche, Njemačka) i pokrene se analiza (Slika 13).



Slika 13. Uređaj cobas z 480

Izvor: https://pim-media.roche.com/Images/INS_2111_cobas_z_480_Analyzer.jpg

Za otkrivanje mutacija koristi se metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR).

Proces umnožavanja započinje zagrijavanjem PCR smjese kako bi se genomska DNA denaturirala i izložile ciljane sekvence početnica. Nakon toga slijedi hlađenje smjese, pri čemu se uzvodne i nizvodne početnice spajaju s ciljanim sekvencama DNA. Enzim koji se koristi za ciljanu amplifikaciju je Z05-AS1 DNA polimeraza koja produžuje svaku spojenu početnicu u prisustvu dvovalentnih metalnih kationa i viška dNTP-a, što dovodi do sintetiziranja novog lanca DNA. Ovim postupkom se završava

prvi ciklus PCR-a, čime se kao krajnji produkt dobije dvolančana DNA koja se sastoji od ciljanih regija parova baza željenog gena. Ovaj proces se ponavlja u nekoliko ciklusa, pri čemu se u svakom ciklusu udvostručuje količina amplikonske DNA.

U PCR reakciji oligonukleotidna proba označena je fluorescentnom bojom (reporter) i molekulom prigušivačem (quencher) koja gasi fluorescentnu emisiju ako se nalazi blizu fluorescentne boje u probi. Za vrijeme amplifikacije, proba komplementarna sekvenci DNA u amplikonu se veže i cijepa 5'-3' endonukleaznom aktivnošću enzima Z05-AS1 DNA polimeraze. Fluorescentna boja se odvoji od prigušivača kao posljedica endonukleazne aktivnosti i detektira se fluorescencija koja se dalje softverski obrađuje.

Selektivna amplifikacija ciljane nukleinske kiseline provodi se korištenjem enzima AmpErase (uracil-N-glikozilaza) i deoksiuridin trifosfata (dUTP). Enzim AmpErase prepoznaje i potiče uništavanje DNA molekula koje sadrže deoksiuridin, ali ne i timidin.

4. REZULTATI

4.1. KRAS mutacijski test (LSR)

KRAS mutacijski test (LSR) dizajniran je za otkrivanje mutacija koje su prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Popis mutacija koje se detektiraju KRAS mutacijskim testom (LSR)

| Exon | KRAS Mutation Group | KRAS Mutation | Nucleotide Nomenclature | Protein Nomenclature |
|--------|---------------------|---------------|-------------------------|----------------------|
| Exon 2 | G12X * | G12A | c.35G>C | p.Gly12Ala |
| | | G12C* | c.34G>T | p.Gly12Cys |
| | | G12D | c.35G>A | p.Gly12Asp |
| | | G12R | c.34G>C | p.Gly12Arg |
| | | G12S | c.34G>A | p.Gly12Ser |
| | | G12V | c.35G>T | p.Gly12Val |
| | G13X | G13A | c.38G>C | p.Gly13Ala |
| | | G13C | c.37G>T | p.Gly13Cys |
| | | G13D | c.38G>A | p.Gly13Asp |
| | | G13R | c.37G>C | p.Gly13Arg |
| | | G13S | c.37G>A | p.Gly13Ser |
| | | G13V | c.38G>T | p.Gly13Val |
| Exon 3 | A59X | A59E | c.176C>A | p.Ala59Glu |
| | | A59G | c.176C>G | p.Ala59Gly |
| | | A59S | c.175G>T | p.Ala59Ser |
| | | A59T | c.175G>A | p.Ala59Thr |
| | Q61X | Q61E | c.181C>G | p.Gln61Glu |
| | | Q61Hc | c.183A>C | p.Gln61His |
| | | Q61Ht | c.183A>T | p.Gln61His |
| | | Q61K | c.181C>A | p.Gln61Lys |
| | | Q61L | c.182A>T | p.Gln61Leu |
| | | Q61P | c.182A>C | p.Gln61Pro |
| | | Q61R | c.182A>G | p.Gln61Arg |
| | | | | |
| Exon 4 | K117X | K117Nc | c.351A>C | p.Lys117Asn |
| | | K117Nt | c.351A>T | p.Lys117Asn |
| | A146X | A146P | c.436G>C | p.Ala146Pro |
| | | A146T | c.436G>A | p.Ala146Thr |
| | | A146V | c.437C>T | p.Ala146Val |

Rezultati analize mogu biti različiti. Objašnjenje rezultata prikazano je u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz i objašnjenje rezultata KRAS mutacijskog testa (LSR)

| Rezultat testiranja | | Objašnjenje rezultata |
|-----------------------|-------|--|
| Utvrđena mutacija | G12X | G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V |
| | G13X | G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V |
| | A59X | A59E, A59G, A59S, A59T |
| | Q61X | Q61E, Q61Hc, Q61Ht, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R |
| | K117X | K117Nc, K117Nt |
| | A146X | A146P, A146T, A146V |
| Nema mutacije | N/A | Nema mutacije u KRAS genu |
| Nevaljan test | N/A | Rezultat testa je nevažeći. Ponoviti testiranje uzoraka s nevažećim rezultatima. |
| Neuspješno testiranje | N/A | Testiranje nije uspjelo zbog kvara hardvera ili softvera. |

Softver cobas® 4800 User Defined Workflow (UDF) automatski obrađuje prikupljene podatke fluorescencije. Konačni rezultati se dobiju u obliku izvještaja koji prikazuje sve podatke o testiranju uzoraka (Slika 14).

| KRAS FFPET Mutation Test v2 (LSR) Report | | | | | |
|---|-------------|----------------------------------|------------------|------------------------------|------|
| Raw Data File: KRAS 03.06.2022.ixc | | | | | |
| Test Status: | | Valid | | | |
| Test Name: | | KRAS v2 FFPET | | | |
| Run Date and Time: | | 03-Jun-2022 12:40:40 | | | |
| Instrument Serial No.: | | 51055 | | | |
| UDF Software Version: | | LCS480 1.5.1.62 SP2 - UDF v2.0.0 | | | |
| KRASv2 FFPET Test Package Software Version: | | 1.1.0.20002 | | | |
| Reagent Kit ID: | | N/A | | | |
| Run Operator: | | MOL | | | |
| Run Note: | | N/A | | | |
| Controls | | | | | |
| Position | Sample Name | Control Status | Control Type | Ct (Channel: MMx1,MMx2,MMx3) | Flag |
| A01:A02:A03 | MUT | Valid | Mutant Control | Ch 1: 30.72; 29.88; 30.17 | |
| | | | | Ch 2: 29.19; 31.69; 31.30 | |
| | | | | Ch 3: N/A; 30.22; 29.01 | |
| | | | | Ch 4: 24.56; 25.19; 24.36 | |
| B01:B02:B03 | NEG | Valid | Negative Control | Ch 1: NaN; NaN; NaN | |
| | | | | Ch 2: NaN; NaN; NaN | |
| | | | | Ch 3: N/A; NaN; NaN | |
| | | | | Ch 4: NaN; NaN; NaN | |
| Specimens | | | | | |
| Position | Sample Name | Test Result | Mutation Result | Ct (Channel: MMx1,MMx2,MMx3) | Flag |
| C01:C02:C03 | Uzorak 1 | No Mutation Detected | N/A | Ch 1: 48.85; NaN; NaN | |
| | | | | Ch 2: 40.18; 42.19; NaN | |
| | | | | Ch 3: N/A; 40.28; NaN | |
| | | | | Ch 4: 29.73; 31.08; 29.49 | |
| D01:D02:D03 | Uzorak 2 | No Mutation Detected | N/A | Ch 1: 41.88; 37.38; 46.22 | |
| | | | | Ch 2: 37.15; 37.58; NaN | |
| | | | | Ch 3: N/A; 36.30; 48.16 | |
| | | | | Ch 4: 25.73; 26.30; 25.51 | |

Slika 14. KRAS izvještaj

4.2. BRAF/NRAS mutacijski test (LSR)

BRAF/NRAS mutacijski test (LSR) dizajniran je za otkrivanje mutacija koje su prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Popis mutacija koje se detektiraju BRAF/NRAS mutacijskim testom (LSR)

| BRAF | | | | |
|------|-------------------|----------|-----------------------|-----------|
| Exon | Mutation Reported | Mutation | Nucleic Acid Sequence | COSMIC ID |
| 11 | BRAF Exon 11 | G466A | c.1397G>C | 452 |
| 11 | BRAF Exon 11 | G466V | c.1397G>T | 451 |
| 11 | BRAF Exon 11 | G469A | c.1406G>C | 460 |
| 11 | BRAF Exon 11 | G469R | c.1405G>A | 457 |
| 11 | BRAF Exon 11 | G469V | c.1406G>T | 459 |
| 15 | BRAF V600E/E2/D | V600E | c.1799T>A | 476 |
| 15 | BRAF V600E/E2/D | V600E2 | c.1799_1800TG>AA | 475 |
| 15 | BRAF V600E/E2/D | V600D | c.1799_1800TG>AT | 477 |
| 15 | BRAF V600K | V600K | c.1798_1799GT>AA | 473 |
| 15 | BRAF V600R | V600R | c.1798_1799GT>AG | 474 |
| 15 | BRAF K601E | K601E | c.1801A>G | 478 |
| NRAS | | | | |
| Exon | Mutation Reported | Mutation | Nucleic Acid Sequence | COSMIC ID |
| 2 | G12X | G12A | c.35G>C | 565 |
| 2 | G12X | G12C | c.34G>T | 562 |
| 2 | G12X | G12D | c.35G>A | 564 |
| 2 | G12X | G12R | c.34G>C | 561 |
| 2 | G12X | G12S | c.34G>A | 563 |
| 2 | G12X | G12V | c.35G>T | 566 |
| 2 | G13X | G13A | c.38G>C | 575 |
| 2 | G13X | G13C | c.37G>T | 570 |
| 2 | G13X | G13D | c.38G>A | 573 |
| 2 | G13X | G13R | c.37G>C | 569 |
| 2 | G13X | G13S | c.37G>A | 571 |
| 2 | G13X | G13V | c.38G>T | 574 |
| 2 | A18T | A18T | c.52G>A | 577 |
| 3 | Q61X | Q61Ht | c.183A>T | 585 |
| 3 | Q61X | Q61Hc | c.183A>C | 586 |
| 3 | Q61X | Q61K | c.181C>A | 580 |
| 3 | Q61X | Q61L | c.182A>T | 583 |
| 3 | Q61X | Q61P | c.182A>C | 582 |
| 3 | Q61X | Q61R | c.182A>G | 584 |
| 3 | Other NRAS Ex3/4 | A59D | c.176C>A | 253327 |
| 3 | Other NRAS Ex3/4 | A59T | c.175G>A | 578 |
| 4 | Other NRAS Ex3/4 | K117Nc | c.351G>C | N/A |
| 4 | Other NRAS Ex3/4 | K117Nt | c.351G>T | N/A |
| 4 | Other NRAS Ex3/4 | A146T | c.436G>A | 27174 |
| 4 | Other NRAS Ex3/4 | A146V | c.437C>T | 4170228 |

Rezultati analize mogu biti različiti. Objašnjenje rezultata prikazano je u Tablici

6.

Tablica 6. Prikaz i objašnjenje rezultata BRAF/NRAS mutacijskog testa (LSR)

| Rezultat testiranja | | Objašnjenje rezultata |
|--|--|--|
| Utvrđena mutacija | BRAF V600E/E2/D (BRAF V600E, V600E2, V600D) | Mutacija utvrđena u određenoj regiji. |
| | BRAF V600K | |
| | BRAF V600R | |
| | BRAF K601E | |
| | BRAF Exon11 (G466A, G466V, G469A, G469R, G469V) | |
| | NRAS G12X (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V) | |
| | NRAS G13X (G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V) | |
| | NRAS A18T | |
| | NRAS Q61X (Q61Ht, Q61Hc, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R) | |
| NRAS Ex 3 and 4 (A59D, A59T, K117Nc, K117Nt, A146T, A146V) | | |
| Nema mutacije | N/A | Nema mutacije u BRAF/NRAS genu |
| Nevaljan test | N/A | Rezultat testa je nevažeci. Ponoviti testiranje uzoraka s nevažecim rezultatima. |
| Neuspješno testiranje | N/A | Testiranje nije uspjelo zbog kvara hardvera ili softvera. |

Nakon obrade podataka pomoću Softwer cobas® 4800 User Defined Workflow (UDF) dobiju se rezultati u obliku izvještaja koji prikazuje sve podatke o testiranju uzoraka (Slika15).

| Test Name: | | BRAF/NRAS FFPET | | | |
|--|-------------|----------------------------------|------------------|--|------|
| Run Date and Time: | | 04-Mar-2022 15:30:27 | | | |
| Instrument Serial No.: | | 51055 | | | |
| UDF Software Version: | | LCS480 1.5.1.62 SP2 - UDF v2.0.0 | | | |
| BRAF/NRAS FFPET Test Package Software Version: | | 1.0.5.1549 | | | |
| Algorithm Definition File: | | BRAF_NRAS.adf | | | |
| Reagent Kit ID: | | N/A | | | |
| Run Operator: | | MOL | | | |
| Run Note: | | N/A | | | |
| Controls | | | | | |
| Position | Sample Name | Control Status | Control Type | CI (Channel: MMx1;MMx2;MMx3) | Flag |
| A01:A02:A03 | MUT | Valid | Mutant Control | Ch 1: 27.8; 27.4; 29.9 Ch 2: 27.6; 27.1; 27.2 Ch 3: 27.6; 28.1; 29.9 Ch 4: 22.7; 22.9; 23.4 | |
| B01:B02:B03 | NEG | Valid | Negative Control | Ch 1: NaN; NaN; NaN Ch 2: NaN; NaN; NaN Ch 3: NaN; NaN; NaN Ch 4: NaN; NaN; NaN | |
| Specimens | | | | | |
| Position | Sample Name | Test Result | Mutation Result | CI (Channel: MMx1;MMx2;MMx3) | Flag |
| C01:C02:C03 | Uzorak1 | No Mutation Detected | N/A | Ch 1: NaN; 39.8; NaN Ch 2: 37.1; 36.3; NaN Ch 3: 38.8; 35.3; 35.7 Ch 4: 23.3; 23.2; 23.4 | |

Slika 15. BRAF/NRAS izvještaj

5. RASPRAVA

Karcinom debelog crijeva jedan je od češćih karcinoma u svijetu i zauzima 3. mjesto po pojavnosti kod muškaraca i žena. Uglavnom se javlja između 60. i 79. godine života. Liječenje i prognoza bolesti ovise o dijagnozi u ranom stadiju, kada je preživljenje visoko. Najčešća metoda u liječenju karcinoma kolona je kirurški zahvat, a osim toga primjenjuje se i kemoterapija, radioterapija i liječenje biološkim lijekovima, odnosno ciljane terapija. (4, 8 11)

Zadatak personalizirane medicine je uzeti u obzir prognostičke i prediktivne čimbenike te pronaći najbolju terapiju za svakog pojedinca. Postoji mnogo prednosti u odnosu na tradicionalni pristup liječenju upravo zato što se liječenje bazira na patologiji bolesti i fiziologiji pojedinca. Odgovor na terapiju ovisi o molekularnoj podlozi tumora, mikrookolišnim uvjetima i interakciji tumorskih stanica sa zdravim stanicama. Sve tri navedene stavke su jedinstvene za svakog pojedinca. (25)

Ciljano liječenje se zasniva na odabiru prikladne terapije, uzimajući u obzir molekularnu strukturu pacijenta, odnosno strukturu njegova genoma. Važno je istaknuti kako će se budućnost personalizirane medicine temeljiti na metodama sistemske biologije, što za cilj ima razviti efikasne dijagnostičke, prognostičke i prediktivne biomarkere. Rezultat toga bit će brojna saznanja o nastanku i karakterizaciji tumora, njegovom odgovoru na lijekove, adekvatnoj terapiji i mogućim štetnim reakcijama na terapiju. (25)

Pri molekularnom testiranju uzorka pacijenta s karcinomom debelog crijeva analiziraju se geni *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*. Važno je otkriti točno mjesto mutacije i na taj način odrediti odgovarajuću terapiju. Smanjen odgovor na anti-EGFR terapiju i lošije ukupno preživljenje je kod pacijenata s mutacijama u prethodno navedenim genima, u usporedbi s pacijentima koji nemaju mutacije u tim genima. S obzirom na prediktivnu vrijednost određivanja mutacija u genima jer predviđaju odgovor na liječenje anti-EGFR lijekovima, jako je važno da se cijeli postupak što bolje standardizira u laboratorijima koji rade molekularnu analizu. (14)

6. ZAKLJUČAK

Karcinom debelog crijeva jedan je od najčešćih zloćudnih bolesti kako u svijetu tako i u Hrvatskoj.

Razvoj personalizirane medicine koji se temelji na sve boljem otkrivanju i analizi molekularnih biljega omogućio je da se liječenje karcinoma prilagodi svakom pacijentu pojedinačno, to jest da se primijeni pravi lijek za pravog pacijenta u pravo vrijeme.

U ovom radu prikazana je važnost molekularnog testiranja gena KRAS, NRAS i BRAF kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom u svrhu primjene ciljane terapije. Analiza koja se provodi sastoji se od nekoliko koraka: izolacije DNA iz tkiva uklopljenog u parafin, umnažanja DNA i otkrivanja određenih mutacija koje su značajne za primjenu lijeka.

7. LITERATURA

- (1) Krmpotić-Nemanić J, Marušić A, Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 342–349.
- (2) Azzouz LL, Sharma S. Physiology, Large Intestine. 2023 [citirano 12. svibnja 2023.]; Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939634/>
- (3) Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Andreis I., Kukulja Taradi S., Taradi M., urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 813-815, 831, 832.
- (4) Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 127-169, 428-430.
- (5) Pecorino L. Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics. 3rd ed. London, England: Oxford University Press; 2012. str. 197-224.
- (6) . Čvorišćec D., Čepelak I., Štrausova medicinska biokemija, Zagreb, Medicinska naklada, 2009. str. 517-534 .
- (7) Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. Front Oncol [Internet]. 2013;3:114. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00114>
- (8) Bilten Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. godine [Internet]. Hzzjz.hr. [citirano 14. svibnja 2023]. Dostupno na: <https://www.hzzjz.hr/aktualnosti/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2020-godine/>
- (9) Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. Gastroenterol Clin North Am. 2002 Dec;31(4):925-43. doi: 10.1016/s0889-8553(02)00057-2. PMID: 12489270.
- (10) Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003 Mar 6;348(10):919-32. doi: 10.1056/NEJMra012242. PMID: 12621137.
- (11) BERGMAN MARKOVIĆ B. PREVENCIJA I RANO OTKRIVANJE KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA. Acta medica Croatica [Internet]. 2015 [pristupljeno 17.05.2023.];69(4):365-371. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/154167>

- (12) Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer*. 2015 Jul 15;137(2):262-6. doi: 10.1002/ijc.28940. Epub 2014 May 12. PMID: 24789362.
- (13) Szaśiadek MM, Łaczmańska I, Maciejczyk A, Matkowski R, Gil J. Fundamentals of personalised medicine in genetic testing-based oncology. *Nowotwory [Internet]*. 2020 [citirano 25. svibnja 2023];70(4):144–9.
- (14) Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int*. 2015;2015:149014. doi: 10.1155/2015/149014. Epub 2015 May 27. PMID: 26106599; PMCID: PMC4461726.
- (15) Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 565-567
- (16) Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Duldulao M, Patel S, Sanchez J, Garcia-Aguilar J, Kim J. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Sep 25;13(10):12153-68. doi: 10.3390/ijms131012153. PMID: 23202889; PMCID: PMC3497263.
- (17) Zhu G, Pei L, Xia H, Tang Q, Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2021 Nov 6;20(1):143. doi: 10.1186/s12943-021-01441-4. PMID: 34742312; PMCID: PMC8571891.
- (18) De Mattos-Arruda L, Dienstmann R, Tabernero J. Development of molecular biomarkers in individualized treatment of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2011 Dec;10(4):279-89. doi: 10.1016/j.clcc.2011.03.030. Epub 2011 May 12. PMID: 21729679.
- (19) Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, Salvatore L, Antoniotti C, Marmorino F, Sensi E, Lupi C, Fontanini G, De Gregorio V, Giannini R, Basolo F, Masi G, Falcone A. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2015 Jan 1;136(1):83-90. doi: 10.1002/ijc.28955. Epub 2014 May 28. PMID: 24806288.
- (20) Luu LJ, J. Price T. BRAF Mutation and Its Importance in Colorectal Cancer [Internet]. *Advances in the Molecular Understanding of Colorectal Cancer*. IntechOpen; 2019. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82571>

- (21) cobas DNA Sample Preparation Kit Dostupno na: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-dna-sample-preparationkit.html>
- (22) Qubit® 4.0 Fluorometer Dostupno na: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0017210_Qubit_4_Assays_QR.pdf
- (23) KRAS Mutation Test v2 (LSR) Dostupno na: <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/kras-mutation-test-v2-lsr-rmd-4800-lsr-002.html>
- (24) BRAF/NRAS Mutation Test (LSR) Dostupno na: <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/braf-nras-mutation-test-lsr-rmd-4800-lsr-001.html>
- (25) Štambuk S, Šundov D, Kuret S, Beljan R, Anđelinović Š. Future Perspectives of Personalized Oncology. Collegium antropologicum [Internet]. 2010 [pristupljeno 14.06.2023.];34(2):763-769. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/56550>

8. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI:

Ime i prezime: Korina Primorac

Datum i mjesto rođenja: 25.08.2001., Zenica, Bosna i Hercegovina

E-mail adresa: korina.primorac@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2007.-2016. Osnovna škola Katolički školski centar "Sv. Pavao" Zenica

2009.-2016. Osnovna muzička škola Zenica

2016.-2020. Opća gimnazija Katolički školski centar "Sv. Pavao" Zenica

2020.-2023. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

STRANI JEZICI:

Engleski jezik

Njemački jezik