

Geneza karcinoma kolona i značenje za dijagnostiku i prognozu

Halavuk, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:663532>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marija Halavuk

**Geneza karcinoma kolona i značenje za
dijagnostiku i prognozu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić koja je velikodušno ustupila pomoć za izradu ovog rada te hvala svim djelatnicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta koji su omogućili stjecanje potrebnih znanja i vještina.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima koji su bili potpora i vjerovali u mene, a najveća hvala Dragom Bogu koji me vodio pravim putem.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Anatomija debeloga crijeva	2
1.2. Histologija debeloga crijeva	3
1.3. Fiziologija debeloga crijeva.....	4
1.4. Karcinogeneza	6
1.4.1. Tumori.....	6
1.4.2. Etiologija zloćudnih tumora.....	6
1.4.3. Genetička teorija karcinogeneze	7
1.5. Karcinom debeloga crijeva	8
1.5.1. Patohistologija.....	9
1.5.2. Klinička slika	10
1.5.3. Rizik za obolijevanje.....	11
1.5.4. Dijagnoza i prognoza	12
1.5.5. Terapija	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Kromosomska nestabilnost (CIN)	18
4.1.1. Tumorski supresorski gen <i>APC</i> /Wnt signalni put.....	20
4.1.2. <i>KRAS</i> onkogen	21
4.1.3. <i>BRAF</i> onkogen	23
4.1.4. <i>PIK3CA</i> onkogen	24
4.1.5. LOH 18q i <i>DCC</i>	25
4.1.6. <i>TGFBR2</i> , <i>SMAD2/SMAD4</i>	26
4.1.7. Tumorski supresorski gen <i>TP53</i>	28
4.1.8. <i>NM23</i> gen.....	29
4.2. Mitotičke kinaze	31
4.2.1. <i>PLK-1</i>	31
4.2.2. AURORA KINAZE.....	33
4.2.3. <i>SKA3</i>	34
4.3. <i>ZG16</i>	35

4.4. Mikrosatelitska nestabilnost (MSI)	36
4.5. Hipermetilacija CpG otoka.....	37
4.6. Značenje za dijagnostiku i prognozu	39
4.6.1. Molekularni testovi detekcije CRC-a.....	39
4.6.2. Klasifikacija CRC-a prema molekulskim biljezima	39
4.6.3. <i>KRAS</i> mutacije i prognoza CRC-a	40
4.6.4. <i>BRAF</i> mutacije i prognoza CRC-a	40
4.6.5. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI)	41
4.6.6 Fenotip metilatora CpG otoka (CIMP)	41
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43
7. SAŽETAK.....	48
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Kolorektalni karcinom jedan je od najčešćih karcinoma u ljudi. U stalnom je porastu i danas predstavlja više od 90 % zloćudnih tumora debeloga crijeva. Muškarci nešto češće obolijevaju, a vršna incidencija je između 60 i 70 godina te je veća u razvijenim zemljama (Damjanov i sur., 2018).

U Hrvatskoj je usvojen Nacionalni program ranoga otkrivanja raka debeloga crijeva koji se provodi među osobama u dobi između 50. i 74. godine s ciljem otkrivanja karcinoma debeloga crijeva u najranijoj fazi kako bi se ranije uspostavila terapija, smanjila smrtnost, povećala uspješnost liječenja te općenito unaprijedila kvaliteta života bolesnika i povećala svijest o ozbiljnosti bolesti.

Interakcija stečenih i nasljednih genetskih promjena s okolišnim čimbenicima kroz dulje vremensko razdoblje dovodi do nastanka karcinoma kolona i rektuma. Nakupljaju se mutacije u onkogenima, tumorskim supresorskim genima i genima za popravak krivo sparenih baza u DNA (*MMR* geni) tijekom razvoja normalnoga epitela kolona što dovodi do adenoma i metastatskih karcinoma (Kapitanović, 2015). Boljim razumijevanjem i poznavanjem genetskih pojava, biljega te mogućih mehanizama nastanka karcinoma, pridonosi novim strategijama prevencije, dijagnoze, pa tako i terapije kolorektalnoga karcinoma (Kapitanović, 2015).

1.1. Anatomija debeloga crijeva

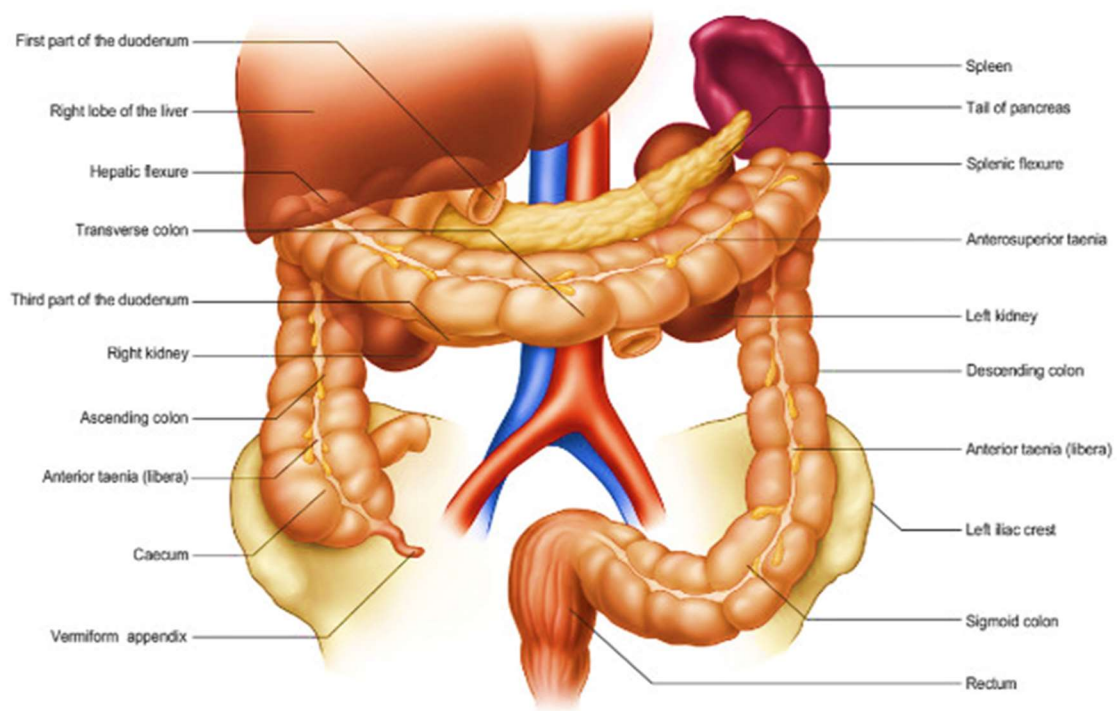
Crijevo je cjevasti zavojiti organ u trbušnoj šupljini koji se nadovezuje na pilorus želuca, završava analnim otvorom, a osnovna podjela je na tanko i debelo crijevo (Štraus i Čvorišćec, 2009).

Debelo crijevo (lat. *intestinum crassum*) nastavlja se na tanko crijevo (lat. *ileum*) i proteže se do analnoga otvora. Započinje kao slijepo crijevo (lat. *caecum*) u desnoj ilijačnoj jami na čijem se dnu nalazi crvuljak (lat. *apendix vermiformis*). Uzlazno debelo crijevo (lat. *colon ascendens*) pruža se između slijepoga crijeva i desnoga zavoja debeloga crijeva te doseže do donje plohe jetre. Potom, prelazi u poprečno debelo crijevo (lat. *colon transversum*) koje se proteže između desnoga i lijevoga zavoja debeloga crijeva te zavija u silazno debelo crijevo (lat. *colon descendens*) u lijevom gornjem kutu trbuha. Nastavlja u sigmoidno debelo crijevo (lat. *colon sigmoideum*) u lijevoj ilijačnoj jami i zdjelici, a završava ravnim crijevom (lat. *rectum*) u stražnjem središnjem dijelu male zdjelice. Rektum sadrži sfinktere, važne za kontinenciju i otvara se čmarom (lat. *anus*). Uzlazno, silazno i ravno debelo crijevo nepomični su dijelovi prirasli uz stražnju trbušnu stjenku, dok su slijepo crijevo, poprečno i sigmoidno debelo crijevo pomični dijelovi debeloga crijeva (Jalšovec, 2018).

Uzlazni i poprečni kolon naziva se proksimalni dio debeloga crijeva, a distalni dio čine silazni i sigmoidni kolon.

1.2. Histologija debeloga crijeva

Crijevnu stjenku izvana gradi glatka peritonealna ovojnica (lat. *tunica serosa*) koja je rahlim vezivom povezana s mišićnim tkivom (lat. *tunica muscularis*), a prema crijevnom lumenu nalazi se sloj podsluznice i sluznice (lat. *tunica mucosa*) koja se sastoji od triju slojeva. Sloj epitelnih stanica nalazi se prema lumenu, ispod je vezivni sloj sluznice (lat. *lamina propria mucosae*) u kojem su smješteni limfni čvorovi i žlijezde koje izlučuju crijevni sok te zadnji sloj glatkih mišićnih vlakana (lat. *lamina muscularis mucosae*) (Štraus i Čvorišćec, 2009).



Slika 1. Anatomija debeloga crijeva, prilagođeno i preuzeto prema

<https://www.surgeryjournal.co.uk>

1.3. Fiziologija debeloga crijeva

Specifične funkcije crijeva jesu probava i apsorpcija hrane (tanko crijevo), a apsorpcija vode i elektrolita iz himusa, stvaranje čvrstoga fecesa, pohrana fekalnih masa do njihova izbacivanja uloga je debeloga crijeva. Apсорpcija se u najvećoj mjeri događa u proksimalnom dijelu debeloga crijeva (apsorpcijski kolon), dok se pohrana fekalnih masa nalazi u distalnoj polovici (spremišni kolon) (Guyton i Hall, 2017).

Prema Guytonu i Hallu (2017), u lumen debeloga crijeva dnevno prijede oko 1,5 L himusa, a kako se tekućina i otopljene tvari sve više apsorbiraju prolaskom kroz crijevo, fecesom se izbacuje tek manje od 100 mL tekućine. Sluznica debeloga crijeva obložena je mnogobrojnim Lieberkühnovim kriptama, no u njoj nema resica kao u sluznici tankoga crijeva. Epitelne stanice su uglavnom mukozne stanice koje luče samo sluz, one gotovo uopće nemaju probavnih enzima. Sluz štiti crijevnu stjenku od oštećenja, velike bakterijske aktivnosti u fecesu i služi kao ljepilo koje povezuje fekalne mase. Sluznica izlučuje hidrogenkarbonatne ione od strane epitelnih stanica koje ne izlučuju sluz i istodobno apsorbuje iste količine kloridnih iona. Također, tako se osigurava lužnatost sekreta i onemogućava nagrizanje crijevne stjenke kiselinama nastalim u fecesu. Izravnim dodirnim podraživanjem epitelnih stanica koje oblažu debelo crijevo i lokalnim živčanim refleksima koji podražuju mukozne stanice u Lieberkühnovim kriptama postiže se regulacija brzine izlučivanja sluzi. Aktivna je i potpunija apsorpcija natrija za razliku od sluznice tankoga crijeva jer su spojišta između epitelnih stanica mnogo čvršća te onemogućavaju glavninu povratne difuzije, a zbog stvorenoga gradijenta električnoga potencijala, apsorbiraju se i kloridi. Osmotski gradijent kroz sluznicu, nastao zbog apsorpcije natrija i kalija, omogućuje i apsorpciju vode. Također, djelovanjem bakterija u apsorpcijskom kolonu, nastaje vitamin K stvoren od bakterija, što je od iznimne važnosti s obzirom da vitamin K unesen dnevnom prehranom često nije dovoljan za normalno zgrušavanje krvi.

Za razliku od segmentacijskih kretnji koje nastaju u tankom crijevu, u debelom crijevu pronalazimo velika kružna suženja. Kružni se mišić steže na svakom od tih suženih mjesta, a istodobno se kontrahira i uzdužno mišićje debeloga crijeva. Tako se nepodraženi dijelovi crijeva, zbog kontrakcija kružnoga i uzdužnoga mišićja, ispupče prema van u haustracije, vrećaste tvorbe. Spore i trajne haustralne kontrakcije uzrokuju potiskivanje himusa od ileocekalnoga zalistka kroz debelo crijevo, a polutekući himus na tom putu postaje polukruta žitka masa. Funkciju potiskivanja mogu obavljati i masovne kretnje koje se pojavljuju jedan do tri puta u danu, pobuđuju ih gastrokolični i duodenokolični refleksi, ali i nadražaj debeloga crijeva (ulcerozni kolitis). Kada masovne kretnje potisnu feces u rektum, rastezanje rektalne stjenke pobuđuje aferentne signale, oni se šire mijenteričnim spletom te izazivaju stvaranje peristaltičnih valova u silaznom, sigmoidnom kolonu i rektumu te feces prolazi prema anusu. Inhibicijski signali iz mijenteričkog plexusa olabave unutarnji analni sfinkter kada se peristaltički val približi anusu, a do defekacije dolazi ukoliko se svjesno olabavi vanjski analni sfinkter (Guyton i Hall, 2017).

1.4. Karcinogeneza

1.4.1. Tumori

Patološke tvorbe koje nastaju zbog prekomjernog rasta abnormalnih stanica nazivamo novotvorinama (tumori, neoplazme). Dije se na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne) tumore. Zloćudni tumori, često nazivani rakom, šire se u okolna tkiva, a krvlju ili limfom i u druge dijelove tijela (metastaziranje) (Damjanov i sur., 2018).

Zloćudni tumori dije se na karcinome, sarkome i hemoblastome. Karcinomi su maligni tumori epitelnih, mukoidnih stanica i parenhimatoznih organa poput pluća, jetre, bubrega (Štraus i Rumora, 2009) te su najčešći oblik tumora.

Razvoj malignih tumora događa se u nekoliko stadija: inicijacija, promocija i progresija te metastaziranje. Inicijacija podrazumijeva nepovratan proces u kojem se razvija klon od jedne zloćudno preobražene stanice. Promocija je reverzibilan proces koji ovisi o učinku karcinogenih faktora, dok su za progresiju karakteristične vidljive genomske promjene te stvaranje lokalnoga tumora. Metastaziranje je širenje tumora po organizmu (Štraus i Rumora, 2009).

1.4.2. Etiologija zloćudnih tumora

Maligna stanica nastaje akumulacijom brojnih oštećenja koja su izbjegla stanične mehanizme popravka. Oštećeni su geni tumorskih supresora i antionkogeni koji imaju ulogu u regulaciji staničnoga ciklusa, apoptoze i stabilnosti genoma. U manjem broju slučajeva oštećenje može biti prisutno u zametnim stanicama te se prenositi na potomstvo, ali najčešće se događaju u somatskim stanicama utjecajem raznih mutagena poput bioloških čimbenika (EBV, HIV tip 1, HPV tipovi 16,18), djelovanjem različitih okolišnih faktora (sunčevo zračenje, aflatoksin), lijekova, stil života (pušenje, alkohol), profesionalna izloženost (arsen, azbest) (Vrdoljak i sur., 2013). Ksenobiotici, koji postaju karcinogeni nakon metaboličke aktivacije pomoću enzimskih sustava za biotransformaciju i detoksikaciju smještenih u endoplazmatskom retikulu, mogu se kovalentno vezati na DNA, RNA i proteine što uzrokuje mutacije, pojačanu metilaciju DNA kao i promjene u strukturi kromatina (Štraus i Rumora, 2009).

Pokazalo se kako ulogu u nastanku i progresiji malignih tumora, osim mutacija, imaju epigenetske promjene (nisu vezane uz izravne promjene DNA, primjerice metilacija DNA), molekule mikro-RNA (sudjeluju u regulaciji genske ekspresije), mehanizmi povezani sa skraćivanjem telomera (krajevi kromosoma kada se skrate do određene duljine, stanica prestaje s diobom) (Vrdoljak i sur., 2013).

1.4.3. Genetička teorija karcinogeneze

Genske mutacije zaslužne su za zloćudnu preobrazbu stanica, a mogu se podijeliti na pokretačke (engl. *driver*), koje se događaju u protoonkogenima, tumorskim supresorskim genima te su povezane s nastankom malignih tumora, i usputne (engl. *passenger*) koje nisu važne za progresiju tumora, nego su posljedica genomske nestabilnosti (Vrdoljak i sur., 2013).

Onkogeni su geni koji mijenjaju normalne signale čime nestaje kontrola rasta i proliferacije, stanice se nekontrolirano dijele, a nastaju zbog mutacija ili abnormalne ekspresije protoonkogeni, odnosno gena koji sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Tumorski supresorski geni kodiraju proteine koji inhibiraju proliferaciju i preživljavanje stanice, a inaktivacijom tih gena, mutacijom ili epigenetski (metilacija njihovih promotora), eliminiraju se ovi regulacijski proteini i dolazi do nastanka tumora. Za razliku od tumorskih supresorskih gena gdje je nužna inaktivacija oba alela (recesivni učinak), promjene kojima nastaju onkogeni imaju dominantni učinak, dovoljna je promjena u jednom alelu za očitovanje učinka (Štraus i Rumora, 2009; Vrdoljak i sur., 2013).

Mnogi protoonkogeni su geni za tirozinske kinaze, proteine koji fosforiliraju tirozinske ogranke drugih proteina te tako prenose signal unutar stanice (Vrdoljak i sur., 2013). Tirozinske kinaze nisu dio receptora i u citoplazmi se nalaze vezane za membranu preko svojega N-kraja, kao što su članovi porodice Src kinaza. Aktivacija gena *src* povezana je s nastankom karcinoma kolona gdje je povećana aktivnost Src-kinaze. Produkt *bcl-2* onkogeni integralni je protein koji inhibira apoptozu i potiče preživljavanje malignih stanica, a u ranoj fazi nastanka kolorektalnih tumora, abnormalna je ekspresija *bcl-2* gena. Nativni tip tumorskoga supresorskog gena *p53* kontrolira diobu regulacijom ulaska stanice u S-fazu ciklusa. Točkasta mutacija u jednom alelu i delecija u drugom, prisutna je kod 75-80 % karcinoma kolona (Štraus i Rumora, 2009).

1.4.4. Karakteristike tumora

Kako navode Vrdoljak i sur. (2013), zajednička obilježja svih vrsta raka jesu samodostatnost s obzirom na signale rasta, izmicanje apoptozi, tumorska angiogeneza, tkivna invazija, neograničen potencijal umnažanja i neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, a kasnije su dodane još četiri karakteristike: sposobnost izbjegavanja imunosnoga odgovora, poremećen metabolizam, upala te genomska nestabilnost.

Matične stanice raka imaju sposobnost samoobnavljanja i diferenciranja u druge stanice raka. Upravo su one važne u liječenju jer se pretpostavlja da lijek koji može uništiti velik dio stanica zloćudnoga tumora, ali ne i matične, neće dovesti do izlječenja (Vrdoljak i sur., 2013).

1.5. Karcinom debeloga crijeva

Maligni tumor žljezdanoga epitela sluznice debeloga crijeva koji nastaje zbog genskih promjena i okolišnih čimbenika tijekom dužeg vremenskoga razdoblja, naziva se karcinom debeloga crijeva.

Kod muškaraca se nalazi na trećem mjestu prema učestalosti (iza raka pluća i prostate), dok kod žena zauzima drugo mjesto (iza raka dojke). Karcinom se najčešće razvija u sigmoidnom kolonu (25 %), rektumu i anusu (45 %), stoga je važno naglasiti pravilnu prehranu i redovito pražnjenje stolice kako bi doticaj potencijalno kancerogenih tvari iz fecesa bio u što kraćem vremenu sa sluznicom crijeva. Učestalost raka na mjestu slijepoga crijeva i uzlaznoga kolona je 15 %, u poprečnom dijelu kolona 10 %, a najmanja je u silaznom kolonu (<https://www.zzjzdnz.hr/zdravlje/prevencija-raka/rak-debelog-crijeva-ranije-otkrivanje-bolja-prognoza>).

1.5.1. Patohistologija

Većina karcinoma debeloga crijeva razvijaju se iz dobroćudnih adenoma koji izrastaju iz crijevne stijenke i šire se u lumen (adeno-karcinomski slijed). Adenomatozni polipi histološki se dijele na tubularne, tubulovilozne i vilozne adenome, a neadenomatozni obuhvaćaju hiperplastične polipe, juvenilne polipe, pseudopolipe, lipome (<http://www.msdpriirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/tumori-probavnog-sustava/polipi-kolona-i-rektuma>).

Duže od pet godina potrebno je za adeno-kacinomski slijed. Rizik od obolijevanja ovisi o veličini, broju, histološkom tipu te vremenu rasta polipa, a veću mogućnost maligne pretvorbe imaju vilozni tip i polipi veći od 10 mm. Od ostalih oblika malignih tumora, to su mucinozni (prevladava mnogo mucina), scirozni (fibrozna komponenta), skvamozni i melanokarcinom (Brkić i Grgić, 2006).

Prva patohistološka podjela prema Dukesu, koja uzima u obzir transmuralnu penetraciju karcinoma prema okolnom tkivu te postojanje metastaza u limfnim čvorovima (Bergman Marković, 2015).

Tablica 1. Klasifikacija prema Dukesu i stopa preživljavanja (dopunjena Astler-Collerovom klasifikacijom s podskupinama B1 i C1), preuzeto i prilagođeno prema Bergman Marković, 2015.

Klasifikacija prema Dukesu	Stopa preživljavanja
A - tumor ograničen na sluznicu	80-95 %
B - tumor proširen na cijelu stijenku B1 - tumor ograničen na submukozu i mukozu B2 - tumor zahvaća i mišićni sloj	65 %
C - tumor proširen na limfne čvorove C1 - mišićni sloj i regionalni limfni čvorovi C2 - tumor probija cijelu stijenku cijeva i ovojnicu uz regionalne limfne čvorove	50 %
D - postoje udaljene metastaze	< 0 %

U kliničku praksu uvedena je TNM klasifikacija gdje T označava primarni tumor, N (nodus) metastaze regionalnih limfnih čvorova i M prisutnost udaljenih metastaza karcinoma debeloga crijeva (Štraus i Rumora, 2009). TNM klasifikacija dijeli se na UICC (Union Internationale Contre le Cancer) i AJCC (American Joint Committee on Cancer) koja zahtijeva pregled najmanje 12 limfnih čvorova pa na osnovi toga N0 predstavlja tumore kod kojih su svi limfni čvorovi bez tumorskoga tkiva, N1 označava tumor opažen u jednom do tri regionalna limfna čvora, a N2 označava tumor nađen u četiri ili više regionalnih limfnih čvorova (Roth, 2001).

Tablica 2. TNM klasifikacija karcinoma debelog crijeva, preuzeto i prilagođeno prema Bergman Marković, 2015.

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

1.5.2. Klinička slika

Klinička slika bolesnika dugo je asimptomatska jer kolorektalni adenokarcinom raste sporo te kada naraste dovoljno velik tada se javljaju simptomi.

Lijevostrane karcinome karakterizira sideropenična anemija, stolica pomiješana krvlju, izmjena dijareje i zatvora uz grčevite bolove u donjem dijelu abdomena jer karcinom kružno zahvaća crijeva. Kod desnostranih karcinoma javlja se također sideropenična anemija, slabost i zamor, dok opstrukcija kasnije nastupa jer je većega lumena i tekućeg sadržaja.

Uznapredovala bolest očituje se sistemskim manifestacijama, odnosno povišenom temperaturom, slabost, malaksalost te gubitak tjelesne mase (Damjanov i sur., 2018).

1.5.3. Rizik za obolijevanje

Najveći broj slučajeva karcinoma debeloga crijeva pojavljuje se sporadično (75 %), pod utjecajem vanjskih faktora, manji udio zauzimaju pacijenti s pozitivnom obiteljskom anamnezom ili osobnom anamnezom kolorektalnih adenoma (15-25 %), a najmanji broj čine osobe s genetskom predispozicijom (1 %) te upalne bolesti crijeva (1 %) (<https://www.zzzjzdnz.hr/zdravlje/prevencija-raka/rak-debelog-crijeva-ranije-otkrivanje-bolja-prognoza>).

Nasljedni sindromi koji povećavaju rizik su Lynchov sindrom i familijarna adenomatozna polipoza (FAP). Lynchov sindrom je nepolipozni autosomno-dominantni poremećaj u kojem dolazi do mutacija gena za popravak pogrešno sparenih baza. Mutacije su najčešće na genima *MSH2* i *MLH1* koje se očituju kao mikrosatelitska nestabilnost. Osim što Lynchov sindrom povećava rizik od nastanka kolorektalnoga karcinoma (u mlađoj životnoj dobi od 45-50 godina), može uzrokovati i karcinome tankoga crijeva, endometrija, jajnika, uretera. APC i beta-kateninski put odgovorni su za nastanak oko 80 % sporadičnih karcinoma crijeva te su također uzrok obiteljske adenomatozne polipoze. Obje su kopije gena APC izgubljene zbog čega nastaje poremećaj razgradnje beta-katenina koji se nakuplja i premješta u jezgru te pokreće diobu stanice (Damjanov i sur., 2018).

Rizik za nastanak bolesti povećava visokokalorična prehrana prepuna životinjskim masnoćama, nedostatak tjelovježbe, pušenje i alkohol. Pretpostavlja se da intestinalne bakterije pretvaraju dijetalne fosfolipide u diacilglicerol koji može ući u stanice epitela i stimulirati proteinsku kinazu C što dovodi do proliferacije stanice. Također, povećana razina žučnih kiselina oštećuje sluznicu, a tijekom metabolizma masti stvaraju se slobodni radikali. Prehrana bogata vlaknima, kalcija, antioksidansi, fizička aktivnost, primjena nesteroidnih antireumatika, hormonska nadomjesna terapija smanjuju rizik od obolijevanja (Brkić i Grgić, 2006).

Također, rizik od razvoja tumora ovisi o dobi, incidencija raste nakon pedesete godine, a vršnu vrijednost dostiže u dobi od oko sedamdeset godina. Bolesnici koji imaju kronične upalne bolesti debeloga crijeva (ulcerozni kolitis, Crohnova bolest) te prethodno operirani od kolorektalnoga karcinoma posebno su rizične skupine (Damjanov i sur., 2018).

1.5.4. Dijagnoza i prognoza

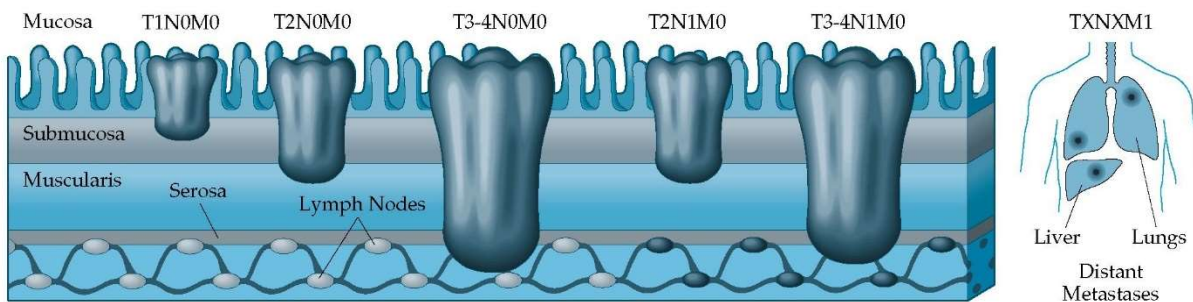
Kod većine pacijenata, bolest se otkriva u simptomatskoj fazi, a kod asimptomatskih osoba dijagnosticira pomoću metoda za rano otkrivanje bolesti (test okultnog fekalnog krvarenja u stolici).

Ukoliko simptomi ukazuju na postojanje bolesti, potreban je klinički pregled koji uključuje digitorektalni pregled, rektostigmoidoskopiju, kolonoskopiju ili irigografija (kada se kolonoskopija tehnički ne može izvesti). Kolonoskopija je *zlatni standard*, ona najbolje prikazuje cijelo debelo crijevo, omogućuje endoskopsko odstranjivanje polipa te uzimanje uzoraka za biopsiju. Razvijena je također virtualna kolonoskopija gdje se koristi magnetska rezonancija i odgovarajući računalni program te se procesira endoluminalni prikaz debeloga crijeva, ispunjenoga zrakom. Dijagnoza proširenosti kolorektalnoga karcinoma, otkriva se endoskopskim ultrazvukom i radiološkim slikovnim metodama (Roth, 2001; Brkić i Grgić, 2006).

Prognoza bolesti ovisi o zrelosti tumora i histološkom tipu. Povezana je s dubinom prodora tumora kroz stijenku crijeva, postojanje udaljenih metastaza te zahvaćenost perifernih limfnih čvorova. *Staging* sustav, odnosno Dukesova klasifikacija proširenosti i TNM-klasifikacija dijele karcinom debeloga crijeva i rektuma (CRC) u četiri stadija (Brkić i Grgić, 2006).

Prema Brkiću i Grgiću (2006), sljedeća četiri stadija jesu:

- stadij A (T1N0M0) obuhvaća površinske tumore koji ne prodiru kroz *m. mucosae* te nema pozitivnih limfnih čvorova;
- stadij B obuhvaća dvije podskupine tumora koji ne zahvaćaju regionalne limfne čvorove:
B1 (T2N0M0) u kojem je tumor ograničen na *m. mucosae*
B2 (T3-T4N0M0) gdje tumor prodire u ili kroz serozu;
- stadij C predstavlja tumore koji zahvaćaju regionalne limfne čvorove te se također dijeli na dvije podskupine:
C1 (T2N1M0) - tumor ograničen na *m. mucosae*
C2 (T3-T4N1M0) - tumor prodire u ili kroz serozu;
- stadij D (TXNXM1) obuhvaća tumore s udaljenim metastazama (jetra, pluća, kosti, bubrezi, nadbubrežne žlijezde, mozak).



Slika 2. Prikaz stadija proširenosti kolorektalnog karcinoma; preuzeto i prilagođeno prema <http://what-when-how.com>

1.5.5. Terapija

Liječenje kolorektalnoga karcinoma većinom je zajednički pristup koji obuhvaća kirurško i farmakološko liječenje te zračenje (Roth, 2001).

Osnovni način liječenja je kirurško odstranjenje tumora, a vrsta kirurškoga zahvata ovisi o lokalizaciji malignoga tkiva. Za prvi stadij proširenosti karcinoma, potrebno je kirurškim zahvatom odstraniti segment crijeva zahvaćen tumorom, pripadajuće krvne žile, 12 ili 13 limfnih čvorova te limfna drenaža. Kemoterapija se provodi, nakon odstranjenja tumora, u stadijima B i C (Dukes) zbog moguće ponovne pojave tumora. Sustavni učinak kemoterapije, osim tumorskih stanica uništava i zdrave stanice (probavni sustav, koštana srž, vlasište), zbog čega su najčešće nuspojave ćelavost, mučnina, smanjenje broja krvnih stanica. Bolesnici u stadiju C moraju biti podvrgnuti kemoterapiji, za razliku od pacijenata stadija B koji ovisi o diferenciranosti karcinoma, prijeoperativnoj koncentraciji karcinoembrionalnoga antigena (CEA) u serumu te o invaziji vena zloćudnim stanicama (Bergman Marković, 2015).

Standardna adjuvantna kemoterapija karcinoma kolona u Hrvatskoj je leukovorin (potencira citotoksični efekt 5-FU) + 5-fluorouracil kroz šest ciklusa s 28-dnevnim razmacima, a druge mogućnosti su monoterapija kapecitabinom (manje nuspojava te bolja kvaliteta života) i FOLFOX-4 kombinacija leukovorin + 5-fluorouracil + oksaliplatina (12 ciklusa, šest mjeseci) kojom se postiže najbolji uspjeh (Brkić i Grgić, 2006).

Radioterapija koristi zračenje kako bi se smanjila veličina ili uklonila tumorska masa. Kod velikih tumora, radioterapija se provodi i prije kirurškog zahvata, a kemoradioterapija se primjenjuje kod karcinoma rektuma (Bergman Marković, 2015). Nakon terapije mjeri se razina karcinoembrionalnoga antigena u serumu koja se povećava tijekom progresije kolorektalnoga karcinoma i razvoja metastaza zato je njeno određivanje korisno za praćenje uspješnosti liječenja i prognoze (Štraus i Rumora, 2009). Također, dostupni su i biološki lijekovi poput bevacizumaba, monoklonskoga protutijela na vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) koji ciljano djeluje na tumorsko tkivo i ima manji profil nuspojava od klasičnih kemoterapeutika.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Karcinom debeloga i završnoga crijeva jedan je od najčešćih karcinoma te uzroka smrtnosti kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Iako medicinska znanost značajno istražuje i ulaže resurse u dijagnostiku i liječenje ove maligne bolesti, pojavnost novih slučajeva i smrtnost, u stalnom su porastu.

Svrha ovoga diplomskoga rada jest proučavanje stručnih i znanstvenih radova koji se odnose na genetsku podlogu razvoja kolorektalnoga karcinoma te značajnost proučavanja genetskih biljega za rano otkrivanje i liječenje bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

Za izradu diplomskoga rada, obrađena je stručna i znanstvena literatura iz bibliografske baze podataka PubMed u razdoblju od 2010. do 2021. godine. Znanstveni članci pretraživani su pod ključnim riječima: karcinom kolona (engl. *colon cancer*), kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*), kromosomska nestabilnost karcinoma kolona (engl. *chromosomal instability in colon cancer*), mikrosatelitska nestabilnost karcinoma kolona (engl. *microsatellite instability in colon cancer*), genski biljezi (engl. *genetic biomarkers*), Pretraživanja su također, obuhvatila radove objavljene na Portalu hrvatskih znanstvenih i stručnih časopisa Hrčak te Google Scholar pod ključnim riječima kolorektalni karcinom i karcinom kolona u istom razdoblju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

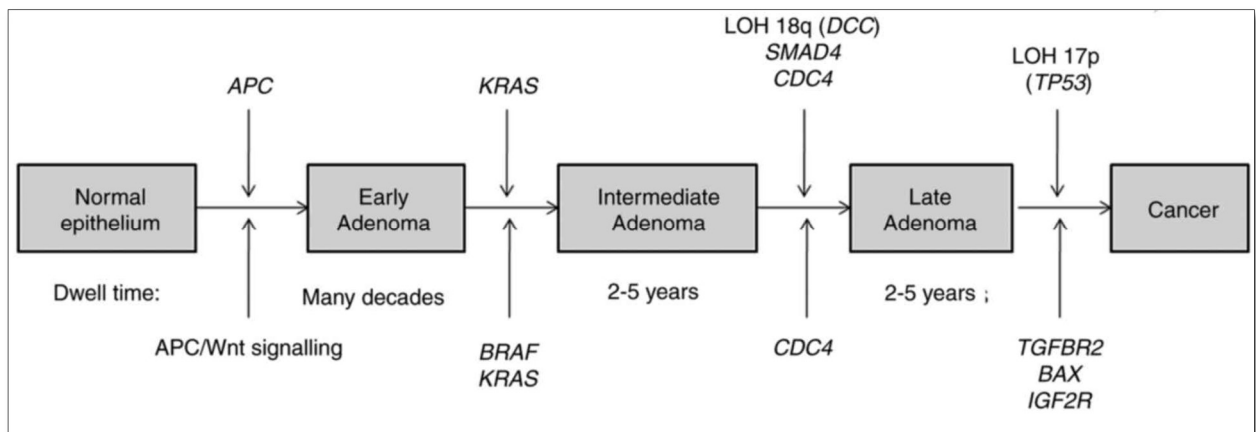
Karcinom kolona i rektuma (CRC) rezultat je nakupljanja genetskih mutacija somatskih (stečene) i/ili stanica germinativne linije (nasljedne) u vremenskom periodu od deset do petnaest godina.

Na dnu crijevnih kripti nalaze se epitelne matične stanice čijom diobom nastaje jedna staničica (ostaje matična) i druga koja proliferira i diferencira. Budući da su epitelne stanice crijeva smještene u nepovoljnom okruženju i u kontaktu s raznim mutagenima, žive nekoliko dana te se odbacuju u lumen crijeva. Obnova crijevnoga epitela neprestano se događa diobom matičnih stanica u populaciju prijelazno-umnažajućih stanica koje se kasnije diferenciraju u stanice površinskog epitela crijeva (apsorptivne, peharske i enteroendokrine stanice) (Cooper i Hausman, 2010).

Iako matična stanica opisanim načinom diobe štiti genom, javljaju se nestabilnosti u genima. Glavni mehanizmi nastanka CRC-a uključuju kromosomsku nestabilnost (engl. *chromosomal instability pathway*, CIN), mikrosatelitsku nestabilnost (engl. *microsatellite instability pathway*, MSI) i hipermetilacije CpG otoka (CIMP) (Recio-Boiles i Cagir, 2021).

4.1. Kromosomska nestabilnost (CIN)

Najčešći oblik genske nestabilnosti prisutan u 85 % kolorektalnoga karcinoma (adenokarcinomski slijed) jest kromosomska nestabilnost. Karakterizira je visoka stopa amplifikacija ili delecija dijelova kromosoma, a posljedično nastaje aneuploidija, gubitak heterozigotnosti i rearanžman kromosoma. Akumuliraju se mutacije u specifičnim onkogenima poput *KRAS* i *BRAF*, te tumorskim supresorskim genima *APC* i *TP53*. Genetički model karcinogeneza kolorektalnoga karcinoma Fearona i Vogelsteina, pokazuje kako se inaktivacija *APC* gena na kromosomu 5q događa u ranom stadiju nastanka adenoma. Aktivacija signalnog puta Wnt putem mutacije *APC* može započeti nastanak adenoma. Slijede mutacije u onkogenima *KRAS* i *BRAF* (adenomatozna faza), a u kasnijoj fazi tumorigeneze, pojavljuju se delecija kromosoma 18q, inaktivacija tumorskoga supresorskog gena *TP53* na kromosomu 17p (Nguyen i Duong, 2018).



Slika 3. Molekularni slijed karcinogeneze CRC-a, preuzeto i prilagođeno prema Nguyen i Duong, 2018.

Mehanizmi koji također dovode do nastanka kromosomske nestabilnosti jesu defekti u kromosomskoj raspodjeli (anafaza) i disfunkcija telomera.

Kontrolna točka sklopa mitotičkoga vretena glavni je mehanizam provjere staničnoga ciklusa koji odgađa početak anafaze sve dok se udvostručene kromatide pravilno ne rasporede u metafaznoj ravnini. Defekti u ovoj kontrolnoj točki, dovode do nejednolike kromosomske raspodjele te posljedično do aneuploidije, nepravilanog broja kromosoma u stanicama kćeri. Somatske mutacije u genima *hZw10*, *hZwilch*, *hRod* (kodiraju kinetohorne proteine važne za kontrolu mitoze) i prekomjerna ekspresija CENP-E (protein E vezan za centromeru) primijećene su u CRC-u. Također, nastanak CIN-a u CRC-ima povezuje se pretjeranom ekspresijom gena *AURKA* i *PLK1* koji kodiraju kinaze vezane na centrosom (Pino i Chung, 2010).

Drugi mehanizam koji dovodi do nastanka CIN-a je disfunkcija telomera, odnosno DNA-proteinskih kompleksa koji štite krajeve eukariotskih kromosoma od oštećenja tijekom razdvajanja. Nakon svake diobe stanice gubi se dio telomerne DNA i kada se postigne kritična duljina telomera, pokreću se kontrolne točke oštećenja DNA kojom se aktiviraju putevi koji vode starenju stanice i apoptozi. Prilikom oštećenja telomera, kromosomski krajevi ulaze u ciklus lom-fuzija-most (engl. *breakage-fusion-bridge*) koja se može događati tijekom više generacija te dovesti do genomske nestabilnosti. Aktivnost telomeraza, enzima koji produljuju telomere, povećana je u CRC-ima. U kasnijim fazama karcinogeneze, aktivnost telomeraza pridonosi besmrtnosti tumorskih stanica te je primijećeno kako je u stadijima C i D (Dukes) povećana duljina telomera u usporedbi s A i B stadijima (Pino i Chung, 2010).

4.1.1. Tumorski supresorski gen *APC*/Wnt signalni put

APC (engl. *adenomatous polyposis coli*) je tumorski supresorski gen na kromosomskom položaju 5q21 koji u normalnim uvjetima blokira prijelaz iz G1 u S fazu staničnoga ciklusa (Armaghani i sur., 2012). Wnt signalni put potiče proliferaciju matičnih stanica prilikom obnavljanja stanica u debelom crijevu zbog čega poremećena aktivnost tih signalnih puteva dovodi do nastanka karcinoma kolona. (Cooper i Hausman, 2010).

Važnu ulogu u Wnt signalizaciji ima beta-kenenin, kodiran *CTNNB1* genom, koji se razgrađuje pod utjecajem APC proteina te se zaustavlja Wnt signalizacija. Mutirani *APC* gen ili mutacije u beta-keneninu uzrokuju nakupljanje beta-kenenina koji odlazi u jezgru, stvara kompleks s transkripcijskim čimbenikom TCF/LEF (engl. *T cell factor/lymphoid enhanced factor*) i dovodi do pretjerane aktivacije Wnt signalnog puta čime se potiče proliferacija, migracija, invazija i metastaziranje kancerogenih stanica (Nguyen i Duong, 2018).

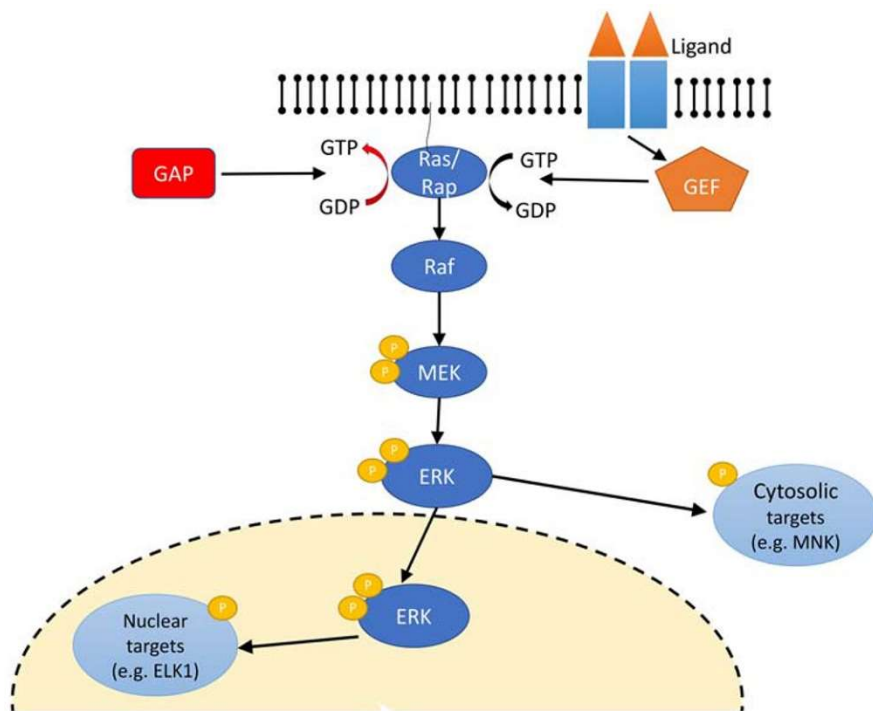
Mutacije u *APC* genu ili delecije alela odgovorne su za pojavu 90 % CRC-a, a ako su nastale u zametnoj liniji tada su uzrok familijarne adenomatozne polipoze (FAP), karakterizirane stotinama dobroćudnih adenoma debeloga crijeva koje je potrebno ukloniti prije nego što postanu maligni (Cooper i Hausman, 2010; Nguyen i Duong 2018). Sporadični slučajevi CRC-a povezuju se s mutacijama ili delecijom alela *APC* gena u somatskim stanicama. Približno 5-10 % mutacija drugih komponenata Wnt signalizacije, poput *CTNNB1* gena pridonosi razvoju CRC-a (Koveitypour i sur., 2019).

4.1.2. *KRAS* onkogen

RAS geni kodiraju Ras proteine (p21) koji mogu vezati gvaninske nukleotide (GDP se veže na inaktivni oblik Ras proteina, dok aktivni oblik veže GTP) i imaju sposobnost hidrolize GTP-a međusobnim djelovanjem proteina koji aktiviraju GTP-azu i Ras-GTP kompleks (Cooper i Hausman, 2010). Ras proteini smješteni su na unutrašnjoj površini stanične membrane i sudjeluju u prijenosu mitogenih signala do stanične jezgre u odgovoru na faktore rasta kako bi stanice proliferirale ili se diferencirale (Štraus i Rumora, 2009).

Točkasta mutacija u *RAS* protoonkogenu stvara *RAS* onkogen: *KRAS* (gen virusa Kirstenova sarkoma), *HRAS* (gen virusa Harveyeva virusa) i *NRAS* (na kratkom kraku ljudskog kromosoma 1). K-ras proteini u ljudskim karcinomima, neprestano su aktivirani te je neregulirana stanična proliferacija (Štraus i Rumora, 2009). Mutacija onkogene *KRAS* nalazi se u oko 50 % karcinoma kolona koja inducira proliferaciju mutacije u *APC* u stanicama i inhibira programiranu staničnu smrt (Damjanov i sur., 2018). Približno 90 % mutacija pronađena je na kodonima 12 i 13 na egzonu 1, a 5 % mutacija nalazi se na kodonu 61 na egzonu 2 (Pons i Correa, 2015).

Jedan od staničnih puteva prijenosa signala u koju su uključeni Ras proteini je signalni put Ras-Raf-MAP-kinaza. Aktivacija MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinases*) događa se u prisutnosti faktora rasta koji sjedaju na EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) te pripadaju porodici ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*). Aktivirani Ras-proteini aktiviraju Raf (protein-serin/treonin-kinaze) koji će fosforilirati protein kinazu dvostruke specifičnosti MEK (MAP kinaza/ERK kinaza). MEK će fosforilacijom na treoninskom i tirozinskom ostatku aktivirati ERK koji će ulaskom u jezgru aktivirati transkripcijski faktor Elk-1. Prilikom normalnih uvjeta, aktivnost kompleksa Ras-GTP prestaje zbog hidrolize GTP-a, no kod mutiranih K-ras proteina nema GTP-azne aktivnosti i GTP je stalno vezan zbog čega su takvi proteini neprestano aktivirani što potiče nekontroliranu proliferaciju stanica karcinoma (i u odsutnosti faktora rasta) (Cooper i Hausman, 2010).



Slika 4. Signalni put Ras-Raf-MAP-kinaza, preuzeto i prilagođeno prema <https://europepmc.org/article/pmc/pmc7127974>

4.1.3. *BRAF* onkogen

Gen *BRAF* nalazi se na kromosomu 7 (7q34), kodira za BRAF protein-serin/treonin kinazu i sudjeluje u Ras-Raf-MAPK signalnom putu koji je odgovoran za stanični rast, diferencijaciju, proliferaciju, starenje i apoptozu (Hussain i sur., 2015). Ras-Raf-MAPK signalizacija sastoji se od malih Ras proteina (vežu GTP), aktiviraju RAF porodicu proteina (BRAF, ARAF, RAF1) koji fosforiliraju MEK proteine, a oni aktiviraju ERK te u konačnici dolazi do aktivacije transkripcijskog faktora Elk-1 i regulacije staničnih aktivnosti (Sanz-Garcia i sur., 2017).

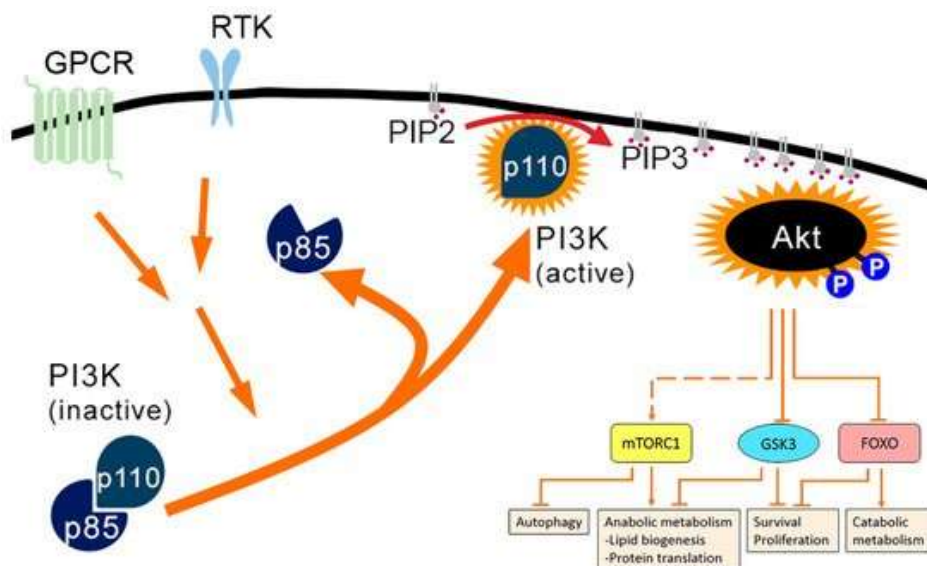
Mutacije mogu članove porodice gena *RAF* pretvoriti u onkogene zbog čega se poremeti regulacija aktivnosti Raf proteina. Kako se u signalnom putu Raf nalazi odmah iza Ras-a, aktivacija *KRAS* i *BRAF* onkogene dovode do aktivacije ERK u tumorskim stanicama, fosforilacije transkripcijskih faktora te promjena u ekspresiji gena (Cooper i Hausman, 2010).

Približno 90 % svih BRAF mutacija čini transverzija T1799A na egzonu 15 koja rezultira supstitucijom aminokiseline valin glutamatom na položaju 600 proteina (V600E mutacija). Mutirana aminokiselina oponaša regulatornu fosforilaciju te uzrokuje povećanu kinaznu aktivnost BRAF proteina otprilike 10 puta u usporedbi s proteinom divljega tipa. Između 8-12 % slučajeva metastatskoga kolorektalnog karcinoma povezuje se s BRAF mutacijama. Veća učestalost mutacija pronađena je u tumorima proksimalnoga debelog crijeva (uzlazni i poprečni kolon), slabije diferenciranim, mucinozne histologije, tumori nastali MSI-om i velikim primarnim tumorima (Sanz-Garcia i sur., 2017).

4.1.4. *PIK3CA* onkogen

Gen *PIK3CA* (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) kodira protein p110 alfa, katalitičku podjedinicu PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaza), klase I. Signalni put PI3K/Akt aktiviran EGFR signalizacijom, uključuje stanični rast, pokretljivost, proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i jedan je od najčešćih nereguliranih puteva karcinogeneze u ljudi (www.atlasgeneticsoncology.org).

PI3K fosforilira PIP2 (fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat) i pretvara ga u PIP3 (fosfatidilinozitol 1,4,5-trisfosfat) koji se potom veže za domenu homolognu plekstrinu na Akt (protein-serin/treonin-kinaza). Akt se premješta na unutarnju stranu membrane gdje se aktivira kinazom PDK1 i mTORC2 kompleksom. Tako aktivirana Akt fosforilira transkripcijske faktore (FOXO), proteine koji su izravni regulatori staničnoga preživljenja (Bad) i druge proteinske kinaze (GSK-3). FOXO (uzrokuje staničnu smrt) i GSK-3 (nadzire metabolizam te staničnu proliferaciju), nakon fosforilacije s Akt, ostaju u inaktivnom stanju (Cooper i Hausman, 2010). Dakle, aktivacija Akt rezultira staničnom proliferacijom i preživljavanjem.



Slika 5. Aktivacija PI3K-AKT signalnog puta, preuzeto i prilagođeno prema <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/970/htm>

Somatske mutacije u *PIK3CA* genu (ekson 9 i/ili 20) pojavljuju se u 10-20 % slučajeva CRC-a i povezane su s *KRAS* mutacijama te hipermetilacijom CpG otoka (Hamanda i sur., 2017). Mutacija *PI3K* kod pacijenata s *KRAS* divljim tipom tumora pokazuje lošiju prognozu za specifičnu smrtnost od karcinoma kolona (Ulamec i Krušlin, 2014). Isto tako, malignosti benignih lezija mogu pridonijeti amplifikaciji Akt-a (regulira aktivnost različitih posrednika staničnoga preživljavanja) i hipraktivaciji mTORC1 (uključen u regulaciju staničnog rasta, sintezu proteina i autofagiju putem S6 kinaze) (Koveitypour i sur., 2019).

Također, važno je istaknuti još jednu tumorsku supresorsku molekulu, PTEN (engl. *phosphatase and tensin homologue protein*) koja defosforilira PIP3 i inhibira PI3K/Akt signalizaciju. Mutacije *PTEN* gena primijećene su u 20-40 % CRC-a. Najčešće se događa gubitak ekspresije gena pa tako i funkcije PTEN proteina (Koveitypour i sur., 2019).

4.1.5. LOH 18q i *DCC*

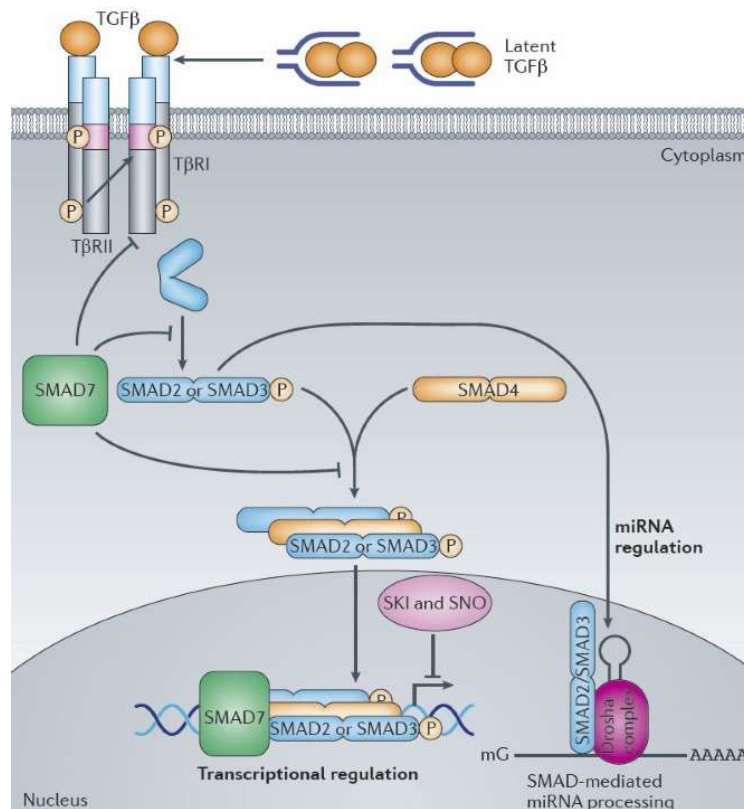
LOH 18q (engl. *loss of heterozygosity*) označava gubitak jednoga ili oba alela na kromosomu 18q, a smatra se da većina takvih gubitaka nastaje zbog nepravilnoga mitotskog razdvajanja u anafazi. U početku je gen *DCC* (engl. *deleted in colorectal carcinoma*) bio predstavljen genom koji kodira za tumorski supresorski protein DCC, no kasnije je utvrđeno kako je njegov produkt stanični površinski receptor za živčani protein netrin-1 (Pino i Chung, 2010). DCC blokira stanični rast u odsutnosti netrina-1 koji se stvara duboko u kriptama crijevne mukoze, a kako se epitelne stanice vremenom pomiču prema površini tako se količina netrina-1 smanjuje (Armaghany i sur., 2012).

Približno 70 % CRC-a pokazuje gubitak heterozigotnosti u dijelu *DCC* gena. Mutacija u *DCC* genu, onemogućava vezanje liganda netrina-1 za transmembranski DCC receptor te posljedično stanice abnormalno preživljavaju. Apoptotički učinak DCC-a može nadvladati također pretjerana ekspresija netrina-1 što se događa u kasnijim stadijima CRC-a (Armaghany i sur., 2012).

4.1.6. *TGFBR2*, *SMAD2/SMAD4*

Geni *TGFBR2*, *SMAD2* i *SMAD4* pripadaju skupini tumorskih supresorskih gena.

TGFBR2 (engl. *transforming growth factor beta receptor 2*) kodira receptor za TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*), a *SMAD2* i *SMAD4* kodiraju transkripcijske faktore koje aktivira signalizacija putem TGF- β te se zaustavlja stanična proliferacija. Stanični ciklus prestaje u G1 fazi pomoću inhibitora Cdk p15, p21, p27 i p57. Signalizacija putem receptora za TGF- β čimbenika rasta počinje vezanjem TGF- β na proteinske serinske/treoninske kinazne receptore koji sadrže polipeptide tipa I i II (združeni nakon vezanja liganda). Receptor tipa II fosforilira tip I koji zatim fosforilira transkripcijske čimbenike obitelji Smad. Aktivirani proteini Smad stvaraju komplekse i prelaze u jezgru gdje potiču transkripciju gena (Cooper i Hausman, 2010).



Slika 6. TGF- β signalni put, preuzeto i prilagođeno prema

<https://www.nature.com/articles/nrd3810>

TGF- β djeluje kao tumorski supresorski protein u normalnim epitelnim stanicama kolona tako što inhibira staničnu proliferaciju, a aktivira diferencijaciju i apoptozu. CRC-i koji izgube odgovor na TGF- β , rezistentni su na TGF- β induciranu inhibiciju staničnoga rasta. Međutim, pokazalo se kako je u uznapredovalom CRC-u, TGF- β pretjerano eksprimiran i povećava stvaranje mitotičkih faktora rasta (TGF- α , FGF, EGF) te se tako ponaša kao tumorski promotor (Koveitypour i sur., 2019).

Približno 10-15 % sporadičnih slučajeva CRC-a pokazuju mutacije u genu *TGFBR2* koje se češće očituju kao MSI s otprilike 80 % slučajeva s mutacijama pomicanja okvira čitanja (engl. *frame-shift mutation*) na poliadenozinskom mjestu (egzon 4) (Fleming i sur., 2013).

Istraživanja pokazuju kako inaktivacija gena *TGFBR2* također doprinosi razvoju CRC-a tako što se povećava stanična proliferacija zbog produljene aktivacije Cdk4 (Koveitypour i sur., 2019).

SMAD2 i *SMAD4* nalaze se na kromosomu 18q koje je uobičajeno mjesto gubitka heterozigotnosti pa se gubitkom toga kromosoma inaktivira TGF- β signalizacija, izbjegava apoptoza i potiče stanična proliferacija. Mutacije *SMAD2* pronađene su u približno 3-6 % slučajeva CRC-a, dok *SMAD4* mutacije u oko 20-30 % CRC-a (Koveitypour i sur., 2019). Mutacije *SMAD4* u zametnoj lozi uzrok su nastanku juvenilnoga polipoznog sindroma (autosomno dominantan poremećaj) gdje postoji predispozicija za višestruke gastrointestinalne polipe i karcinom (Fleming i sur., 2013).

4.1.7. Tumorski supresorski gen *TP53*

Gen *TP53* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 17p i kodira protein p53 koji se aktivira nakon oštećenja DNA, aktivacija onkogen te inhibira stanični ciklus, inducira apoptozu ili starenje (Li i sur., 2015). Dakle, p53 djeluje na način da zaustavlja stanični ciklus i pokreće popravak oštećenja prije nego se takva DNA replicira, a ukoliko se oštećenja ne uspiju popraviti, p53 aktivira apoptozu kojom se uklanjaju stanice iz kojih bi mogao nastati maligni tumor (Vrdoljak i sur., 2013). Protein p53 zaustavlja napredak staničnog ciklusa indukcijom inhibitora Cdk p21, a učinak na apoptozu posredovan je aktivacijom proapoptotičkih članova Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma-2*) porodice Noxa i PUMA (Cooper i Hausman, 2010). Cdk kinaze (engl. *cyclin-dependent kinases*) i ciklini glavni su regulatori ciklusa-diobe stanica, a p21 (WAF1) meta je gena *TP53* pomoću kojega se zaustavlja prijelaz iz G1 u S te G2 u M fazu (Li i sur., 2019).

Stanice bez p53 ne uspijevaju zaustaviti stanični ciklus niti se ukloniti apoptozom prilikom oštećenja DNA (zračenje, kemoterapeutici) zbog čega se stvaraju česte mutacije i genetska nestabilnost (Cooper i Hausman, 2010). Mutacije u *TP53* dovode do nastanka mutantnoga proteina koji dopušta stanici ulazak u ciklus te je pojačano eksprimiran kod oko 70 % CRC-a (Štraus i Rumora, 2009). Dva glavna genetička mehanizma p53 mutacija uključuju *missense* mutacije (pogrešne mutacije) i delecija *TP53* gena (LOH 17p). Većina *missense* mutacija događa se u egzonima 5-8 (DNA vezujuća domena) i uglavnom u kodonima 175, 245, 248, 273, 282 koji obuhvaćaju nuklotidni prijelaz C u T ili G u A čime dolazi do supstitucije druge aminokiseline te nastaje poremećaj specifičnoga vezanja DNA (Li i sur., 2015). Delecija *TP53* gena pretežito je potaknuta insercijama, delecijama, mutacijama pomicanja okvira čitanja i rezultira gubitkom tumorske supresorske funkcije zahvaćenoga alela *TP53* (Li i sur., 2019). Ishodi *TP53* mutacija, osim gubitka funkcije divljeg tipa p53, može biti dobitak funkcije (engl. *gain-of-function*, GOF) gdje protein p53 ima pojačan onkogeni učinak, potiče stvaranje i napredak tumora (Li i sur., 2019). Primijećeno je kako su pacijenti s mutiranim p53 kemorezistentniji i lošije prognoze u odnosu na CRC pacijente s divljim tipom p53 (Li i sur., 2015).

Mutacije u zametnoj liniji ili nasljeđene mutacije *TP53* gena mogu biti uzrok Li-Fraumeni sindromu (LFS), autosomno-dominantnoj nasljednoj predispoziciji za ranu pojavu karcinoma u različitim tkivima prema porijeklu (adenokortikalni karcinom, tumor mozga, rak dojke, CRC, melanom, leukemija/limfomi). Brojne studije potvrdile su *missense* mutacije zametne linije *TP53* gena u visoko očuvanoj DNA vezujućoj domeni. Mutacije u zametnoj liniji *TP53* pronađene su u 75 % pacijenata s LFS-om, a vjerojatnost da će osoba koja nosi mutaciju *TP53* tijekom života razviti karcinom približava se 75 % kod muškaraca i 100 % kod žena (Guha i Malkin, 2017).

4.1.8. *NM23* gen

Metastazni supresorski gen *NM23-H1* (engl. *metastasis inhibition factor nm23*) kodira protein nukleozid-difosfat-kinazu i sudjeluje u sintezi većine nukleozid-trifosfata, staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, ekspresiji gena i prijenosu signala preko receptora za faktor rasta (<https://www.genecards.org>). Gen *NM23* sastoji se od dva homologna gena *NM23-H1* i *NM23-H2* koji su smješteni na kromosomskom položaju 17q22 (Jin i Dain, 2016). Protein *NM23-H1* prirodno je eksprimiran u jezgri i citoplazmi svih somatskih stanica te na površini većine hematopoetskih stanica (Tripković i sur., 2012).

Studija Jin i Dai (2016) proučavala je ulogu mutacije *NM23-H1* gena u CRC-u, koristeći metodu analize konformacijskog polimorfizma jednolančane DNA (engl. *single strand conformation polymorphism*, SSCP) za određivanje točkaste mutacije i imunohistokemijsku metodu za utvrđivanje ekspresije gena. Analizirano je 63 uzorka ljudskoga tkiva CRC-a iz bolnice Shangai Pudong-Sveučilište Fudan. Točkaste mutacije gena *NM23-H1* analizirane su od 2. do 5. egzona te je utvrđeno kako uzorci DNA produkata gena od 2. do 4. egzona pokazuju dvije vrpce, dok 5. egzona četiri vrpce u SSCP detekciji. Zatim je analiziran kodirajući protein i otkriveno je kako samo 5. sekvenca eksona ima polimorfizam. Sinonimna mutacija, pronađena je na 360. poziciji baza zamjenom T u C, međutim kodirajuća aminokiselina serin ostala je ista (AGT u AGC). Razina ekspresije gena *NM23-H1* smanjena je ili izgubljena u invazivnom karcinomu kolona u usporedbi sa susjednim normalnim tkivima, a točkasta mutacija nije dominantan uzrok metastatskoga CRC-a. Čini se da je *NM23* presudan za inhibiciju adhezije stanica-stanica i invazivnu migraciju jer je pojačana ekspresija proteina *NM23* spriječila metastaze kod kineskih pacijenata s tumorima probavnoga sustava.

Jedna druga studija Tripković i sur. (2012) provedena na Sveučilišnom odjelu za kirurgiju (Bolnički centar u Splitu) koja je obuhvaćala 100 pacijenata s CRC-om podvrgnutih kirurškom liječenju, istraživala je povezanost imunohistokemijske ekspresije *NM23* gena u stanicama CRC-a s Duksovom klasifikacijom proširenosti tumora, pojavom, udaljenosti metastaza i preživljavanjem. Imunohistokemijskom metodom određivala se ekspresija *NM23* u tumorskom epitelu, a kasnije se primijenila polu-kvantitativna procjena (ocjena 0-3). Pozitivan rezultat smatrao se citoplazmatsko bojenje tumorskih stanica, a reakcija je procijenjena zbrojem udjela i intenziteta mrlje. Rezultati istraživanja pokazali su kako nema razlike u ekspresiji gena *NM23* u normalnoj crijevnoj sluznici i primarnom karcinomu kolona. Pretjerana ekspresija *NM23* povezuje se s kliničkim stadijem A (Dukes) i dobro diferenciranim tumorom što ukazuje na protektivnu ulogu gena u ranoj tumorigenezi. U kasnijim fazama razvoja karcinoma, drugi tumorski supresorski geni i onkogeni mogu potisnuti učinak gena *NM23* što omogućuje nastanak malignijih fenotipa i veću sposobnost invazije te metastaziranje tumorskih stanica.

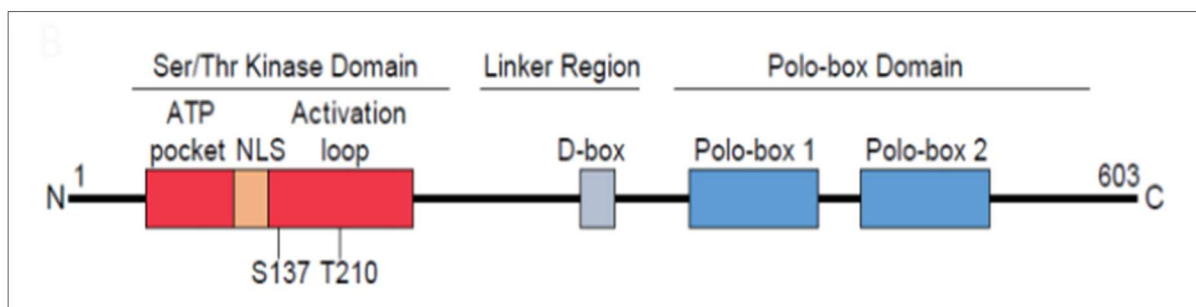
4.2. Mitotičke kinaze

Ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, a samim time i CIN-a, imaju mitotičke kinaze (PLK-1, AURORA, CDK-1, Bub-1) koje pokreću regulatorne povratne i signalne petlje te dolazi do zaustavljanja staničnoga ciklusa ili napredovanja kroz kontrolne točke. Radeći zajedno, kinaze reguliraju čitav niz kontrolnih točaka staničnoga ciklusa, efektorskih proteina, a njihova deregulacija povezuje se s višestrukim zloćudnim tumorima. Pronađena je povišena ekspresija tih molekula u tumorskim stanicama te su istaknute kao potencijalni terapijski ciljevi. Preciznije razumijevanje njihove uloge u malignostima trebalo bi pružiti nove mogućnosti za njihovo iskorištavanje u svrhu liječenja (Cunningham i sur., 2020).

4.2.1. *PLK-1*

PLK-1 gen kodira serin/treonin-proteinsku-kinazu PLK-1 (engl. *polo-like kinase 1*) koja ima važnu ulogu u M fazi staničnoga ciklusa, proliferaciji, regulaciji sazrijevanja centrosoma i diobenoga vretena, inaktivaciji inhibitora kompleksa/ciklosoma (APC/C) te regulaciji mitotičkoga završetka i citokinezi. PLK-1 djeluju tako što vežu i fosforiliraju, putem polo-slog domene, specifične motive na već fosforiliranim proteinima, a imaju ključnu ulogu u funkciji centrosoma i bipolarnom sklopu vretena fosforilacijom KIZ, NEDD-1 i NINL. Fosforilacija NEDD-1 (engl. *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated*) potiče vezanje gama-tubulinskog prstena (gTuRC) na centrosom koji je važan korak za formiranje vretena (<https://www.genecards.org>).

Shematski prikaz PLK-1 strukture pokazuje glavne domene kinaze; Ser/Thr-kinaznu domenu, povezujuću regiju i polo-slog domenu. Katalitička aktivnost potrebna je za aktivaciju fosforilacije na ostacima T210 i S137, a mjesto za signalizaciju razgradnje u proteasomu naziva se D-slog. NLS usmjerava PLK1 u jezgru, dok polo-slog domena povezuje PLK1 na centrosom i supstrate. PLK1 kinaza prvenstveno je eksprimirana u stanicama koje se aktivno dijele te je gotovo nemoguće uočiti njenu pojavu u stanicama koje ne proliferiraju. Njena povišena ekspresija može dovesti do replikacijskoga stresa koji vode do dvostrukih lomova DNA. Način na koji PLK-1 potiče replikaciju DNA prilikom oštećenja DNA (induciranim stresom poput ultraljubičastog zračenja) jest fosforilacija ORC2 (engl. *origin recognition complex subunit 2*) ili regulacijom geminina, inhibitora replikacije DNA (Cunningham i sur., 2020).



Slika 7. Shematski prikaz strukture PLK-1 kinaze, preuzeto i prilagođeno prema Cunningham i sur., 2020.

PLK-1 važna je molekula za proliferaciju mnogih ljudskih tumora, uključujući i CRC.

Prema istraživanju Takahashi i sur. (2003), u uzorcima CRC-a pokazala se velika učestalost snažne (++) ili umjereno pozitivne (+) reakcije u citoplazmi epitelnih stanica koje ekspimiraju PLK-1. Prilikom kliničko-patološke karakterizacije, nije pronađena značajna povezanost između ekspresije PLK-1 i spola, dobi, lokalizacije tumora te histološke diferencijacije. Prethodna su istraživanja općenito pokazala povećanu razinu PLK-1 u brzo proliferirajućim stanicama i lošiju prognozu u pacijenata s njenom prekomjernom ekspresijom. PLK-1 jest značajno povezana s tumorskim stadijem, progresijom, invazijom i metastazama u limfnim čvorovima, međutim ne povezuje se s udaljenim metastazama (M). Također, akumulacija tumorskoga supresorskog gena *TP53* značajno je povezana s prekomjernom ekspresijom PLK-1.

4.2.2. AURORA KINAZE

Postoje tri člana porodice aurora kinaza koje reguliraju diobeno vreteno, razdvajanje kromosoma i sazrijevanje centrosoma. To su serinske/treoninske-kinaze koje kontroliraju staničnu proliferaciju od ulaska u mitozu do citokineze, a razina kinaza raste od G2 do M faze (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/aurora-a-kinase>).

Aurora kinaza A kodirana je genom *AURKA*. Gen ima važnu ulogu u razdvajanju kromosoma tijekom mitoze, sudjeluje u tvorbi polova diobenoga vretena i sazrijevanju centrosoma (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/aurora-a-kinase>). Prema istraživanju Chuang i sur. (2016), pretpostavlja se da amplifikacija 20q kromosoma dovodi do pretjerane ekspresije gena *AURKA* (20q11) što potiče malignu transformaciju tijekom razvoja CRC-a. Budući da visoke razine *AURKA* povećavaju brzinu stvaranja vretenastih vlakana, pretpostavlja da bi povišena ekspresija *AURKA* u polipima mogla povećati CIN (Chuang i sur., 2016.).

Aurora kinaza B (*AURKB*) čiji je gen smješten na kromosomu 17p13, pripada obitelji kromosomskih proteina putnika te je bitna za točnost kromosomskoga razdvajanja, orijentacije, kondenzacije kromosoma, stvaranje nuklearne ovojnice i citokinezu. Regija kromosoma 17p13 nije uobičajeno mjesto amplifikacije gena u tumorima te ona izostaje, međutim neke su studije pokazale povišena ekspresija mRNA i proteina u nekoliko zloćudnih bolesti povezanih s invazijom limfnih čvorova, proliferacijom i metastazama. Jedna druga studija pokazala je kako povišena ekspresija *AURKB* može pridonijeti progresiji karcinoma stvaranjem aneuploidije tako što se povećava mitotička fosforilacija na histonu H3 (Ser-10) (Pohl i sur., 2011).

Za razliku od *AURKA* i *AURKB* koje su eksprimirane u većini normalnih tipova somatskih stanica, Aurora C kinaza (*AURKC*) većinom se nalazi u testisima i jajnicima što pokazuje specifičnu ulogu u regulaciji kromosomske segregacije mejoze (Pohl i sur., 2011). *AURKC* nalazi se na kromosomu 19 (19q13) te na razini proteina dijeli homologiju sekvenci s *AURKA* (60 % identično) i *AURKB* (75 % identično) u domeni kinaze (Quartuccio i Schindler, 2015). *AURKC* prekomjerno je eksprimirana u mnogim staničnim linijama raka, a njena povišena ekspresija u mitotičkim stanicama dovodi do amplifikacije centrosoma i multinukleacije (Quartuccio i Schindler, 2015). *AURKC* i *AURKA* lokaliziraju se u centrosomima tijekom interfaze i imaju ulogu u grupiranju centrosoma zbog toga su nove terapije raka usmjerene na inhibiciju grupiranja centrosoma uklađanje prisiljava stanice

karcinoma na formiranje multipolarnog vretena i izaziva staničnu smrt (Quartuccio i Schindler, 2015).

4.2.3. *SKA3*

Gen *SKA3* (engl. *spindle and kinetochore associated complex subunit 3*) kodira komponentu proteinskoga kompleksa povezanoga s vretenom i kinetohorima koji regulira vezivanje mikrotubula za kinetohore tijekom mitoze te je potreban za normalnu segregaciju kromosoma i diobu stanica (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SKA3>).

Nalazi se na kromosomu 13q i identificiran je kao novi gen u poticanju maligne transformacije. Više razine *SKA3* gena povezuju se s višom razinom AURKA što pokazuje kako su ovi proteini međusobno povezani te doprinose visokoj kromosomskoj nestabilnosti. Međusobni utjecaj ovih proteina može biti važan doprinos zloćudnoj transformaciji CRC-a (Chuang i sur., 2016).

Otkriveno je kako stanice s niskom razinom *SKA3* postižu poravnanje metafaza, ali ne uspijevaju utišati kontrolnu točku diobenog vretena niti ući u anafazu, a nakon duljega vremena zastoja u metafazi, kromatide se odvajaju i zadržavaju krute kinetohone mikrotubularne veze (Darum i sur., 2009).

4.3. ZG16

Gen *ZG16* (engl. *zymogen granule 16*) nalazi se na kromosomu 16, ima ulogu u transportu proteina, povezuje submembranski matriks na luminalnoj strani membrane zimogene granule (ZGM) s pridruženim sekretornim proteinima tijekom stvaranja granula u trans Golgijevoj mreži (TGN) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174992-ZG16>).

Istraživanja pokazuju kako gubitak gena *ZG16* ima važnu ulogu u inicijaciji i progresiji CRC-a te bi mogao poslužiti kao potencijalni biljeg za dijagnozu i prognozu bolesti. Budući da, protein ZG16 posjeduje lektinsku domenu, pripisuju mu se važne funkcije od stimulacije T stanica do prepoznavanja i inhibicije tumorskih stanica. Primarno se nalazi u zrelim epitelnim stanicama donjega probavnog sustava, a može biti važna komponenta zaštitnog sloja sluzi koja dijeli epitel domaćina od komezalnih bakterija u debelom crijevu. Značajan gubitak gena u CRC-u može poremetiti dobro organizirani sustav nadzora i olakšati invaziju bakterija u sustav domaćina. Tako mogu nastati lokalne upalne promjene i povećani rizik od razvoja raka (Meng i sur., 2018).

4.4. Mikrosatelitska nestabilnost (MSI)

Jedan od mehanizama nastanka CRC-a jest MSI koja se pojavljuje u 15-20 % sporadičnih slučajeva, dok je učestalost u nasljednom nepolipoznom CRC (Lynchov sindrom) iznad 95 % (Nguyen i Duong, 2018).

Mikrosatelite (engl. STR, *short tandem repeats*, *kratka tandemska ponavljanja*) predstavljaju ponavljajuće sljedove od 1-6 parova baza koji se tandemski ponavljaju u genomu. Oni predstavljaju približno 3 % ljudskoga genoma te su sklони visokoj stopi mutacija. MSI u tumorskoj DNA podrazumijeva molekularni fenotip koji nastaje zbog neispravnosti u DNA popravilačkom sustavu (engl. MMR, *mismatch repair system*), odnosno mutacija u *MMR* genima. MMR sustav ispravlja pogrešno umetanje, deleciju i neusklađenost baza-baza nastale tijekom replikacije DNA i rekombinacije koje su izbjegle proces provjere DNA polimeraze. Glavni proteini uključeni u prokariotski MMR sustav uključuju MutS i MutL, a u eukariotima homolozi za MutS su MSH2, MSH3 i MSH6. Eukariotski homolozi za MutL su MLH1, MLH2 i MLH3 te homolozi PMS1 i PMS2 u post-mejotskom razdvajanju koji djeluju kao heterodimeri (Nojadedh i sur., 2018).

Postoje tri grupe mikrosatelitne nestabilnosti CRC-a: MSI-high (visoka), MSS (stabilna) i MSI-low (niska) koji se detektiraju mononukleotidnim i dinukleotidnim biljezima. CRC s više od 30 % nestabilnih lokusa smatraju se visokim MSI, tumori s 10-29 % nestabilnosti niskim MSI, a odsutstvo ekspresije MMR proteina u tumorskom tkivu ukazuje na MSS (Pons i Correa, 2015). MSI-visoki CRC-i su heterogeni, uzrokovani mutacijama u zametnoj lozi (Lynchov sindrom) ili somatskim mutacijama (sporadični) u različitim genima (Gatalica i sur., 2016).

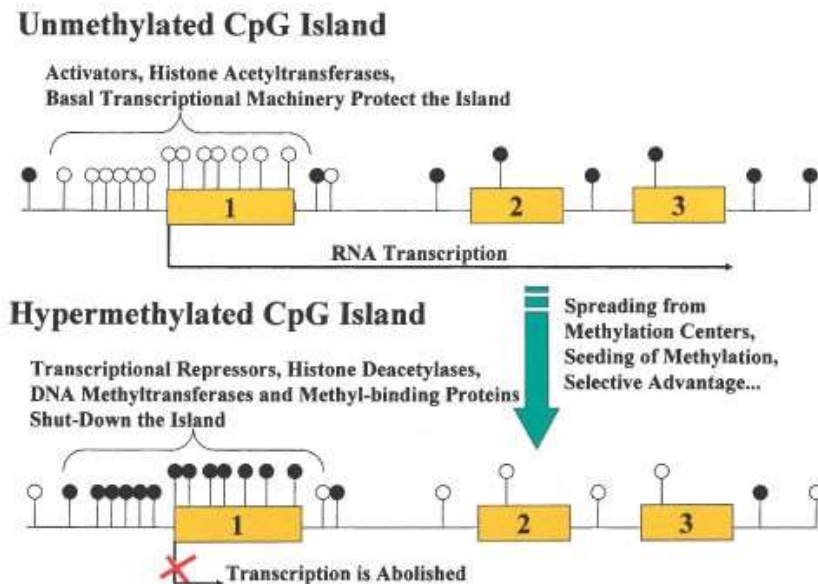
Lynchov sindrom ili nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. HNPCC, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*), autosomno dominantna je bolest koja nastaje zbog mutacija u zametnoj lozi u *MMR* genima (*MSH2* na kromosomu 2p16; *MLH1* na kromosomu 3p21; *MSH6* na kromosomu 2p16; *PMS2* na kromosomu 7p22). Budući da geni *MMR* kodiraju proteine koji su neophodni za pravilan popravak neusklađenih sljedova DNA te popravak malih delecija i insercija, inaktivacija tih gena ometa popravak DNA te dovodi do promijenjenih slijedova mikrosatelita i mikrosatelitske nestabilnosti (Nojadedh i sur., 2018).

Mutacije u *BRAF* genu prisutne su u 40-50 % sporadičom kolorektalnom karcinomu s visokim-MSI, ali gotovo nikad se ne nalaze kod pacijenata s Lynchovim sindromom. Stoga je status mutacije *BRAF* vrlo koristan biljeg za razlikovanje obiteljskoga od sporadičnoga CRC-a (Pons i Correa, 2015).

4.5. Hipermetilacija CpG otoka

Fenotip metilatora CpG otoka (engl. *CpG island methylator phenotype*, CIMP) u promotorskoj regiji tumorskih supresorskih gena, opisana je u gotovo svakom tumorskom tipu kao mehanizam inaktivacije gena i staničnih puteva poput popravka DNA, staničnoga ciklusa, apoptoze i stanične adhezije. CpG dinukleotidi nedostaju u ljudskom genomu zbog spontane deaminacije koja se događa tijekom razvoja zametne linije. Međutim, približno polovica ljudskih gena (promotorska regija) sadrži CpG bogate regije duljine 0,5 Kbp do nekoliko Kbp (CpG otoci) (Esteller, 2002).

Tipični CpG otoci ni u jednoj fazi razvoja ne podliježu metilaciji i dopuštaju ekspresiju određenoga gena uz prisustvo odgovarajućih transkripcijskih faktora. Maligna će stanica sadržavati određene CpG otoke tumorskih supresorskih gena koji su hipermetilirani što je najvjerojatnije postupan proces za razliku od točkastih mutacija nastalih iznenada. Postoje dvije teorije o nastanku ove nepravilnosti u metilaciji, jedna objašnjava metilaciju karcinoma tako da se ona širi iz normalnih centara metilacije koji okružuju CpG otok bez metilacije. Druga teorija tvrdi postojanje *usađene* metilacije i zbog toga se određeni CpG dinukleotidi otoka metiliraju što posljedično privlači više metilacije (Esteller, 2002).



Slika 8. CpG otok tumorskoga supresorskog gena u normalnoj i malignoj stanici, preuzeto i prilagođeno prema Esteller, 2002.

Uočeno je kako se epigenetsko utišavanje metilacijom citozina u CpG otocima promotorske regije tumorskih supresorskih gena uspostavlja složenim uzajamnim djelovanjem najmanje tri neovisno kodirane DNA metiltransferaze (DNMT1, DNMT3a i DNMT3b). U ljudskim tumorima česta je povišena ekspresija DNMT1 i DNMT3b. Homologna je rekombinacija primijenjena u staničnoj liniji raka debeloga crijeva HCT-116 kako bi se izbacila iz funkcije oba enzima, DNMT1 i DNMT3b. Aktivnost DNA metiltransferaze u tim stanicama gotovo je potpuno eliminirana i došlo je do 95 % smanjenja sadržaja 5-metilcitozina te demetilacije ponovljenih sekvenci. Također, studija je pokazala demetilaciju i ponovnu ekspresiju dvaju tumorskih supresorskih gena u tim stanicama, p16INK4a i TIMP3, što objašnjava blisku suradnju tumorskih supresorskih gena metiltransferaza. Hipermetilacija CpG otoka tih gena nije jedinstvena značajka stanične linije HCT-116, nego se nalazi i u drugim staničnim linijama raka debeloga crijeva, primarnim tumorima i adenomima kolona (Paz i sur., 2003).

Studija Wang i sur. (2014) istraživala je ekspresiju i ulogu tumorskoga supresorskog gena *ARHI* (engl. *Aplyasia ras homolog member 1, DIRAS3* gen) koji se nalazi na kromosomu 1p31 i kodira za protein koji veže GTP. Razina ekspresije *ARHI* značajno je snižena u uzorcima tkiva pacijenata s karcinomom kolona te se povezuje s lošijom prognozom i klasifikacijom prema Dukesu.

4.6. Značenje za dijagnostiku i prognozu

CRC je većinom asimptomatski sve dok ne napreduje u uznapredovale stadije, stoga je važno rano otkrivanje programom probira i praćenjem molekularnih biljega iz uzoraka krvi, stolice i tumora kako bi se ranije uspostavilo liječenje te u konačnici smanjila smrtnost. Veliki su pomaci u liječenju karcinoma kolona postignuti, međutim recidiv te metastaze tumora i dalje utječu na prognozu bolesti. Cilj je povećanje stope preživljavanja pacijenata zbog čega postoji hitna potreba za razvojem novih terapijskih ciljeva te novih minimalno invazivnih molekularnih biljega.

4.6.1. Molekularni testovi detekcije CRC-a

Očekivano je kako su molekularni testovi osjetljiviji i specifičniji od metoda kolonoskopije i testova stolice kojima se dijagnosticira karcinom u kasnijim fazama kod značajnoga broja pojedinaca. Intenzivna istraživanja usmjerena su na identificiranje molekularnih biljega u svrhu razvoja neinvazivnih novih dijagnostičkih metoda otkrivanja CRC-a. Idealan molekularni biljeg trebao bi biti siguran, jednostavan za mjerenje, pristupačan, omogućiti otkrivanje genomske promjene i/ili varijacije u ekspresiji proteina koje specifično koreliraju s bolešću pomažući liječnicima prilikom dijagnoze. Svoju primjenu nalaze i u procjeni rizika od budućih bolesti, agresivnosti malignosti tijekom vremena i vjerojatnosti da će pacijent reagirati na određeni tretman (pomoć kod personalizirane terapije) (Pons i Correa, 2015).

4.6.2. Klasifikacija CRC-a prema molekularnim biljezima

Molekularni testovi koji su trenutno u uporabi pri procjeni pacijenata s CRC-om dijele se na testiranja na temelju tumora (engl. *tumor-based tests*) u kojima se provodi analiza *KRAS/BRAF* mutacija, analiza MSI-a, fenotip metilatora CpG otoka. Zatim, koriste se testovi na temelju stolice (engl. *stool-based tests*) gdje se provjerava okultno krvarenje u stolici (engl. *FOBT*), DNA/RNA testovi te detekcija proteina u stolici. Krvni testovi (engl. *blood-based tests*) kojima se identificiraju CRC-specifični antigeni u krvi, obuhvaćaju analizu biljega CEA-a (karcinoembrionalni antigen), CA19-9 (karbohidratni antigen 19-9) i TIMP-1 (tkivni inhibitor metaloproteinaza) (Pons i Correa, 2015).

4.6.3. *KRAS* mutacije i prognoza CRC-a

K-Ras je ključni posrednik signalnih kaskada izazvanih EGFR-om i aktivira se nizvodno nakon aktivacije EGFR-a te rezultira nizvodnom signalizacijom preko PI3K i izvanstanične signalno regulirane kinaze. Otkrivanje *KRAS* mutacija povezano je sa smanjenom stopom odgovora na odabir kemoterapeutika zbog čega je mutacijski status *KRAS*-a kritičan čimbenik pri razmatranju odabira ciljane terapije. Povezanost mutacije gena *KRAS* i odgovora na anti-EGFR terapiju prvi je put prijavljena u pacijenata s metastatskim CRC-om (mCRC). Povišena ekspresija EGFR-a povezuje se s lošom prognozom i povećanim rizikom od metastaza u CRC-u, ali predstavlja obećavajuću terapijsku metu. Prema jednoj retrospektivnoj analizi, opažen je smanjen odgovor na anti-EGFR terapiju i lošije ukupno preživljavanje kod pacijenata s mutiranim *KRAS* onkogenom u usporedbi s pacijentima koji su imali divlji tip. Razumijevanje čimbenika koji reguliraju ekspresiju *KRAS*-a može dovesti do buduće učinkovite terapijske strategije (Arrington i sur., 2012).

4.6.4. *BRAF* mutacije i prognoza CRC-a

Prema Sarasqueta i sur. (2010) najviše *BRAF* mutacija (90 %) čini tranzicija aminokiseline valin u glutamat na položaju 600 proteina (mutacije V600E) koja uzrokuje konstitutivnu aktivaciju proteina. Provedeno istraživanje pokazalo je značajnu povezanost mutacije V600E s MSI-om i tumorima desnoga kolona te se povezuje s lošijom prognozom za pacijente s karcinomom kolona II i III stupnja neovisno o stadiju bolesti i terapiji.

Testiranje mutacije gena *BRAF* postalo je važno za prognozu, dijagnozu, liječenje i predviđanje ishoda ciljane terapije. *BRAF* mutacije omogućuju razlikovanje sporadičnoga CRC-a s visokim MSI od nepolipoznoga nasljednoga CRC-a (Lynchov sindrom), a kod pacijenata gdje *KRAS* nije mutiran u mCRC-u ima ulogu u donošenju odluka o liječenju budući da *BRAF* mutacija pokazuje rezistenciju na inhibitore EGFR-a (cetuksimab i panitumumab) (<https://emedicine.medscape.com/article/2045309-overview#showall>).

4.6.5. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI)

Status MSI-a može biti učinkoviti biljeg za prognozu i dijagnozu sporadičnoga CRC-a koji se uglavnom nalazi u proksimalnom kolonu, mucinozne je histologije, slabo diferenciran, sadrži povećan broj limfocita koji infiltriraju tumor te posjeduju *BRAF* mutacije. Razne studije pokazuju kako je MSI-H povezan s boljom prognozom, povećanim preživljavanjem bolesnika i boljim ishodom, a dodatne studije potvrđuju da MSI može biti neovisni pokazatelj manje agresivne bolesti. MSI može biti koristan u odgovoru na adjuvantnu kemoterapiju 5-fluorouracilom i irinotekanom, međutim još uvijek je kontroverzan status MSI te pod ispitivanjima (Pons i Correa, 2015). Prema Gatalica i sur. (2016), MSI-H CRC su korisni kandidati za ciljanu imunoterapiju s inhibitorima kontrolne točke imunosnoga odgovora (pembrolizumab).

4.6.6 Fenotip metilatora CpG otoka (CIMP)

CIMP je karakteriziran hipermetilacijom CpG otoka smještenoj u promotorskoj regiji što dovodi do utišavanja tumorskih supresorskih gena na razini transkripcije. Gotovo 40 % CRC-a povezuje se sa statusom CIMP-a te može utjecati na prognozu CRC pacijenata. U usporedbi s niskim/negativnim CIMP-om, CRC s visokim CIMP-om češće su prisutni kod osoba starije životne dobi, ženskog spola, s *KRAS* i *BRAF* mutacijama, proksimalno lociranim tumorom, lošije diferencijacije i visoke stope MSI-a. Međutim, nesuglasna je povezanost statusa CIMP-a i CRC-a u prijašnjim objavljenim studijama (Joo, 2015).

Studija Wodraz i sur. (2013), uspoređivala je i kvantificirala *de novo* metilaciju u CIMP staničnim linijama CRC-a i CIMP negativnim stanicama u kontekstu različitih lokusa, nakon demetilacije stanica posredovane 5-aza-2'deoksicitidinom (5-AZA). Uočena je relativno brža remetilacija u CIMP negativnim stanicama koja je počela s određenim vremenskim zakašnjenjem, nego u CIMP stanicama gdje je ponovna metilacija započela bez vremenskoga kašnjenja, ali značajno sporijom brzinom. Pretpostavlja se kako je veća brzina metilacije u CIMP-negativnim stanicama povezana regulacijom aktivnosti DNA metiltransferaze (povratna sprega). Budući da je cilj smanjiti hipermetilirana stanja u stanicama karcinoma, razumijevanje takvih mehanizama bit će potrebno za procjenu posljedica koncepta liječenja čime bi se eventualno promijenili neki od malignih fenotipova.

5. ZAKLJUČCI

Karcinom kolona i rektuma jedan je od najčešćih zloćudnih bolesti i globalni svjetski problem. Zajednički cilj je smanjiti pojavnost ove bolesti zbog čega su prevencija i rano otkrivanje od iznimne važnosti. Iako se u Hrvatskoj provodi Nacionalni program prevencije karcinoma debeloga crijeva, učestalost od smrtnosti je u porastu.

CRC se definira kao maligni tumor epitelnih stanica sluznice kolona, a nastaje uslijed interakcija stečenih i nasljednih genskih varijanti s vanjskim čimbenicima tijekom duljega vremenskoga perioda. Glavni mehanizmi nastanka uključuju kromosomsku nestabilnost (CIN), mikrosatelitnu nestabilnost (MSI) te hipermetilaciju CpG otoka (CIMP). Nakupljaju se mutacije u onkogenima (*KRAS*, *BRAF*), tumorskim supresorskim genima (*APC*, *TP53*), stvaraju se delecije kromosoma (18q) i disfunkcija telomera. Događaju se promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za mitotičke kinaze (*PLK-1*, *AURK*) te je promijenjena regulacija stanične signalizacije i diferencijacije (APC/Wnt signalni put, Ras-Raf-MAP-kinazni put).

Istraživanjem genetske podloge bolesti i otkrivanjem novih molekulskih biljega, postižu se veliki pomaci u dijagnostici i liječenju. Prioritet je otkrivanje karcinoma u što ranijoj fazi pronalaženjem novih minimalno invazivnih biljega kako bi se povećala stopa preživljavanja pacijenta i izlječenje.

6. LITERATURA

About colorectal cancer, <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about.html> pristupljeno 15. 04. 2021.

Activation of the PI3K-AKT Pathway by Old World Alphaviruses, <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/970/htm>, pristupljeno 13. 09. 2021.

Anatomy of the caecum, appendix and colon, [https://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319\(19\)30223-6/fulltext](https://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319(19)30223-6/fulltext), pristupljeno 11. 04. 2021.

Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*, 2012, 5(1), 19-27.

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. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(10), 12153-12168.

Aurora A Kinase, <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/aurora-a-kinase>, pristupljeno 14. 07. 2021.

Bergman Marković B. Prevencija i rano otkrivanje karcinoma debelog crijeva. *Acta medica Croatica*, 2015, 69 (4), 365-371.

BRAF Gene Mutation Tests, <https://emedicine.medscape.com/article/2045309-overview#showall>, pristupljeno 28. 09. 2021.

Brkić T, Grgić M. Colorectal cancer. *Medicus*, 2006, 15(1), 89 – 97.

Chuang TP, Wang JY, Jao SW, Wu CC, Chen JH, Hsiao KH, Lin CY, Chen SH, Su SY, Chen YJ, Chen YT, Wu DC, Li LH. Over-expression of AURKA, SKA3 and DSN1 contributes to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Oncotarget*, 2016, 7(29).

Colorectal cancer part 3, <http://what-when-how.com/acp-medicine/colorectal-cancer-part-3/>, pristupljeno 18. 04. 2021.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, *Medicinska naklada*, 2010, str. 628-631, 635, 637, 709-711, 749, 757-762.

Cunningham CE, MacAuley MJ, Vizeacoumar FS, Abuhussein O, Freywald A, Vizeacoumar FJ. The CINs of Polo-Like Kinase 1 in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10).

Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb, *Medicinska naklada*, 2018, str. 149-151, 157, 455-458, 825, 828.

Daum JR, Wren JD, Daniel JJ, Sivakumar S, McAvoy JN, Potapova TA, Gorbsky GJ. Ska3 Is Required for Spindle Checkpoint Silencing and the Maintenance of Chromosome Cohesion in Mitosis, *Current Biology*, 2009, 19 (17), 1467-1472.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 2002, 27–5440.

Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruzskiewicz AR, Moore J, Zhu HJ, Mariadason JM, Burgess AW, Busam D, Zhao Q, Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res*, 2013, 73(2), 725-35.

Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swnesen J, Reddy S. High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Familial Cancer*, 2016, 405–412.

Guha T, Malkin D. Inherited *TP53* Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Medicine*, 2017, 7(4).

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Andreis I., Kukolja Taradi S., Taradi M., urednici, Zagreb, *Medicinska naklada*, 2017, str. 813-815, 831, 832, 841, 842.

Hamada T, Nowak JA, Ogino S. PIK3CA mutation and colorectal cancer precision medicine. *Oncotarget*, 2017, 8(14), 22305-22306.

Hrvatska liga protiv raka, <http://hlpr.hr/rak/vijest/rak-debelog-crijeva>, pristupljeno 10. 04. 2021.

Hussain MR, Baig M, Mohamoud HS, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khogeer GS, Al-Sayed RR, Al-Aama JY. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J Biol Sci*, 2015, 22(4), 359-73.

- Jalšovec D. Anatomija. Osnove građe tijela čovjeka. Jastrebarsko, *Naklada Slap*, 2018, str. 212, 213.
- Jin Y, Dai Z. Mutation of the nm23-H1 gene has a non-dominant role in colorectal adenocarcinoma. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5(1), 107-110.
- Joo YE. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Gut Liver*, 2015, 9(2), 139-40
- Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, Ghaedi K. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci*, 2019, 9, 97.
- Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, To KF. Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23), 5999.
- Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1), 84-93.
- Meng H, Li W, Boardman LA, Wang L. Loss of ZG16 is associated with molecular and clinicopathological phenotypes of colorectal cancer. *BMC Cancer* 18, 2018, 433.
- MSD Priručnik dijagnostike i terapije, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/tumori-probavnog-sustava/kolorektalni-karcinom>, pristupljeno 26. 12. 2020.
- MSD Priručnik dijagnostike i terapije, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/tumori-probavnog-sustava/polipi-kolona-i-rektuma>, pristupljeno 15. 04. 2021.
- Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva, <https://www.zzjzdnz.hr/hr/projekti/27>, pristupljeno 10. 04. 2021.
- Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology Letters*, 2018, 16, 9-18.
- NME1 Gene. ME/NM23 Nucleoside Diphosphate Kinase 1, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NME1>, pristupljeno 08. 05. 2021.
- Nojadedh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal*, 2018, 17, 159-168.

Paz MF, Wei S, Cigudosa JC, Perales SR, Peinado MA, Huang THM, Esteller M, Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases, *Human Molecular Genetics*, 2003, 12 (17), 2209–2219.

PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide), <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PIK3CAID415ch3q26.html>, pristupljeno 02. 05. 2021.

Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 2010, 138(6), 2059-2072.

PLK1 Gene, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLK1>, pristupljeno 23. 05. 2021.

Pohl A, Azuma M, Zhang W, Yang D, Ning Y, Winder T, Danenberg K, Lenz HJ. Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 11, 2011, 93–99.

Pons MG, Correa MC. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *BioMed Research International*, 2015, vol. 2015, str.14.

Quartuccio SM, Schindler K. Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3:50.

Rak debelog crijeva – ranije otkrivanje, bolja prognoza, <https://www.zzjzdnz.hr/zdravlje/prevencija-raka/rak-debelog-crijeva-ranije-otkrivanje-bolja-prognoza>, pristupljeno 10. 04. 2021.

Recio-Boiles A, Cagir B. Colon cancer. U StatPearls (online). Treasure Island (FL), *StatPearls Publishing*, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>, pristupljeno 19. 04. 2021.

Roth A. Colorectal cancer. *Medicus*, 2001, 10 (2), 191-199.

Sanz-Garcia E, Argiles G, Elez E, Tabernero J. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol*, 2017, 28(11), 2648-2657.

Sarasqueta AF, Lijnschoten G, Moerland E, Creemers GJ, Lemmens VEPP, Rutten HJT, van den Brule AJC. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Annals of Oncology*, 2010, 21 (12), 2396-2402.

SKA3 Gen, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SKA3>, pristupljeno 01. 08. 2021.

Štraus B, Rumora L. Biokemija i dijagnostika zloćudnih tumora. U Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D., Čepelak I., urednici, Zagreb, *Medicinska naklada*, 2009, str. 517-519, 524, 531, 532.

Štraus B, Čvorišćec D. Funkcija gastrointestinalnog trakta. U Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D., Čepelak I., urednici, Zagreb, *Medicinska naklada*, 2009, str. 431.

Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci.*, 2003, 94(2), 148-52.

Targeting the TGF β signalling pathway in disease, <https://www.nature.com/articles/nrd3810>, pristupljeno 13. 09. 2021.

The human protein atlas. ZG16, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174992-ZG16>, pristupljeno 01. 08. 2021.

The road to ERK activation: Do neurons take alternate routes?, <https://europepmc.org/article/pmc/pmc7127974>, pristupljeno 13. 09. 2021.

Tripković A , Tripković I , Tomić S , Kovačić A , Grandić L, Čapkun V. The role of nm23 gene in colorectal carcinogenesis. *Acta Clin Croat*, 2012, 51, 43-49.

Ulamec M, Krušlin B. Colorectal cancer, novel biomarkers and immunohistochemistry – an overview. *Medical Sciences*, 2014, 40, 41-49.

Vrdoljak E, Šamija M, Kušić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija, Zagreb, *Medicinska naklada*, 2013, str. 1, 2, 4, 6, 8, 14.

Wang W, Chen L, Tang Q, Fan Y, Zhang X, Zhai J. Loss of ARHI expression in colon cancer and its clinical significance. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2014, 18(5), 329-33.

Wodarz D, Boland CR, Goel A, Komarova NL. Methylation kinetics and CpG-island methylator phenotype status in colorectal cancer cell lines. *Biol Direct*, 2013, 8, 14.

7. SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih bolesti i globalni svjetski problem. Zajednički cilj je smanjiti pojavnost ove bolesti zbog čega su prevencija i rano otkrivanje od iznimne važnosti.

Bolest se definira kao maligni tumor epitelnih stanica sluznice kolona, a nastaje uslijed interakcija stečenih i nasljednih genetskih promjena s vanjskim čimbenicima tijekom duljega vremenskoga perioda. Glavni mehanizmi nastanka uključuju kromosomsku nestabilnost (CIN), mikrosatelitnu nestabilnost (MSI) te hipermetilaciju CpG otoka (CIMP). Nakupljaju se mutacije u onkogenima (*KRAS*, *BRAF*), tumorskim supresorskim genima (*APC*, *TP53*), nastaju delecije kromosoma (18q), disfunkcija telomera. Događaju se promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za mitotičke kinaze (*PLK-1*, *AURK*) te je promijenjena regulacija stanične signalizacije i diferencijacije (APC/Wnt signalni put, Ras-Raf-MAP-kinazni put).

Učestalost od smrtnosti još uvijek je u porastu zbog čega se istražuje genetska podloge bolesti i otkrivaju novi molekularni biljezi kako bi se olakšala dijagnostika i liječenje.

Prioritet je otkrivanje karcinoma u što ranijoj fazi pronalaženjem novih minimalno invazivnih biljega kako bi se povećala stopa preživljavanja pacijenta.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, genski biljezi, kromosomska nestabilnost, mikrosatelitska nestabilnost, hipermetilacija CpG otoka, dijagnostika

7. SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies and a global problem. The common goal is to reduce the incidence of these disease, which is why prevention and early detection are extremely important.

Disease is defined as a malignant tumor of the epithelial cells of the colonic mucosa, and occurs due to the interaction of acquired and inherited genetic changes with environmental factors over a long period of time. The main mechanisms of formation include chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and hypermethylation of CpG islands (CIMP). Mutations accumulate in oncogenes (*KRAS*, *BRAF*), tumor suppressor genes (*APC*, *TP53*), occurs chromosome deletions (18q), telomere dysfunction. Changes in the expression of genes encoding mitotic kinases (*PLK-1*, *AURK*) occur and the regulation of cell signaling and differentiation (APC/Wnt signaling pathway, Ras-Raf-MAP-kinase pathway) is altered. The incidence of death is still increasing which is why the genetic underpinnings of the disease are being investigated and new molecular biomarkers are being discovered to facilitate diagnosis and treatment.

The priority is to detect cancer at the earliest possible stage, with finding new minimally invasive biomarkers to increase the patient's survival rate.

Keywords: colorectal cancer, genetic biomarkers, chromosomal instability, microsatellite instability, hypermethylation of CpG islands, diagnostic

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

GENEZA KARCINOMA KOLONA I ZNAČENJE ZA DIJAGNOSTIKU I PROGNOZU

Marija Halavuk

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih bolesti i globalni svjetski problem. Zajednički cilj je smanjiti pojavnost ove bolesti zbog čega su prevencija i rano otkrivanje od iznimne važnosti. Bolest se definira kao maligni tumor epitelnih stanica sluznice kolona, a nastaje uslijed interakcija stečenih i nasljednih genetskih promjena s vanjskim čimbenicima tijekom duljega vremenskoga perioda. Glavni mehanizmi nastanka uključuju kromosomsku nestabilnost (CIN), mikrosatelitnu nestabilnost (MSI) te hipermetilaciju CpG otoka (CIMP). Nakupljaju se mutacije u onkogenima (*KRAS*, *BRAF*), tumorskim supresorskim genima (*APC*, *TP53*), nastaju delecije kromosoma (18q), disfunkcija telomera. Događaju se promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za mitotičke kinaze (*PLK-1*, *AURK*) te je promijenjena regulacija stanične signalizacije i diferencijacije (APC/Wnt signalni put, Ras-Raf-MAP-kinazni put). Učestalost od smrtnosti još uvijek je u porastu zbog čega se istražuje genetska podloge bolesti i otkrivaju novi molekularni biljezi kako bi se olakšala dijagnostika i liječenje. Prioritet je otkrivanje karcinoma u što ranijoj fazi pronalaženjem novih minimalno invazivnih biljega kako bi se povećala stopa preživljavanja pacijenta.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, genski biljezi, kromosomska nestabilnost, mikrosatelitska nestabilnost, hipermetilacija CpG otoka, dijagnostika

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Izv. dr. sc. Donatella Verbanac, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal Biochemistry and
Haematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

GENESIS OF COLON CANCER AND SIGNIFICANCE FOR DIAGNOSIS AND PROGNOSIS

Marija Halavuk

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies and a global problem.

The common goal is to reduce the incidence of these disease, which is why prevention and early detection are extremely important.

Disease is defined as a malignant tumor of the epithelial cells of the colonic mucosa, and occurs due to the interaction of acquired and inherited genetic changes with environmental factors over a long period of time. The main mechanisms of formation include chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and hypermethylation of CpG islands (CIMP). Mutations accumulate in oncogenes (*KRAS*, *BRAF*), tumor suppressor genes (*APC*, *TP53*), occurs chromosome deletions (18q), telomere dysfunction. Changes in the expression of genes encoding mitotic kinases (*PLK-1*, *AURK*) occur and the regulation of cell signaling and differentiation (APC/Wnt signaling pathway, Ras-Raf-MAP-kinase pathway) is altered.

The incidence of death is still increasing which is why the genetic underpinnings of the disease are being investigated and new molecular biomarkers are being discovered to facilitate diagnosis and treatment.

The priority is to detect cancer at the earliest possible stage, with finding new minimally invasive biomarkers to increase the patient's survival rate.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 8 figures, 2 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: colorectal cancer, genetic biomarkers, chromosomal instability, microsatellite instability, hypermethylation of CpG islands, diagnostic

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Donatella Verbanac, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: