

Ekspresija gena c-MYC u pacijenata s kolorektalnim karcinomom

Mićan, Karmela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:489137>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Karmela Mićan

**Ekspresija gena *c-MYC* u pacijenata s
kolorektalnim karcinomom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na stručnom vodstvu te pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se doc .dr .sc. Andrei Hulini Tomašković te Mariji Fabijanec, mag. med. biochem., koje su mi svojim korisnim savjetima i vještinama pomogle pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

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



Za provođenje istraživanja korištena je oprema nabavljena kroz projekt FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) Europskoga fonda za regionalni razvoj.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Kolorektalni karcinom	1
1.2 Etiologija CRC-a	2
1.3 Karcinogeneza CRC-a	3
1.4 <i>c-MYC</i>	6
1.5 Dijagnostika CRC-a	8
1.6 Tekuća biopsija	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1 Uzorkovanje krvi i priprema uzorka za izolaciju egzosoma	14
3.2 Izolacija egzosoma QIAGEN metodom	14
3.3 Izolacija ukupne RNA iz egzosoma	16
3.4 Izolacija ukupne RNA iz tkiva uronjenoga u parafin	17
3.5 Određivanje koncentracije i kvalitete RNA molekule	20
3.6 Metoda reverzne transkripcije	22
3.7 Taqman ® metoda q-PCR-a	24
3.8 Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1 Ekspresija gena <i>c-MYC</i> iz RNA izolirane iz tkiva pacijenata s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om	27
4.1.1 Analiza koncentracije, kvalitete i integriteta RNA molekule	27
4.1.2 Analiza ekspresije gena <i>c-MYC</i>	30
4.1.3 Usporedba ekspresije gena <i>c-MYC</i> u bolesnika s pre-CRC i CRC stadijem	31
4.2 Ekspresija gena <i>c-MYC</i> iz RNA izolirane iz egzosoma bolesnika s potvrđenim CRC-om	32
4.2.1 Analiza koncentracije RNA molekule	32
4.2.2 Analiza ekspresije gena <i>c-MYC</i>	32
4.3 Rasprava	33
5. ZAKLJUČAK	36
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA	37
7. LITERATURA	40
8. SAŽETAK/SUMMARY	44
8.1 Sažetak	44
8.2 Summary	45

1.UVOD

1.1 Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom (CRC) je po pojavnosti drugi zloćudni tumor u svijetu. 2020. zabilježeno je 1,9 milijuna novih slučajeva, dok je broj smrtnih slučajeva iznosio 1,1 milijun. Prema posljednjim podacima registra za rak za 2020. u Republici Hrvatskoj je od CRC-a oboljelo ukupno 3396 osoba, od čega 60 % čine muškarci. Prosječna dob oboljelih iznosila je 70 godina. Prema podacima o mortalitetu, godišnje od CRC-a umire oko 2100 osoba, od toga oko 60 % su muškarci (<https://www.hzjz.hr/>).

Zloćudni tumor debeloga crijeva heterogena je bolest koja nastaje kao rezultat genetskih i okolišnih čimbenika. Karcinogeneza CRC-a vrlo je kompleksan proces koji obuhvaća mutacije više različitih gena te epigenetske modifikacije koje potom dovode do transformacije epitelnih stanica kolona u agresivne i invazivne adenokarcinome (Verbanac i sur., 2021). Unatoč napretku kirurgije, kemoterapije i radioterapije, imunoterapije te antitumorske ciljane terapije, petogodišnje preživljenje pacijenata s CRC-om je i dalje nisko (Tan i sur., 2022). Potencijalno rješenje trenutno nezadovoljavajućega odgovora na ciljanu antitumorsku terapiju, leži u razvoju personalizirane medicine. Personalizirani pristup u liječenju pacijenata s CRC-om postaje neizostavan dio učinkovite strategije koja bi se doticala, ne samo tumorskih stanica, već i tumorskoga mikrookoliša (Verbanac i sur., 2021). Ključni korak u razvoju personalizirane medicine jest identifikacija i validacija specifičnih tumorskih biljega. Budući da su nedavna istraživanja potvrdila veliku ulogu *c-MYC* (engl. *Cellular Myelocytomatosis*) gena u procesu karcinogeneze, smatra se novim potencijalnim biljegom za ranu dijagnozu CRC-a. Štoviše, povećana ekspresija gena korelira s lošijom prognozom oboljelih (Tan i sur., 2022), a prema Elbadawy i sur. (2019) gen *c-MYC* predstavlja novu potencijalnu metu antitumorskih lijekova za liječenje CRC-a.

1.2 Etiologija CRC-a

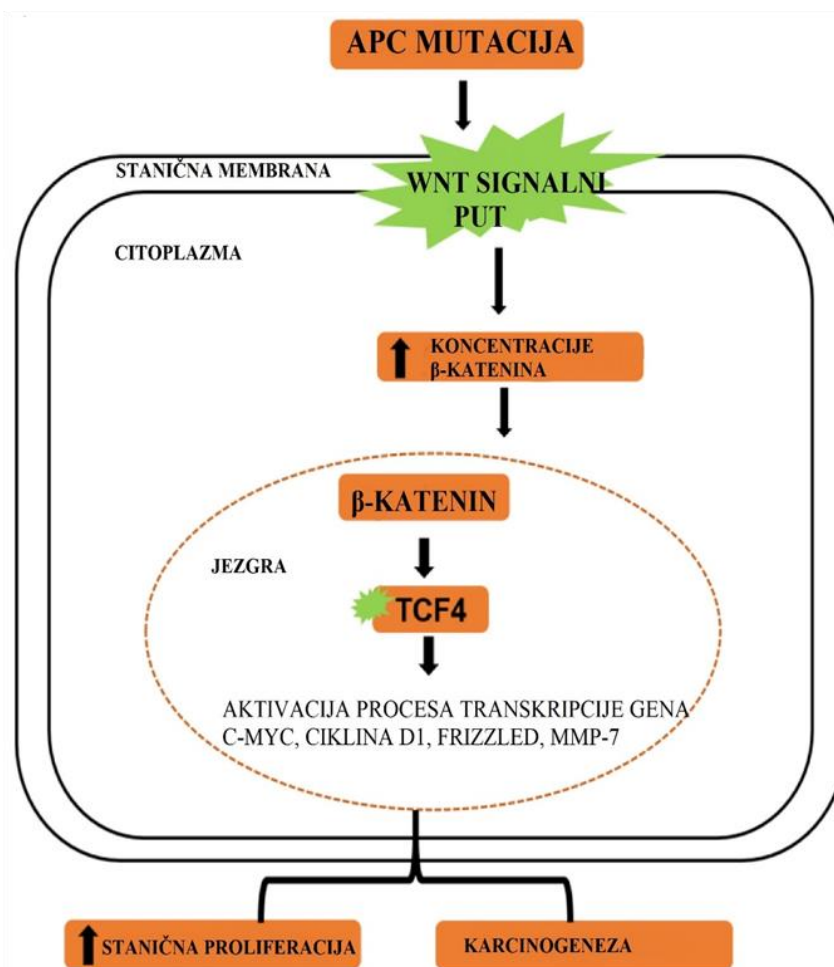
CRC se može razviti sporadično ili pak može biti nasljedan, u sklopu sindroma obiteljske nasljedne polipoze kolona (FAP, engl. *Familial Adenomatous Polyposis*) ili kao nasljedni nepolipozni karcinom crijeva (HNPCC, engl. *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer*) (Badžek i sur., 2012). Sporadični oblik CRC-a u većini je slučajeva dijagnosticiran u starijih od 50 godina te je rezultat sinergije genetskih i okolišnih čimbenika te stila života (Lotfollahzadeh i sur., 2022). Incidencija CRC-a povećava se s dobi te se nakon 40.-te godine udvostručuje u svakom narednom desetljeću (Kašuba, 2019).

Uzrok nastanka CRC-a u 70 % pacijenata predstavljaju sporadične mutacije, najčešće prisutne unutar sljedećih gena: *APC* (engl. *Adenomatous Polyposis Coli*), *KRAS* (engl. *Kirsten Rat Sarcoma Virus*), *TP53* (engl. *Tumour Protein 53*) te *DCC* (engl. *Deleted in Colorectal Cancers*) (Verbanac i sur., 2021). U 10 % oboljelih uzrok CRC-a isključivo je nasljedne naravi (Lotfollahzadeh i sur., 2022). Razna oboljenja, posebice upalne bolesti crijeva (Chronova bolest, ulcerozni kolitis), diabetes mellitus, akromegalija ili dugotrajna terapija imunosupresivima povećavaju rizik za razvoj CRC-a (Lotfollahzadeh i sur., 2022). Reaktivni kisikovi spojevi te slobodni radikali koji su prisutni u većim količinama u oboljelih od upalnih bolesti crijeva predstavljaju uzrok oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *Deoxyribonucleic Acid*) epitelnih stanica (Yashiro, 2014). Rezultati epidemioloških studija, potvrdili su čvrstu povezanost okolišnih čimbenika te stila života s razvojem CRC-a. Čimbenici koji povećavaju rizik za razvoj karcinoma su pretilost, konzumacija crvenoga te prerađenoga mesa, pušenje cigareta te konzumacija alkohola (Lotfollahzadeh i sur., 2022). S druge strane, prehrana bogata vlaknima i cjelovitim žitaricama, unos kalcija te mliječnih proizvoda, dodatci prehrani poput vitamina D i C smanjuju rizik za razvoj CRC-a (Banjari, 2018). Polusatna dnevna tjelesna aktivnost smanjuje rizik za razvoj CRC-a za 11 % (Banjari, 2018). Budući da je u tumorskom tkivu CRC-a uočena pojačana ekspresija upalnoga izoenzima ciklooksigenaze-2 (COX-2, engl. *Cyclooxygenase 2*), redovita terapija nesteroidnim protuupalnim lijekovima (NSAID, engl. *Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*) također smanjuje rizik za razvoj CRC-a (Sheng i sur., 2020).

1.3 Karcinogeneza CRC-a

Transformacija epitelnih stanica kolona prvotno u adenom, a potom i u invazivni karcinom, rezultat je nakupljanja somatskih i/ili germinativnih mutacija (Lotfollahzadeh i sur., 2022). Karcinom kolona može nastati kao rezultat kromosomske nestabilnosti (CIN, engl. *Chromosomal Instability*), epigenetskih promjena poput metilatorskog fenotipa CpG otoka (CIMP, engl. *CpG Island Methylator Phenotype*) te mikrosatelitske nestabilnosti (MSI, engl. *Microsatellite Instability*) (Tariq i Ghias, 2016).

Mutacija tumorskoga supresorskog gena *APC* smatra se početnom točkom u procesu karcinogeneze. Glavna funkcija gena *APC* jest negativna regulacija Wnt (engl. *Wing-less-type*) signalnoga puta (Abramović, 2022). Djeluje na način da ulazi u interakciju s β -kateninom smještenog u citoplazmi te uzrokuje njegovu fosforilaciju, ubikvitinizaciju te proteolitičku degradaciju (Abramović, 2022). Wnt signalni put aktivira se vezanjem 20-ak različitih liganada na membranski receptor Frizzled. Aktivacija Wnt signalnoga puta potiče inhibiciju enzima GSK3- β (engl. *Glycogen Synthase Kinase-3 β*) koji čini sastavni dio multiproteinskoga kompleksa odgovornoga za potpomaganje degradacije β -katenina putem ubikvitinsko-proteasomskoga sustava (Badžek i sur., 2012). Povećava se koncentracija β -katenina u citoplazmi te isti migrira u jezgru gdje stvara kompleks s transkripcijskim čimbenikom TCF4/LEF (engl. *T Cell Factor 4/Lymphoid Enhanced Factor*) (Badžek i sur., 2012). Aktivira se proces transkripcije gena koji su uključeni u proces stanične proliferacije, staničnoga preživljavanja te metastaziranja poput gena *c-MYC*, ciklina D1, Frizzled te MMP-7 (engl. *Matrix Metalloproteinase 7*) (Badžek i sur., 2012) (Slika 1.).



Slika 1. Aktivacija transkripcije gena uključenih u proces karcinogeneze putem signalnoga Wnt puta (preuzeto i prilagođeno prema Elbadawy i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača).

Aktivirajuće mutacije onkogenog *KRAS* također predstavljaju rani događaj u procesu karcinogeneze te se najčešće pojavljuju nakon prelaska aberantne kripte crijevnoga žljezdanog epitela u adenom (Badžek i sur., 2012). Mutacije gena *RAS* (engl. *Rat Sarcoma Virus*) detektirane su u 50 % sporadičnih karcinoma crijeva te se smatraju klinički najrelevantnijim promjenama (Lotfollahzadeh i sur., 2022). Uzrokuju promjene u signalizaciji putem RAS-RAF-MAPK kaskade što u konačnici dovodi do nekontrolirane stanične proliferacije te rezistencije promijenjenih stanica na antitumorsku terapiju. Aktivnost onkogenog *K-RAS*, putem PI3K/PKB signalnoga puta, povezana je s inhibicijom programirane stanične smrti (apoptoza) te gubitkom funkcije tumor-supresorskoga proteina p53 (Badžek i sur., 2012).

Mutacijom tumor-supresorskih gena *SMAD4* (engl. *Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic 4*) i *TP53* adenom prelazi u karcinom (Badžek i sur., 2012). Uloga tumor-supresorskih gena jest prepoznavanje oštećene DNA molekule te zaustavljanje ciklusa replikacije sve dok se ne izvrši popravak. Ako popravak DNA nije mogući, pokreće se proces apoptoze (Brkić i Grgić, 2006).

Osim mutacija gena, ulogu u karcinogenezi imaju i epigenetske promjene poput hipermetilacije promotorskih regija DNA te acetilacija, metilacija i fosforilacija histona (Badžek i sur., 2012). Hipermetilacija CpG otoka u području promotorskih regija može potaknuti, ali i utišati ekspresiju određenih gena, poput *BRAF* (engl. *B-rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) i *MLH1* (engl. *DNA Mismatch Repair Protein 1*) (Lotfollahzadeh i sur., 2022). *BRAF* mutacije nalaze su u gotovo 10 % oboljelih od CRC-a, a dovode do hiperproliferacije stanica te inhibicije apoptoze (Kašuba, 2019). Mikrosatelitska nestabilnost nastaje kao rezultat mutacije nekoga od gena odgovornog za popravak DNA, a karakteriziraju je ponavljajući sljedovi nukleotida diljem genoma (Badžek i sur., 2012). Inaktivacija gena *MMR* (engl. *Mismatch Repair*) uključenih u mehanizme popravka DNA, poput *MSH2* (engl. *DNA Mismatch repair Protein 2*), *MLH1* i *PMS2* (engl. *Mismatch Repair Endonuclease PMS2*), povezuje se s nastankom HNPCC sindroma (Badžek i sur., 2012).

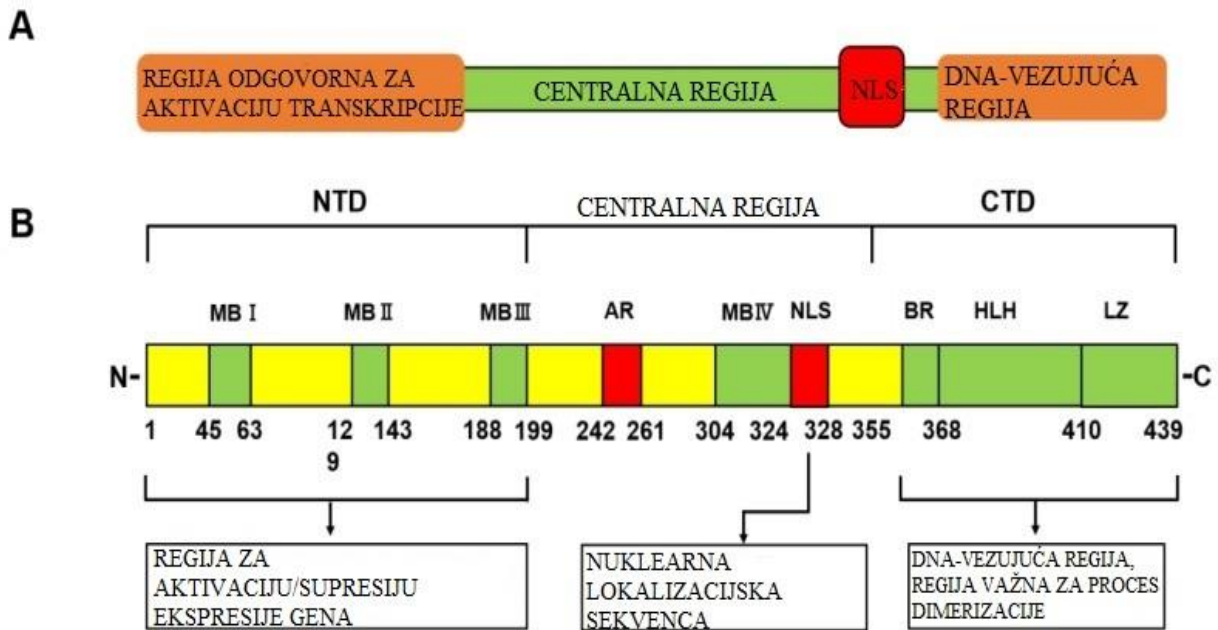
U tumorskom tkivu karcinoma kolona, otkrivena je pojačana ekspresija upalnoga izoenzima COX-2 (Badžek i sur., 2012). Štoviše, COX-2 te njezin produkt prostaglandin E2, povezuju se s pojavnošću, progresijom te prognozom CRC-a (Sheng i sur., 2020). Enzim COX-2 smatra se potencijalnim biljegom za dijagnozu CRC-a (Negi i sur., 2019). Sama sinteza enzima aktivirana je sinergijom nuklearnoga faktora kapa-B i interferona γ , interleukina-1 β , interleukina-6 i NF-IL6 (engl. *Nuclear Factor Interleukin 6*), NFAT (engl. *Nuclear Factor of Activated T Cells*), PPRE (engl. *Peroxisome Proliferator Response Element*) te egzogenih karcinogena, a čiji se regulacijski elementi nalaze unutar promotorske regije gena (Badžek i sur., 2012). Regulacija sinteze COX-2 odvija se putem Wnt signalnog puta te MAPK kaskadom K-RAS sustava (Badžek i sur., 2012). Svojom ciklooksigenaznom te peroksidaznom aktivnošću razgrađuje arahidonsku kiselinu na prostaglandine. Aktivni oblici prostanglandina te tromboksan A2, vezanjem za odgovarajuće receptore, autokrino i parakrino potiču stanično preživljavanje, proliferaciju stanica te proces angiogeneze (Badžek i sur., 2012).

1.4 *c-MYC*

Gen *c-MYC* smješten je na kromosomu 8, 8q24.21. Sastoji se od 3 eksona (Tomašković 2010). Pripada obitelji *MYC* (engl. *Myelocytomatosis*) regulatornih gena te proto-onkogeni koji kodiraju nuklearne transkripcijske čimbenike (Elbadawy i sur., 2019). Prvotno je identificiran gen *v-MYC* (engl. *Viral Myelocytomatosis*) kao proto-onkogen virusa ptičjega mijelocitoma (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009). S obzirom da je analog otkrivenom virusnom proto-onkogenu te identificiran u stanicama, nazvan je *c-MYC* (c-celularni) (Tomašković, 2010). Gen *c-MYC* kodira transkripcijski faktor nužan za regulaciju ekspresije mnogih gena uključenih u procese staničnoga ciklusa, replikacije DNA i rasta stanice te apoptoze (Kafka, 2017). Zbog navedenoga, ekspresija gena *c-MYC* fiziološki je povećana tijekom embrionalnoga razvoja (Elbadawy i sur., 2019).

Prema Elbadawy i sur. (2019) protein Myc građen je od:

- N-terminalne domene (NTD, engl. *N-terminal Domain*) unutar koje se nalaze domene MBI i MBII odgovorne za aktivaciju transkripcije,
- centralne domene (domene MBIII i MBIV, slijed važan za položaj u staničnoj jezgri NLS (engl. *Nuclear Localization Signal*)),
- C-terminalne domene (CTD, engl. *C-terminal Domain*) unutar koje se nalazi “uzvojnica-omča-uzvojnica” leucinski zatvarač (bHLHzip, engl. *Basic Helix-loop-helix Leucine Zipper*) neophodan za proces dimerizacije s MYC-u pridruženim proteinom X (MAX, engl. *MYC associated protein X*) (Slika 2.).



Slika 2. Struktura obitelji *MYC* proteina (A) i struktura *c-MYC* proteina (B) (preuzeto i prilagođeno prema Elbadawy i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača).

U maligno promijenjenim stanicama, regulacija ekspresije gena *c-MYC* poremećena je što za posljedicu ima pojačanu ekspresiju koja rezultira genskom nestabilnošću, nekontroliranom angiogenezom te proliferacijom stanica, nastankom metastaza i izbjegavanjem apoptoze (Elbadawy i sur., 2019).

Kao jedan od ključnih onkogeni u procesu nastanka CRC-a, gen *c-MYC* putem nekoliko mehanizama inhibira proces apoptoze stanica. Odgovoran je za supresiju miRNA-124 (engl. *Micro Ribonucleic Acid-124*) bitne za promociju apoptoze. Također, putem gena *SNHG15* (engl. *Small Nucleolar RNA Host Gene 15*) inducira sintezu dugolančane nekodirajuće RNA (engl. *Ribonucleic Acid*) odgovornu za promociju inducirajućega faktora apoptoze (AIF, engl. *Apoptosis-inducing Factor*) što uzrokuje stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva te posljedično nastajanje oksidacijskoga stresa. U prisustvu slobodnih kisikovih spojeva, smanjena je koncentracija željeza što dovodi do stimulacije prolil-hidroksilaze (PHD, engl. *Prolyl Hydroxylase*) te posljedično stimulacije hipoksijom induciranoga čimbenika (HIF-1 α , engl. *Hypoxia-inducible Factor-1 alpha*) koji interferira u procesu apoptoze. Cijepanjem poli ADP riboza-polimeraze te kaspaze-3 izravno utječe na proces apoptoze (Tan i sur., 2022).

Nekontrolirana ekspresija gena *c-MYC* za sobom povlači pojačanu ekspresiju ili pak supresiju nekoliko gena te povećava rizik za nastajanje sekundarnih mutacija te u konačnici tumora (Elbadawy i sur., 2019). Gen *c-MYC* regulira brojne signalne putove uključene u stanični rast i proliferaciju tumorskih stanica. Odgovoran je za regulaciju gena koji sudjeluju u aktivaciji staničnog ciklusa (*CDC25A*, *CDK4*, *ciklina D2* i dr.), ali i gena koji sudjeluju u njegovom zaustavljanju (*P15*, *P21*, *P27* i dr.). Genski produkt *c-MYC* gena ima sposobnost vezanja i inhibicije transkripcijskoga faktora Sp1 što rezultira smanjenom transkripcijom gena vezanih za zaustavljanje staničnoga rasta (Rašić, 2017). Aktivacijom Hox proteina, gen *c-MYC* uključen je u proces nastanka metastaza (Tan i sur., 2022). Prema Elbadawy i sur. (2019) identifikacija selektivnih inhibitora gena *c-MYC* ključna je za razvoj novoga lijeka koji će pridonijeti učinkovitoj i manje toksičnoj terapiji CRC-a.

1.5 Dijagnostika CRC-a

U Republici Hrvatskoj CRC je najučestalija zloćudna bolest te drugi najčešći uzrok smrti među malignim bolestima. Pojava prvih znakova bolesti veže se s već kasnijim stadijem bolesti. Liječenje karcinoma dijagnosticiranoga u kasnijem stadiju kompliciranije je te manje učinkovito. S ciljem otkrivanja raka u što ranijem stadiju bolesti što će rezultirati lakšem liječenju te boljom kvalitetom života oboljelih, odlukom Vlade Republike Hrvatske krajem 2007. godine usvojen je Nacionalni program prevencije i ranog otkrivanja kolorektalnoga karcinoma (<https://www.hzjz.hr/>). Nacionalni program predviđen je za osobe od 50-te do 74-te navršene godine te se provodi svake dvije godine. Sastoji se od analize uzroka stolice na okultno (skriveno) krvarenje. Pozitivan nalaz upućuje pacijenta na kolonoskopiju s ciljem otkrivanja uzroka krvarenja unutar gastrointestinalnoga trakta. Ukoliko se tijekom kolonoskopije uoči polipozna ili druga sumnjiva tvorba, kroz endoskop se uzorkuje dio tkiva za daljnju patohistološku analizu (biopsija). Prisutne polipe moguće je i u potpunosti ukloniti (<https://www.hzjz.hr/>). Kolonoskopija s polipektomijom smatra se zlatnim standardom dijagnostike i sekundarne prevencije te smanjuje učestalost mortalitet 30 - 40 % u rizičnoj populaciji (Badžek i sur., 2012). Nedostatci biopsije su invazivnost i rizičnost te teška ponovljivost. Histološka analiza uzorka tkiva uzorkovanoga postupkom biopsije daje uvid u molekularno zbivanje unutar jednoga dijela tkiva u određenom vremenu. Postupak kolonoskopije neugodan je za pacijente, a u rijetkim slučajevima i bolan (Mazouji i sur., 2021). Zbog navedenoga, biopsijom je teško pratiti uspješnost terapije te tijekom bolesti. Tekuća biopsija (engl. *Liquid Biopsy*), kao neinvazivna, ponovljiva te vrlo pristupačna metoda, predstavlja

inovativno rješenje na području dijagnostike, liječenja te praćenja tijekom malignih bolesti (Periša i sur., 2017). Kako bi tekuća biopsija postala sastavni dio kliničke prakse, potrebno je identificirati i validirati potencijalne biljege za identificiranje CRC-a te njegovo razlikovanje od adenoma (stadij 0 kolorektalnoga karcinoma, pre-CRC).

1.6 Tekuća biopsija

Tekuća biopsija predstavlja minimalno invazivnu te lako ponovljivu metodu kojom se iz biološkoga materijala (krvi, urina, sline i dr.) izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice (CTC, engl. *Circulating Tumour Cells*), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA, engl. *Cell-free DNA*), egzosomi ili miRNA (Periša i sur., 2017). Većina solidnih tumora te metastaza putem različitih mehanizama otpuštaju specifične tumorske elemente u sistemska cirkulaciju (Hanžek, 2019). Otpušteni elementi sadrže genska, RNA i proteinska obilježja tumorskih stanica te omogućuju uvid u molekularna zbivanja unutar tumorskih stanica (Barišić, 2017). Metoda tekuće biopsije primjenjiva je u predoperativnoj predikciji preživljenja pacijenata sa zloćudnim tumorom, za praćenje tijekom bolesti i progresije bolesti, kao i za praćenje odgovora na terapiju ili ranog povratka bolesti (Periša, 2017). Također, koncept tekuće biopsije pronalazi svoju ulogu u ranoj dijagnostici tumora (Barišić, 2019).

CTC intaktne su tumorske stanice koje se nalaze u perifernoj cirkulaciji kao stanice odvojene od primarnoga sjela tumora ili iz metastaza (Hanžek, 2019). Njihovo prisustvo u perifernoj cirkulaciji znak je progresije većine epitelnih tumora, uključujući CRC (Redžović i sur., 2015) Nakon izolacije, CTC mogu se dalje profilirati analizom unutarstaničnih proteina te DNA i RNA molekula (Hanžek, 2019). Brojna su istraživanja potvrdila korelaciju između broja CTC-a i ukupnoga preživljenja bolesnika te razdoblja bez progresije bolesti (PFS, engl. *Progression Free-survival*). Kod oboljelih od CRC-a, CTC se mogu koristiti i za praćenje te određivanje terapijske učinkovitosti (Redžović i sur., 2015). U perifernoj krvi osoba s metastatskim karcinomom nalazi se 1 - 10 CTC-a po 10 ml krvi. CTC-i se mogu u cirkulaciji nalaziti pojedinačno ili u obliku klastera. Klasteri, za razliku od pojedinačnih CTC-a, imaju veći potencijal za stvaranje metastaza, no njihov poluzivot u cirkulaciji je kraći. Većina CTC-a u cirkulaciji ulazi u proces stanične smrti što je najčešće posljedica fizičkoga i oksidacijskoga stresa te nedostatka faktora rasta i citokina. Ukoliko prežive u cirkulaciji, procesom ekstravazacije, CTC-i izlaze iz cirkulacije u okolno tkivo ili pak ostaju zaglavljene u

kapilarama. Nakon što jednom napuste cirkulaciju, CTC-i počinju se dijeliti i kolonizirati tkivo (Micalizzi i sur., 2017).

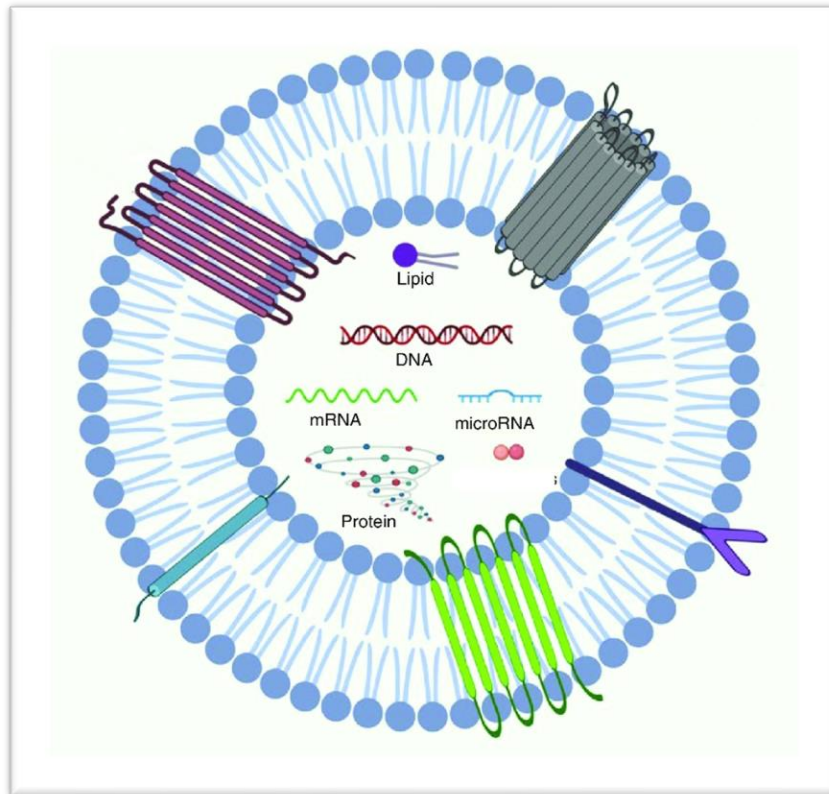
Trenutno se, za otkrivanje i analizu CTC-a, koriste brojne inovativne tehnologije poput CellSearch™ sustava, CTC-mikročipova, uređaja za filtraciju, metode protočne citometrije te sustava automatizirane mikroskopije (Barišić, 2019).

Cirkulirajuća DNA se oslobađa u perifernu cirkulaciju iz oštećenih stanica putem različitih mehanizama, primjerice apoptozom i nekrozom. Karakterizira ju kratki poluživot u plazmi te se kod zdravih osoba nalazi u koncentracijama od 0 do 35 ng/ml. Tijekom malignoga procesa, koncentracija cfDNA je povećana te vrijednosti iznose od 0 do 1000 ng/ml (Dujmović, 2014). Osim u malignim bolestima, povećanje cfDNA karakteristično je za upalna i traumatska stanja te stanja nakon transplantacije (Múzes i sur., 2022).

CfDNA podrijetlom iz tumorske stanice naziva se cirkulirajuća tumorska DNA (cftDNA, engl. *Cell-free Circulating Tumour DNA*), a čine ju fragmenti veličine od 120 do 200 pb (Hanžek, 2019). Čini udio od 0,01 do 90 % ukupne cfDNA. Veća koncentracija cftDNA nalazi se u bolesnika s težim stadijem bolesti te s prisutnim udaljenim metastazama (Barišić, 2019). Analiza cftDNA omogućuje uvid u genska i epigenetska svojstva genomske DNA u promijenjenim stanicama (Barišić, 2019). U kliničkoj praksi, cftDNA se može koristiti kao biljeg za stratifikaciju bolesnika, pomoć pri odabiru odgovarajuće terapije, praćenje učinka te rezistencije na terapiju kod bolesnika s CRC-om (Hanžek, 2019).

Egzosomi su mikrovezikule promjera od 3 do 200 nm koje u svojoj unutrašnjosti sadrže proteine, nukleinske kiseline, lipide te različite metabolite (Slika 3.). Proteini mogu biti smješteni na membrani (tetraspanini, antigen prezentirajuće molekule, glikoproteini te adhezivne molekule) ili pak unutar lumena mikrovezikule (proteini citoskeleta, proteini toplinskog šoka, fuzijski proteini, faktori rasta te citokini). Egzosomi sadrže lipidne molekule (kolesterol, ceramid, sfingomijelin, gangliozid, fosfatidilinozitol, fosfatidilserin, fosfatidilkolin) te nukleinske kiseline (mRNA, miRNA, nekodirajuća RNA i DNA) (Dilsiz, 2021). Glavna fiziološka funkcija egzosoma u krvi jest međustanična komunikacija te transport molekula između udaljenih stanica (Periša i sur., 2017). Karakterizira ih sposobnost prijenosa različitih unutarstaničnih molekula poput DNA, mRNA, miRNA te proteina. Tijekom malignoga procesa odgovorni su za poticanje proliferacije stanice, procesa angiogeneze te

stvaranja metastaza (Periša i sur., 2017). Egzosomi otpušteni iz tumorskih stanica sadrže proteine te RNA molekule pomoću kojih je moguće ustanoviti molekulski profil tumora. Njihova izolacija te analiza unutrašnjega sadržaja može biti korisna pri dijagnozi, predikciji te prognozi onkoloških bolesti (Barišić, 2019).



Slika 3. Struktura i sadržaj egzosoma (preuzeto i prilagođeno prema Dilsiz, (2021) uz dopuštenje izdavača).

MiRNA nekodirajuće su kratke, dvolančane RNA molekule čija je glavna uloga regulacija ekspresije gena (Hanžek, 2019). Tijekom malignoga procesa, ekspresija miRNA je promijenjena te specifična za određenu vrstu karcinoma. Amplifikacije ili delecije gena koji kodiraju za miRNA, uz deregulaciju transkripcijskih čimbenika te prisustvo epigenetskih promjena, dovode do povećanja ekspresije onkogenih miRNA te smanjenja ekspresije tumorskih supresorskih miRNA. Deregulacija miRNA povezana je s nastankom rezistencije na antitumorsku terapiju, a smatra se i potencijalnim biljekom za maligna oboljenja.

Trenutno, karcinoembrijski antigen (CEA, engl. *Carcinoembryonic Antigen*) te karbohidratni antigen 19-9 (CA 19-9, engl. *Carbohydrate Antigen 19-9*) najčešći su biljezi koji se određuju u krvi pacijenata s CRC-om. Zbog njihove nedovoljne specifičnosti i osjetljivosti nisu preporučeni za probir i rano otkrivanje maligne bolesti. Meta mnogih istraživanja koji za cilj imaju pronalazak tumorskog biljega korisnoga za probir, ranu dijagnozu, prognozu, praćenje odgovora na antitumorsku terapiju te detekciju recidiva postali su specifični dijelovi tumorskoga genoma (Verbanac i sur., 2021). Rezultati provedenih istraživanja potvrdili su uključenost gena *c-MYC* u proces karcinogeneze CRC-a. Gen *c-MYC* odgovoran je za regulaciju signalnih putova uključenih u rast i proliferaciju tumorskih stanica (Elbadawy i sur., 2019). Budući da je tijekom malignoga procesa njegova ekspresija povećana, smatra se potencijalnim biljekom za ranu dijagnozu CRC-a.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

CRC drugi je najčešći uzrok smrti od maligne bolesti u oba spola (Mazouji i sur., 2021). Unatoč velikom broju oboljelih i umrlih od ove zloćudne bolesti, u idućim desetljećima, predviđa se rast incidencije i mortaliteta na globalnoj razini (Hossain i sur., 2022). Ukoliko se bolest dijagnosticira u ranijem stadiju, vjerojatnost za izlječenje i preživljenje je visoka. Zlatni standard u dijagnostici CRC-a jest kolonoskopija tijekom koje se, ukoliko je potrebno, radi biopsija. Trenutno, klinička istraživanja usmjerena su prema pronalasku nove alternativne metode koja će uspješno zamijeniti biopsiju. Tekuća biopsija, u kombinaciji s metodama nove generacije sekvenciranja, predstavlja inovativno rješenje na području dijagnostike malignih bolesti. Nedavna istraživanja pokazuju obećavajuće rezultate u kliničkoj primjeni u bolesnika s CRC-om (Mazouji i sur., 2021). Kako bi se tekuća biopsija mogla koristiti u kliničkoj praksi, potrebno je odrediti te validirati potencijalne biljege koji će se koristiti za ranu dijagnozu, odabir terapije, praćenje uspješnosti terapije, prognozu bolesti te detekciju recidiva. Prema Verbanac i sur. (2021) identifikacija specifičnih tumorskih biljega i primjena personalizirane medicine predstavlja budućnost liječenja malignih bolesti. Budući da gen *c-MYC* igra važnu ulogu u procesu karcinogeneze, smatra se potencijalnim biljekom za ranu dijagnozu CRC-a. Kako bi se ispitao dijagnostički potencijal gena *c-MYC*, u ovom se istraživanju provodila usporedba ekspresije gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva u bolesnika s pre-CRC-om te bolesnika s potvrđenim CRC-om. Na temelju razlike u ekspresiji moguće je odrediti vrijednost gena *c-MYC* kao potencijalnog biljega za rano dijagnosticiranje CRC-a. Također, cilj rada bio je ispitati potencijal gena *c-MYC* kao biljega za rano otkrivanje CRC-a primjenom tekuće biopsije. Rezultate dobivene tekućom biopsijom bilo je potrebno usporediti s rezultatima biopsije (Verbanac i sur., 2021) stoga je zadatak istraživanja obuhvaćao usporedbu ekspresije *c-MYC* gena iz RNA izolirane iz egzosoma u bolesnika s CRC-om te tkiva bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorkovanje krvi i priprema uzorka za izolaciju egzosoma

Pacijentima s potvrđenim CRC-om, stručno osposobljeni djelatnici KBC Sestre milosrdnice, uzorkovali su punu krv u *BD Vacutainer® Venous Blood Collection Tube* (kat.br. 367525) epruvete s EDTA antikoagulansom, volumena 10 mL.

Za analizu su potrebne dvije epruvete označene brojevima 1. i 2. prema redoslijedu vađenja krvi. Do transporta se uzorci pune krvi čuvaju na +4 °C te dostavljaju do mjesta radilišta na ledu. Centrifugiraju se što kraćem roku na 1900 g tijekom 10 minuta pri 4 °C (najbolje unutar 60 minuta kako bi se izbjegla hemoliza *in vitro*) u prethodno rashlađenoj centrifugi s njišućim vjedrima (engl. *Swinging-bucket Rotor*). Dobivena plazma alikvotira se u sterilnu epruvetu s koničnim dnom od 15 mL pritom pazeći da se ne zahvati srednji sloj obogaćen stanicama jer se unutar leukocita nalazi genomska DNA te miRNA. Ukoliko je uzorak plazme u smrznutom obliku, potrebno ga je otopiti na ledu ili na + 4 °C te promiješati na vrtložnoj mješalici s ciljem homogeniziranja uzorka. Uzorak plazme centrifugira se na 3000 g tijekom 15 minuta pri temperaturi od +4 °C kako bi se uklonio sav stanični materijal, fragmenti trombocita te apoptotska tjelešca. Dobiveni supernatant se potom alikvotira u epruvete od 2 mL koje ne sadrže RNaze. Prije postupka izolacije egzosoma uzorci se pohranjuju na +4 °C unutar 24 h dok je za dugoročno čuvanje uzoraka potrebno osigurati temperaturu od -20 °C.

3.2 Izolacija egzosoma QIAGEN metodom

Za izolaciju egzosoma korištena je QIAGEN metoda. Navedena metoda predstavlja brzu metodu za izolaciju te pročišćavanje egzosoma iz uzorka seruma ili plazme. Tijekom postupka izolacije korišten je *miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit* (Qiagen, Njemačka, kat. br. 76603).

Materijali u kompletu *miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit*:

- *Precipitation Buffer A*, 10 mL
- *Resuspension Buffer*, 10 mL
- *Thrombin* (liofiliziran), 200 U
- *Thrombin Buffer*, 500 µL

Dodatni korišteni materijali i oprema:

- pipete i nastavci bez RNaze
- epruvete (s koničnim dnom) volumena 15 mL
- epruvete volumena 2 mL bez RNaze
- mikrocentrifuga za epruvete volumena 2 mL za centrifugiranje na 20 °C
- vrtložna mješalica
- zamrzivač
- led

Korištene reagense potrebno je čuvati dalje od izvora svjetla pri temperaturi od 2 °C do 8 °C. Liofilizirani se trombin otapa u 400 µL odgovarajućega pufera te nakon jednogminutnoga stajanja na sobnoj temperaturi lagano promiješa i alikvotira. Alikvoti se čuvaju na temperaturi od -20 °C te se zbog stabilnosti reagensa ne ponavlja postupak odmrzavanja te ponovnoga smrzavanja.

Volumen od 600 µL plazme pomoću pipete ispipetira se u epruvete od 2 ml. Nakon dodatka 6 µL trombina epruveta se promiješa na vrtložnoj mješalici te inkubira 5 min. na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorak se plazme centrifugira na 10 000 g tijekom 10 min. pri temperaturi od 20 °C. 0,5 mL dobivenoga supernatanta prenosi se u novu epruvetu volumena od 2 mL te se nakon dodatka 200 µL odgovarajućeg pufera za precipitaciju (0,4 volumena) promiješa na vrtložnoj mješalici tijekom 5 sekundi (duže miješanje može uzrokovati pojavu pjene). Slijedi inkubacija uzorka na +4 °C minimalno 60 minuta. Nakon provedene inkubacije uzorak se centrifugira na 500 g tijekom 5 minuta pri temperaturi od 20 °C, supernatant se odlije, a u dobivenom talogu nalaze se egzosomi. Kako bi se uklonio i preostali supernatant, uzorak se kratko centrifugira. U epruvetu s talogom dodaje se 270 µL pufera za resuspendiranje te promiješa na vrtložnoj mješalici kako bi se resuspendirali egzosomi. Konačni volumen egzosoma iznosi oko 300 µL. Uzorak izoliranih egzosoma moguće je pohraniti na 2 - 8 °C do 2 dana te na -20 °C (-65 °C) tijekom duljega razdoblja. Postupak izolacije RNA izvodi se odmah nakon postupka izolacije egzosoma kako bi se izbjegla razgradnja RNA molekule prisutnim RNazama.

3.3 Izolacija ukupne RNA iz egzosoma

Za izolaciju RNA iz egzosoma korišten je komercijalno dostupan komplet *miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit* (Qiagen, Njemačka, kat. br. 217204).

Materijali u kompletu *miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit*:

- 50 *RNeasy® UCP MinElute® Spin Columns*
- 50 *Collection Tubes* (1,5 mL)
- 20 *Collection Tubes* (2 mL)
- *Buffer RPL*, 20 mL
- *Buffer RPP*, 8 mL
- *Buffer RWT*, 15 mL
- *Buffer RPE*, 1 mL
- voda bez RNaze, 10 mL

Ostali potrebni materijali i oprema:

- 100 % izopropanol
- 80 % etanol
- sterilni nastavci bez RNaze
- epruvete (1,5 mL ili 2 mL)
- mikrocentrifuga
- vrtložna mješalica
- jednokratne rukavice

Izolacija ukupne RNA vrši se iz 200 μ L egzosoma. Prije početka postupka izolacije RNA pripremaju se radne otopine pufera RWT i RPE dodatkom apsolutnoga etanola. Svi koraci izolacije provode se na sobnoj temperaturi (sve pufere je potrebno ekvilibrirati na sobnu temperaturu).

200 μ L uzorka izoliranih egzosoma prenese se u epruvetu volumena 2 mL u koju se potom dodaje 60 μ L pufera RPL. Zatvorena epruveta promiješa se na vrtložnoj mješalici najmanje 5 sekundi te inkubira 3 minute. Nakon dodavanja 20 μ L pufera RPP ponovno se promiješa na vrtložnoj mješalici 20 sekundi te inkubira 3 minute. Potpunim miješanjem

epruveta postiže se separacija faza. Slijedi centrifugiranje na 12000 g tijekom 3 minute na sobnoj temperaturi nakon kojeg bi supernatant trebao biti bistar i bezbojan. Dobiveni supernatant (~230 µL za 200 µL uzorka) prenosi se u novu epruvetu zajedno s izopropanolom te promiješa na vrtložnoj mješalici. U idućem koraku, cijeli se uzorak prenosi u *RNeasy UCP MinElute* kolonu, zatvara poklopac te centrifugira 15 sekundi na 8000 g. Budući da je RNA vezana za kolonu, tekućina ispod kolone se baca. Zatim se otpipetira 700 µL pufera RWT na *RNeasy UCP MinElute spin* kolonu, zatvori poklopac te centrifugira 15 s na 8000 g. Tekućina ispod kolone ponovno se baca. U istu epruvetu za sakupljanje dodaje se 500 µL pufera RPE na *RNeasy UCP MinElute spin* kolonu te ponavlja postupak centrifugiranja. Tekućinu ispod kolone potrebno je baciti. Kako bi se membrana kolone oprala, u epruvetu za skupljanje dodaje se 500 µL 80 % etanola te zatvorenu kolonu centrifugira 2 minute na 8000 g (10,000 rpm). U se idućem koraku pažljivo odvajaju *RNeasy UCP MinElute spin* kolona od epruvete za sakupljanje s ciljem sprječavanja zagađenja kolone etanolom. *RNeasy UCP MinElute spin* kolonu se postavlja na novu epruvetu za sakupljanje od 2 mL te otvorenu centrifugira na punoj brzini 5 minuta s ciljem sušenja membrane budući da etanol može interferirati u daljnjim analizama (primjerice u metodi lančane reakcije polimeraze, PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*). Budući da su kolone otvorene, oštećenje poklopaca izbjegava se postavljanjem kolona s jednim mjestom razmaka između te okretanjem poklopaca u smjeru suprotnom od smjera rotacije rotora. Epruveta sa sakupljanje nije potrebna te se baca. *RNeasy UCP MinElute spin* kolona postavlja se u novu epruvetu za sakupljanje te dodaje 20 µL vode bez RNaze izravno na središnji dio membrane nakon čega slijedi inkubacija 60 sekundi. Nakon inkubacije, zatvorena se epruveta centrifugira 60 sekundi na maksimalnoj brzini kako bi se RNA molekula eluirala s membrane. S obzirom da je mrtvi volumen *RNeasy UCP MinElute spin* kolone 2 µL, konačni volumen eluata iznosi 18 µL. Tako pročišćena ukupna RNA stabilna je i do godinu dana na -30 °C do -15 °C ili -90 °C do -65 °C u vodi bez RNaza.

3.4 Izolacija ukupne RNA iz tkiva uronjenoga u parafin

Svježe kirurški odstranjeno tkivo fiksira se u 4 - 10 %-tnom neutralnom formalinu te nakon provedenoga procesa ispiri i dehidrira. Kao medij za uklapanje koristi se parafin niske temperature taljenja. Za postupak izolacije ukupne RNA iz tkiva fiksiranih formalinom te uklopljenih u parafin koristi se *RNeasy FFPE* komplet. *RNeasy FFPE* kompletom moguće je izolirati molekule RNA dulje od 70 nukleotida. RNA izolirana iz FFPE (engl. *Formalin-fixed, Paraffin-embedded*) tkiva manje je molekularne mase u odnosu na RNA izoliranu iz svježih ili

smrznutih tkiva. Razlog tome leži u fragmentaciji i kemijskoj modifikaciji RNA uzrokovanoj formaldehidom.

Materijali u *RNeasy FFPE* kompletu:

- *RNeasy MinElute Spin* kolone
- epruvetice za sakupljanje, 1,5 mL
- epruvetice za sakupljanje, 2 mL
- pufer RBC (sadrži gvanidinske soli)
- pufer PKD
- proteinaza K
- DNaza bez RNaza
- voda bez RNaza (za upotrebu s DNazom bez RNaza)
- *DNaza Booster Buffer*
- pufer RPE (koncentrat)**
- voda bez RNaza

Dodatni potrebni materijali i oprema:

- sterilni nastavci za pipete, bez RNaza
- epruvetice, 1,5 mL
- epruvetice, 2 mL
- mikrocentrifuga (s rotorom za epruvetice volumena 2 mL)
- vrtložna mješalica
- 100 %-tni etanol
- deparafinizirajuća otopina
- rukavice
- termoblok (poželjno dva komada)
- ledomat

Postupak izolacije RNA iz uzorka tkiva provodi se na sobnoj temperaturi. Iz svježih rezova FFPE tkiva parafin se uklanja deparafinizirajućom otopinom. Uzorak se inkubira u puferu optimalnom za lizu stanica koji sadrži proteinazu K (omogućava digestiju proteina i oslobađanje RNA iz tkiva). Kratka inkubacija na visokoj temperaturi smanjuje vezanje nukleinskih kiselina za formalin što u konačnici rezultira većim prinosom i kvalitetom RNA.

Veća kvaliteta te količina izolirane RNA važna je za daljnje analize RNA poput qPCR-a (engl. *Quantitative PCR*). Uzorak se tretira DNazom kako bi se razgradila genomska DNA te se dodaje RBC pufer i alkohol (etanol) koji omogućuje precipitaciju nukleinskih kiselina. Za postupak ispiranja koristi se voda za ispiranje bez RNaza (voda tretirana sa histidinskim specifičnim alkilirajućim agensom dietilpirokarbonatom (DEPC) koji inaktivira RNaze).

Protokol izolacije RNA iz FFPE tkiva:

Rezovi tkiva debljine od 5 do 20 μm postavljaju se u sterilne epruvetice od 1,5 mL (*ukoliko se radi o 1 ili 2 reza tkiva) ili 2 mL (**za više od 2 reza tkiva). Dodaje se 160 μL * ili 320 μL ** deparafinizirajuće otopine, promiješa na vrtložnoj mješalici 10 sekundi te kratko centrifugira. Potom se inkubira na 56° C 3 minute i ohladi na sobnu temperaturu. Ukoliko je volumen dodane deparafinizirajuće otopine nedovoljan, smjesa će nakon hlađenja poprimiti voštani ili čvrsti oblik. Ako se to dogodi, potrebno je dodati dodatni volumen deparafinizirajuće otopine te ponoviti inkubaciju. U idućem koraku dodaje se 150 μL * ili 240 μL ** PKD pufera, promiješa na vrtložnoj mješalici te centrifugira 1 minutu na 11 000 g (10 000 rpm). U donju, čistu fazu, ispipetira se 10 μL proteinaze K te lagano promiješa provlačenjem otopine kroz nastavak pipete. Uzorak se inkubira 60 minuta 56 °C (uz lagano miješanje) te potom 15 minuta na 80° C (dulja inkubacija na 80 °C može rezultirati većom fragmentacijom RNA, ali i nižim Ct vrijednostima u qPCR-u). Donju, bezbojnu fazu, prenese se u novu epruveticu, inkubira na ledu 3 minute te centrifugira 15 minuta na 20 000 g (13 500 rpm). Dobiveni supernatant prenese se u novu epruveticu, pazeći pritom da se ne dodiruje talog koji sadrži netopive ostatke tkiva i DNA. Potom se dodaje 1/10 ukupnog volumena (oko 16 μL * ili 25 μL ** *DNaza booster* pufera) i 10 μL otopljenoga i odmrznutoga alikvota DNaze, lagano promiješa okretanjem epruvetice te kratko centrifugira. Uzorak se inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodaje se 320 μL * ili 500 μL ** pufera RBC, dobro promiješa na vrtložnoj mješalici te doda 720 μL * ili 1200** μL 100 %-tnog etanola. Uzorak se promiješa na vrtložnoj mješalici. U sljedećem koraku, 700 μL uzorka prenosi se na *RNeasy MinElute spin* kolonu koja je stavljena na epruveticu za sakupljanje od 2 mL. Poklopac se nježno zatvori te centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Otopina koja ostane u epruveticu za sakupljanje se baca, a epruvetica se koristi za sljedeći korak. Postupak se ponavlja dok se cijeli volumen uzorka ne iskoristi. Potom se dodaje 500 μL RPE pufera na kolonu (prije prvog korištenja RPE pufera, potrebno je dodati 4 volumena etanola (96 - 100 %)), lagano se zatvori čep te centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Otopina koja ostane u epruvetici za sakupljanje

se baca, a epruvetice se koristi za sljedeći korak. Ponovno se dodaje 500 μ L RPE pufera na kolonu, zatvori se čep te centrifugira 30 sekundi na više od 8 000 g (više od 10 000 rpm). Epruvetice za sakupljanje se baca zajedno s otopinom koja u njoj ostane nakon centrifugiranja. Kolona se pažljivo prenese u čistu epruveticu od 2 mL, otvori čep kolone (centrifugiranje s otvorenim čepom omogućava da se etanol ne prenosi u daljnje korake i da ne interferira s kasnijom analizom RNA) te centrifugira na maksimalnoj brzini 5 minuta. Budući da su kolone otvorene, oštećenje poklopaca izbjegava se postavljanjem kolona s jednim mjestom razmaka između te okretanjem poklopaca u smjeru suprotnom od smjera rotacije rotora. U posljednjem koraku, kolona se prebaci u čistu epruveticu od 1,5 mL te doda 14 - 30 μ L (20 μ L) vode bez RNaza. Nakon zatvaranja čepa, uzorak se centrifugira 60 sekundi na maksimalnoj brzini.

3.5 Određivanje koncentracije i kvalitete RNA molekule

Izolacija ukupne RNA predstavlja prvi korak u analizi genske ekspresije. Za uspješno provođenje daljnjih postupaka, potrebno je osigurati nedegradirani kalup RNA visoke čistoće bez ostataka proteina, soli, boje ili fenola. Čistoća se RNA referira prisutnost drugih molekula u izolatu. Budući da molekula RNA apsorbira svjetlost u ultraljubičastom području uz maksimalnu apsorpciju pri valnoj duljini od 260 nm, uobičajeno se koristi spektrofotometrijska metoda za određivanje koncentracije i onečišćenje uzorka proteinima (A_{260}/A_{280}) te solima (A_{260}/A_{230}). Kada je riječ o niskim koncentracijama te malim molekulama RNA spektrofotometrijsko mjerenje, zbog nedovoljne pouzdanosti, nije metoda izbora za procjenu koncentracije i integriteta molekule RNA. U ovom radu, koncentracija RNA izolirane iz tkiva određivala se pomoću mikrovolumnog spektrofotometra DS-11 (Denovix, SAD). No, s ciljem dobivanja pouzdanih rezultata kvalitete te integriteta molekula RNA izolirane iz tkiva koristila se metoda kapilarne elektroforeze na uređaju Bioanalyzer 2100 uz pomoć kompleta *RNA 6000 pico total RNA Kit* (Agilent, SAD).

Materijali u kompletu *RNA 6000 Pico Kit* (Agilent, SAD)

- 25 *RNA Pico* čipova
- 3 *Electrode Cleaners*
- (plavi) *RNA 6000 Pico* koncentrat boje 18
- (zeleni) *RNA 6000 Pico Marker* (4 epruvete)
- (bijeli) *RNA 6000 Pico Conditioning Solution*
- (crveni) *RNA 6000 Pico Gel Matrix* (2 epruvete)
- (žuti) *RNA 6000 Pico Standard* (1 epruveta, 10x koncentrat)
- 4 filtera
- epruvete za miješanje boje i gela
- igla

Dodatni potrebni materijali i oprema:

- voda, bez RNaza
- pipete (10 μ L i 1000 μ L) s odgovarajućim nastavcima
- epruvete 0,5 mL bez RNaza
- mikrocentrifuga
- termoblok za zagrijavanje
- vrtložna mješalica

Prije samog početka analize reagensi se odmrznu i temperiraju na sobnoj temperaturi najmanje 30 minuta dok se elektrode analizatora Bioanalyzer 2100 ispiru vodom bez RNaza. Također, provodi se proces denaturacije RNA grijanjem 2 minute pri 70 °C te hlađenjem na ledu do korištenja. Čipovi se pune na način da se u njih doda 9 μ L mješavine gela i boje te rasporedi pomoću igle za nanošenje. U jažice čipa se doda po 1 μ L *Conditioning Solution*, markera, standarda te uzorka. Čip se promiješa na vrtložnoj mješalici 60 sekundi na 2400 rpm te postavi na nosač čipa na uređaju Bioanalyzer 2100. Za praćenje analize se koristi program *Eukaryote Total RNA Pico Series Assay*.

3.6 Metoda reverzne transkripcije

Kvantifikacija jednolančane mRNA molekulu pomoću PCR-a u stvarnom vremenu obuhvaća reverznu transkripciju izolirane RNA kako bi se prevela u komplementarnu DNA (cDNA). Odgovoran enzim za generiranje komplementarne DNA molekule jest reverzna transkriptaza (RT).

Za postupak reverzne transkripcije korišten je komercijalno dostupan *RevertAid First Strand cDNA Synthesis komplet* (Thermo Fisher Scientific, SAD) na uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD).

Materijali u *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* kompletu:

- *RevertAid RT* enzim
- *RiboLock RNase Inhibitor*
- *5x Reaction Buffer* koji sadrži: 250 mM Tris-HCL (pH 8,3), 250 mM KCL, 20 mM MgCl₂ te 50 mM DTT
- *dNTP Mix*, 10 mM
- *Oligo(dT)₁₈ Primer*, 100 μM
- *Random Hexamer Primer*, 10 μM
- voda bez nukleaza

Dodatni potrebni materijali i oprema:

- pipete s odgovarajućim nastavcima
- mikrocentrifuga
- vrtložna mješalica
- epruvete bez RNaza (0,2 mL i 1,5 mL)

Uzorci izolirane RNA zajedno s potrebnim reagensima temperiraju se na sobnoj temperaturi desetak minuta. Za to vrijeme, pripreme se epruvete volumena 0,2 mL i označe brojevima, a u posebnoj sterilnoj epruveti od 1,5 mL pripremi se reakcijska smjesa prema navedenom protokolu (Tablica 1.).

Tablica 1. Protokol za izradu reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

<i>Oligo(dT)₁₈ Primer</i>	1 μ L
<i>Random Hexamer Primer</i>	1 μ L
<i>Reaction Buffer</i>	4 μ L
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	1 μ L
<i>RevertAid RT enzim</i>	1 μ L
<i>dNTP Mix</i>	2 μ L
Ukupno	10 μL

Svježa pripremljena reakcijska smjesa se potom promiješa na vrtložnoj mješalici te kratko centrifugira. U pripremljene sterilne epruvete volumena 0,2 mL dodaje se 10 μ L reakcijske smjese te 10 μ L vodene otopine RNA. Epruvete se zatvore te poslože na nosač koji se postavi na uređaj GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD). Program na uređaju odabire se na temelju prethodno definiranih uvjeta reverzne transkripcije (tablica 2.)

Tablica 2. Uvjeti reverzne transkripcije.

Korak	Temperatura/ $^{\circ}$ C	Trajanje/mm:ss
Inkubacija	25	5:00
Sinteza komplementarnog lanca	42	60:00
Prekid reakcije	70	5:00

3.7 Taqman ® metoda q-PCR-a

Nakon provedene reakcije reverzne transkripcije, dobivena cDNA koristi se kao kalup za umnažanje te kvantifikaciju ekspresije gena *c-MYC*. Usporedno, određuje se ekspresija referentnoga gena koji kodira gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*).

Kvantitativni PCR, qPCR ili PCR u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) omogućava mjerenje količine nastalog PCR produkta u stvarnom vremenu pomoću fluorescentno obilježenih i hidrolizirajućih Taqman® sonde koje su komplementarne jednolančanoj DNA molekuli. Po kemijskom sastavu TaqMan® sonde su oligonukleotidi koji su na 5'-kraju obilježeni fluorescentnom bojom, a na 3'-kraju prigušivačem. Na temelju principa FRET-a (engl. Fluorescence Energy Resonance Transfer) te 5'-egzonukleazne aktivnosti Taq-polimeraze (izolirane iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*) omogućeno je mjerenje količine nastalog PCR produkta. Nakon što se reakcijska smjesa osvjetli svjetlošću koju stvara mjerni instrument, tu svjetlost na TaqMan sonde apsorbira fluorescentna boja te istu emitira u obliku zračenja veće valne duljine. U slučaju da je TaqMan sonda kompletna, prigušivač koji se nalazi u blizini apsorbira će emitirano zračenje što će za posljedicu imati nemogućnost detekcije fluorescentnoga signala. Kada se TaqMan® sonda veže na jednolančanu molekulu DNA, tijekom sinteze novog lanca doći će do njezine razgradnje te detekcije fluorescentnoga signala jer se fluorescentna boja i prigušivač više ne nalaze u blizini. Količina nastalog fluorescentnoga signala izravno je proporcionalna količini nastalog PCR produkta.

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu izvodila se na analizatoru 7500 Real Time PCR System koristeći *TaqMan Universal MasterMix* koji sadrži:

- *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)*
- *Uracil-N glycosylase (UNG)*
- *dNTPs with dUTP*
- *ROX™ Passive Reference*
- *Optimized buffer components*

Također, korišten je *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems SAD) koji sadrži:

- Hs03929097_g1 za *GAPDH*
- Hs00153408 m1 za *c-MYC*

Nakon provedene reakcije reverzne transkripcije, u epruvetu koja sadrži 5 μL cDNA dodaje se 22,5 μL dH₂O. Pločica za kvantitativni PCR sadrži 96 jažica u koje se dodaje otopina *MasterMix*-a, *TaqMan Gene Expression Assays* te razrijeđeni cDNA uzorak. Korišteni volumeni nalaze se u tablici 3. Program se na uređaju 7500 Real Time PCR System odabire na temelju prethodno definiranih uvjeta reakcije (tablica 4.)

Tablica 3. Komponente qPCR s odgovarajućim volumenima.

<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix</i>	5 μL
<i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>	0,5 μL
Razrijeđena otopina cDNA	4,5 μL
Ukupno	5,5 μL

Tablica 4. Uvjeti qPCR-a.

	UNG inkubacija	Aktivacija DNA polimeraze	PCR (40 ciklusa)	
			Denaturacija cDNA	Stvaranje lanca
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Vrijeme (mm:ss)	02:00	10:00	00:15	01:00

3.8 Statistička obrada podataka

Korišteni test za statističku obradu podataka jest dvostrani Mann Whitney U test u programu *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc., SAD). Rezultati su prikazani u obliku medijana, interkvartilnog raspona te intervala pouzdanosti za obje grupe ispitanika. $P < 0,05$ smatra se statistički značajnom vrijednošću.

4. REZULATI I RASPRAVA

4.1 Ekspresija gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva pacijenata s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 46 ispitanika. Uzorci tkiva koji su se koristili u istraživanju uzorkovani su od pacijenata s pre-CRC stadijem te pacijenata s potvrđenim CRC-om iz KBC Sestre Milosrdnice. Sudjelovalo je 33 ispitanika s pre-CRC stadijem te 13 ispitanika oboljelih od CRC-a. Spol ispitanika naveden je u tablici 5.

Tablica 5. Spol ispitanika kod kojih je mjerena ekspresija gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva.

Broj (%) ispitanika			
	Muškarci	Žene	Ukupno
pre-CRC	20 (60,6)	13 (39,4)	33 (71,7)
CRC	7 (53,8)	6 (46,2)	13 (28,3)
Ukupno	27 (58,7)	19 (41,3)	46 (100)

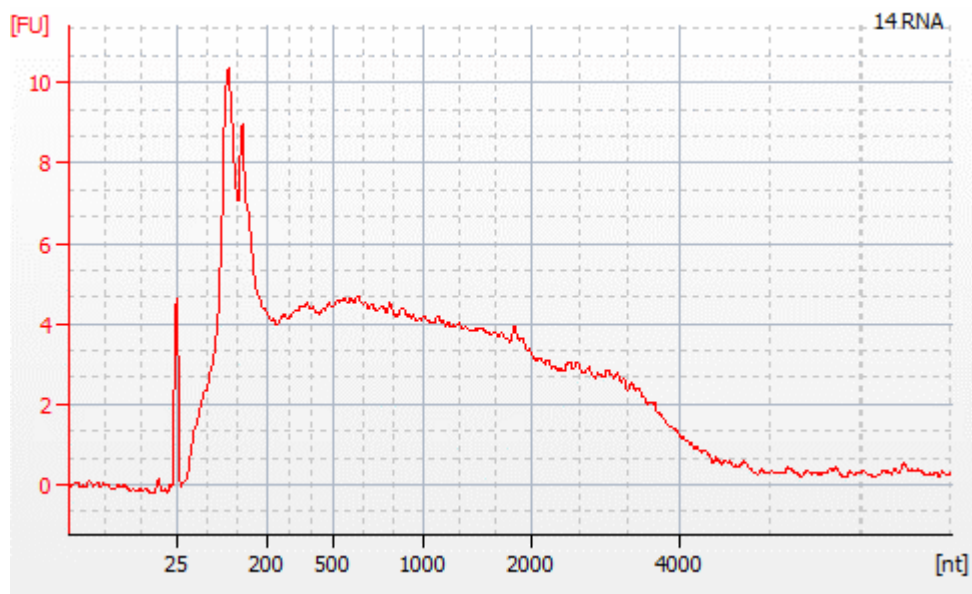
4.1.1 Analiza koncentracije, kvalitete i integriteta RNA molekule

Nakon provedene izolacije, koncentracija dobivene RNA određivala se pomoću mikrovolumnog spektrofotometra DS-11 (DeNovix, SAD). Dobivene vrijednosti koncentracija izoliranih RNA molekula navedene su u tablici 6.

Tablica 6. Vrijednosti koncentracija izolirane RNA molekule

Koncentracija RNA (ng/ μ L)		
	Raspon (min. - max.)	Medijan
pre-CRC	85,52 - 1882,46	670,43
CRC	187,22 - 1022,90	580,31

Budući da molekulu RNA karakterizira izrazita osjetljivost na razgradnju sve prisutnim RNazama, u uzorku se izolirana RNA može nalaziti u fragmentiranom obliku. S ciljem provjeravanja kvalitete izolirane RNA molekule, metodom kapilarne elektroforeze na uređaju Bioanalyzer 2100 koristeći *RNA 6000 Pico Total RNA kit* (Agilent, SAD), određena je razina integriteta RNA (RIN engl. *RNA Integrity Number*).



Slika 4. Elektroferogram RNA izolirane iz uzoraka FFPE tkiva br. 14.

Izmjerene vrijednosti razine integriteta RNA izolirane u bolesnika s pre-CRC-om nalazile su se u rasponu od 1 do 2,6 (medijan je iznosio 2,3). Vrijednosti razine integriteta RNA izolirane u bolesnika s potvrđenim CRC-om nalazile su se u rasponu od 1 do 2,6 s medijanom 2,25. Kod RNA izolirane iz FFPE tkiva očekuje se niska vrijednost razine integriteta zbog degradacije RNA tijekom postupka fiksacije FFPE tkiva te skladištenja uzorka. Stoga, za

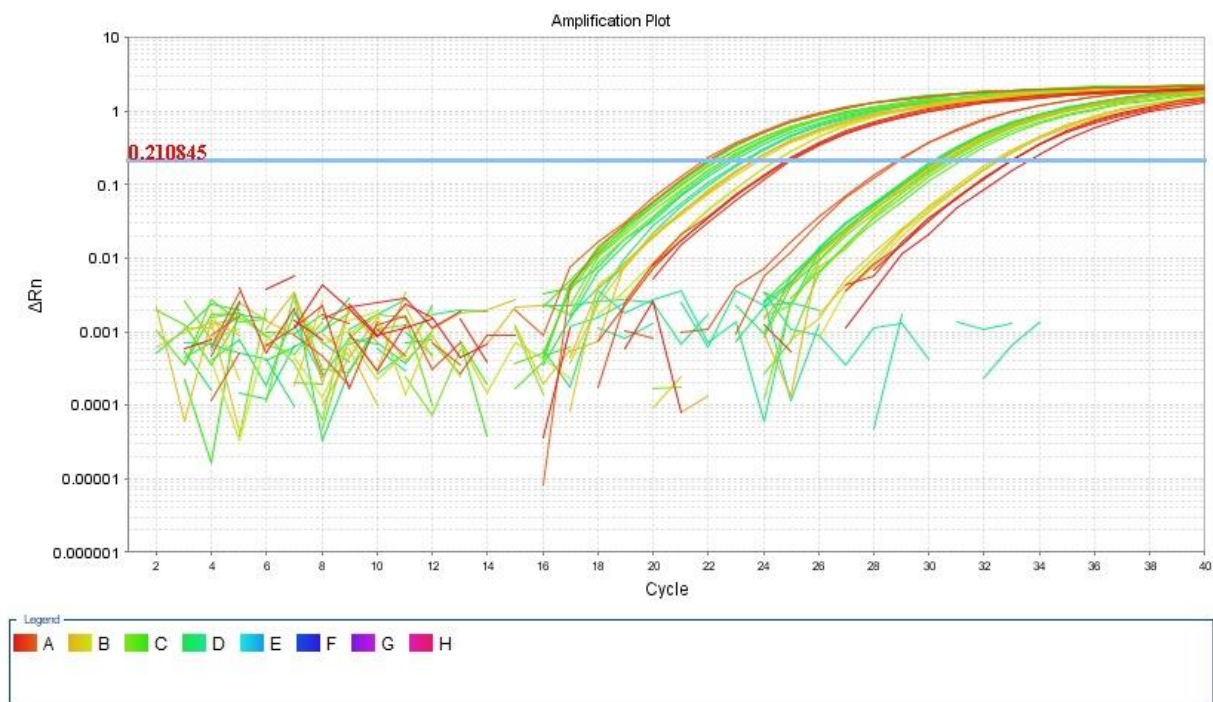
procjenu integriteta uzorka, uz RIN, određen je postotak fragmenata RNA veličine od 200 nukleotida (engl. *DV200*) te postotak fragmenata RNA veličine do 200 nukleotida. Na elektroferogramu RNA izolirane iz uzoraka FFPE tkiva br. 14 prisutan je vršak između 25 i 200 nukleotida što upućuje na prisutnost degradirane RNA molekule (Slika 4.). Vrijednosti spomenutih indeksa za procjenu integriteta molekule RNA za obje skupine ispitanika nalaze se u tablici 7.

Tablica 7. Vrijednosti indeksa za procjenu integriteta molekule RNA.

	RIN		RNA < 200 nt (%)		DV200 (%)	
	Raspon (min. - max.)	Medijan	Raspon (min. - max.)	Medijan	Raspon (min. - max.)	Medijan
pre-CRC	1,0 - 2,6	2,30	14 - 96	39,0	4 - 86	61,0
CRC	1,0 - 2,6	2,25	28 - 90	53,5	10 - 72	46,5

4.1.2 Analiza ekspresije gena *c-MYC*

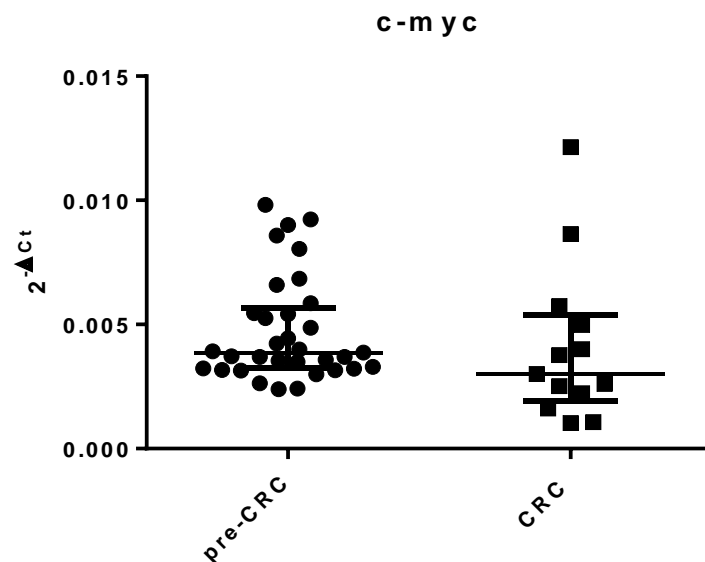
Nakon određivanja koncentracije i integriteta izolirane RNA uslijedio je proces reverzne transkripcije te određivanja ekspresije gena *c-MYC* i referentnoga gena *GAPDH* metodom qPCR-a uz primjenu TaqMan sonde na uređaju 7500 Real Time PCR System. Prag C_t (engl. *Cycle Threshold*) označava ciklus u kojem intenzitet fluorescencije prelazi pozadinsku fluorescenciju. Budući da je ekspresija gena *GAPDH* nepromijenjena u svim stanicama organizma bez obzira na uvjete u stanici (engl. *Housekeeping Gene*), analiza ekspresije gena *c-MYC* dobivena je usporedbom dobivenih C_t vrijednosti uz normalizaciju prema referentnom genu *GAPDH*. Na amplifikacijskoj krivulji za ekspresiju ciljnog gena (*c-MYC*) te referentnoga gena (*GAPDH*) vidljivo je uspješno umnažanje gena od interesa (Slika 5.).



Slika 5. Amplifikacijska krivulja za ekspresiju *c-MYC* te referentnog gena *GAPDH* dobivena na uređaju 7300 Real Time PCR System.

4.1.3 Usporedba ekspresije gena *c-MYC* u bolesnika s pre-CRC i CRC stadijem

Rezultati ekspresije gena *c-MYC* u bolesnika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om izraženi su pomoću vrijednosti $2^{-\Delta ct}$ (Slika 6.). Vrijednost $2^{-\Delta ct}$ ukazuje koliko je puta više eksprimiran gen od interesa u odnosu na referentni gen. EkspONENT $-\Delta ct$ označava negativnu vrijednost razlike između ekspresije ciljnoga gena *c-MYC* i referentnoga gena *GAPDH*. Medijan vrijednosti $2^{-\Delta ct}$ bolesnika s pre-CRC stadijem iznosio je 0,003874 s interkvartilnim rasponom od 0,003226 do 0,005655. Srednja vrijednost $2^{-\Delta ct}$ iznosila je 0,004752 sa standardnom odstupanjem od 0,002111. 95 %-tni interval pouzdanosti iznosio je 0,004004-0,005501. Nasuprot tome, medijan vrijednosti $2^{-\Delta ct}$ bolesnika s potvrđenim CRC-om iznosio je 0,003001 s interkvartilnim rasponom od 0,001929 do 0,005368 dok je srednja vrijednost $2^{-\Delta ct}$ iznosila 0,004106 sa standardnom odstupanjem od 0,003204. 95 %-tni interval pouzdanosti iznosio je od 0,002170 do 0,006042. Usporedbom rezultata vrijednosti $2^{-\Delta ct}$ u bolesnika s pre-CRC stadijem te potvrđenim CRC-om pomoću Mann Whitney U test statistike izračunata je p-vrijednost koja je iznosila 0,1353. Budući da je dobivena p-vrijednost veća od razine značajnosti testa ($p > 0,05$) može se zaključiti kako ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije gena *c-MYC* u bolesnika s pre-CRC stadijem te potvrđenim CRC-om.



Slika 6. Ekspresija gena *c-MYC* u bolesnika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om izražena kao $2^{-\Delta ct}$.

4.2 Ekspresija gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz egzosoma bolesnika s potvrđenim CRC-om

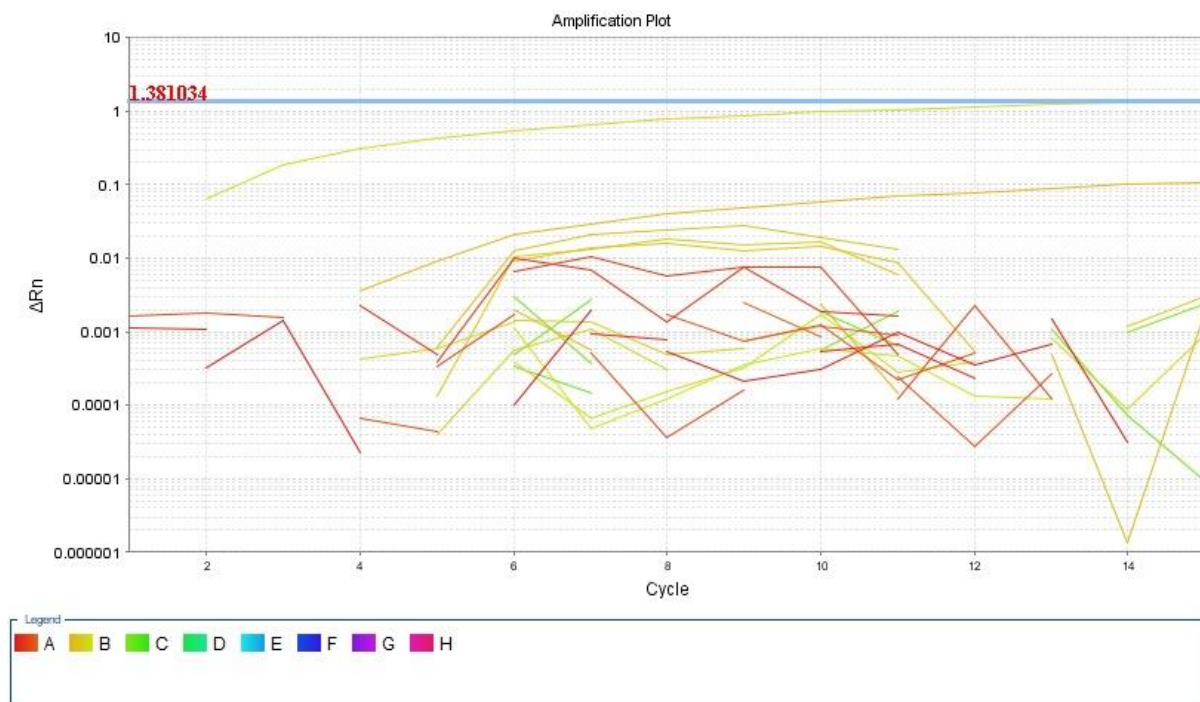
U istraživanju je sudjelovalo ukupno 18 ispitanika. Uzorci tkiva koji su se koristili u istraživanju uzorkovani su od pacijenata s potvrđenim CRC-om iz KBC Sestre Milosrdnice. Iz uzoraka pune krvi s EDTA antikoagulansom izolirana je RNA iz egzosoma. Koncentracija izolirane RNA određivala se pomoću mikrovolumnog spektrofotometra DS-11 (DeNovix, SAD) te je uslijedilo određivanje transkripata gena *c-MYC* i referentnoga gena *GAPDH* metodom qPCR-a uz primjenu TaqMan sonde na uređaju 7500 Real Time PCR System.

4.2.1 Analiza koncentracije RNA molekule

Nakon provedene izolacije RNA iz egzosoma, koncentracija dobivene RNA molekule određivala se pomoću mikrovolumnog spektrofotometra DS-11 (DeNovix, SAD) mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Minimalna koncentracija RNA izolirana iz egzosoma bolesnika s potvrđenim CRC-om iznosila je 2,438 ng/ μ L, dok je maksimalna koncentracija iznosila 38,080 ng/ μ L (medijan koncentracije iznosio je 9,921 ng/ μ L). 95 %-tni interval pouzdanosti nalazio se u rasponu od 7,716 ng/ μ L do 15,510 ng/ μ L.

4.2.2 Analiza ekspresije gena *c-MYC*

Nakon određivanja koncentracije RNA uslijedio je proces reverzne transkripcije i određivanja ekspresije gena *c-MYC* te referentnoga gena *GAPDH* metodom qPCR-a uz primjenu TaqMan sonde na uređaju 7500 Real Time PCR System. Na amplifikacijskoj krivulji za ekspresiju ciljnoga gena (*c-MYC*) te referentnoga gena (*GAPDH*) vidljivo je neuspješno umnažanje gena od interesa i referentnog gena (Slika 7.) Nepravilni te mali signali na amplifikacijskoj krivulji ne prelaze baznu liniju te su vjerojatno rezultat pozadinske fluorescencije. Potencijalni uzroci neuspješnog umnažanja *c-MYC* i *GAPDH* mogu biti niske koncentracija RNA izolirane iz egzosoma, prisutnost degradirane RNA molekule u uzorku ili visoki udio miRNA u ukupnoj izoliranoj RNA molekuli. Budući da nije detektirana ekspresija ciljnog gena *c-MYC* u uzorku RNA izolirane iz egzosoma bolesnika s potvrđenim CRC-om, nije bilo moguće provesti usporedbu ekspresije gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz egzosoma u bolesnika s CRC-om te tkiva bolesnika s pre-CRC-om i CRC-om.



Slika 7. Amplifikacijska krivulja za ekspresiju gena *c-MYC* te referentnoga gena *GAPDH* dobivena na uređaju 7300 Real Time PCR System.

4.3 Rasprava

Kolorektalni karcinom zbog visoke incidencije i stope smrtnosti predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Ukoliko se pacijentu postavi dijagnoza CRC-a u ranijem stadiju, vjerojatnost za 5-godišnjim preživljenjem iznosi i do 97 %. Karcinogeneza CRC-a kompleksan je proces u kojem pojačana ekspresija gena *c-MYC* igra važnu ulogu utječući na signalne puteve poput Wnt i Notch (Tan i sur., 2022). U studiji koju su proveli Wang i sur. (2017) na 470 pacijenata oboljelih od CRC-a, uočena je statistički značajna razlika u ekspresiji gena *c-MYC* u tkivu zahvaćenim karcinomom u odnosu na nezahvaćeno (normalno) tkivo. Stupanj ekspresije gena *c-MYC* pozitivno je korelirao sa starošću, dubinom invazije, stupnjem proširenosti (prema TNM klasifikaciji) i zahvaćenosti limfnih čvorova. U provedenom istraživanju, Hu i sur. (2021) dokazali su da postoji korelacija između stadija CRC-a i razine ekspresije gena *c-MYC*. Štoviše, utvrdili su da je ekspresija gena *c-MYC* relativno povećana u kasnijem stadiju u odnosu na raniji stadij CRC-a.

Kako bi se ispitao potencijal gena *c-MYC* u postavljanju rane dijagnoze CRC-a, bilo je potrebno usporediti ekspresiju gena *c-MYC* u bolesnika sa stadijem karcinoma „*in situ*“ (adenom) te u bolesnika s potvrđenim invazivnim CRC-om. U provedenom istraživanju

sudjelovale su dvije grupe ispitanika: 33 ispitanika s pre-CRC-om te 13 ispitanika s potvrđenim CRC-om. Budući da fragmentirana RNA može kompromitirati konačne rezultate istraživanja, određivanje kvalitete i razine integriteta RNA smatra se neizostavnim korakom prije daljnje analize. U prošlosti, kvaliteta i integritet molekule RNA procjenjivali su se primjenom gel elektroforeze na agaroznom gelu te vizualnim očitavanjem veličine 28S i 18S vrpce ribosomskih RNA nakon bojanja etidijevim bromidom. Zbog velikog utjecaja ljudskoga faktora na interpretaciju rezultata te nemogućnosti interlaboratorijske usporedbe, postojala je potreba za pronalaskom novoga načina procjene (Schroeder i sur., 2006). Danas se zlatnim standardom za procjenu integriteta RNA smatra određivanje RIN vrijednosti. „Agilent Technologies“ predstavili su uređaj Bioanalyzer 2100 koji omogućuje automatsko određivanje RIN vrijednosti metodom kapilarne elektroforeze. Za klasifikaciju integriteta RNA, uređaj Bioanalyzer 2100 koristi omjernu skalu od 1 (potpuno degradirana RNA) do 10 (cjelovita molekula RNA) (Schroeder i sur., 2006). U istraživanju, izmjerene vrijednosti razine integriteta RNA izolirane iz FFPE tkiva bolesnika s pre-CRC-om nalazile su se u rasponu od 1 do 2,6 (medijan je iznosio 2,3) dok su se vrijednosti razine integriteta RNA izolirane iz FFPE tkiva bolesnika s potvrđenim CRC-om nalazile u rasponu od 1 do 2,6 s medijanom 2,25. Za RNA izoliranu iz uzorka FFPE tkiva, vrijednosti razine integriteta RNA očekivano su niske zbog degradacije RNA molekule tijekom procesa fiksacije FFPE tkiva te skladištenja uzorka. Stoga, za procjenu kvalitete izolirane RNA iz FFPE tkiva koristila se DV200 vrijednost (<https://www.novogene.com/>). Izmjerene DV200 vrijednosti za RNA izoliranu iz FFPE tkiva bolesnika s pre-CRC-om nalazile su se u rasponu od 4 % do 86 % s medijanom 61 %, dok su se DV200 vrijednosti RNA izolirane iz FFPE tkiva bolesnika s potvrđenim CRC-om nalazile u rasponu od 10 % do 72 % s medijanom 46,5 %. Također, uz vrijednost DV200 određen je i postotak RNA molekula manjih od 200 nukleotida. Rezultati ekspresije gena *c-MYC* u bolesnika s pre-CRC stadijem te potvrđenim CRC-om izraženi su pomoću vrijednosti $2^{-\Delta ct}$. Medijan vrijednosti $2^{-\Delta ct}$ bolesnika pre-CRC stadijem iznosio je 0,003874 s interkvartilnim rasponom od 0,003226 do 0,005655 te 95 %-tnim intervalom pouzdanosti od 0,004004 do 0,005501. Nasuprot tome, medijan vrijednosti $2^{-\Delta ct}$ bolesnika s potvrđenim CRC-om iznosio je 0,003001 s interkvartilnim rasponom od 0,001929 do 0,005368 te 95 %-tnim intervalom pouzdanosti od 0,002170 do 0,006042. Na temelju usporedbe p-vrijednosti izračunate putem Mann Whitney test statistike, provedeno istraživanje ukazuje kako ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije gena *c-MYC* u bolesnika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om. Isti su zaključak donijeli Moradifard i sur. (2021) na temelju istraživanja u kojem je sudjelovalo 55 ispitanika oboljelih od različitih stadija CRC-a. Ekspresija gena *c-MYC* u bolesnika s CRC-om tema je velikog

broja znanstvenih istraživanja. Osim što se ispituje dijagnostički potencijal gena *c-MYC*, brojna istraživanja usmjerena su na potencijalni prognostički te terapijski značaj u oboljelih od CRC-a (Tan i sur., 2022).

Prisutnost te horizontalni prijenos mRNA unutar egzosoma do ciljnih stanica objašnjen je 2007. godine zahvaljujući Valadiju i suradnicima. Molekula mRNA koja nosi uputu za sintezu proteinskih produkata onkogenih ili tumorskih supresorskih gena biva prenesena putem egzosoma do drugih stanica uzrokujući promjenu fenotipa ili štoviše, malignu transformaciju stanica. Zbog navedenoga, mRNA unutar egzosoma smatra se potencijalnim biljgom za predikciju karcinoma (Meng i sur., 2017) Cilj tekuće biopsije jest detekcija tumorskih biljega iz lako dostupnih bioloških uzoraka. Iako je krv zbog svoje lake dostupnosti uzorak izbora za brojna klinička istraživanja, izolacija mRNA iz leukocita nailazi na brojne izazove. Prisutnost u vrlo niskoj koncentraciji te visoka osjetljivost na razgradnju RNazama otežava postupak izolacije mRNA te kvantifikacije ekspresije gena od interesa. Također, prisutnost retikulocita u krvi ispitanika može utjecati na analizu genske ekspresije budući da sadrže mRNA molekule odgovorne za translaciju globinskih lanaca (<https://www.thermofisher.com>). U provedenom istraživanju nije detektirana ekspresija ciljnoga (*c-MYC*) te referentnog gena (*GAPDH*) iz RNA izolirane iz egzosoma te stoga nije bilo moguće provesti daljnju usporedbu s dobivenom ekspresijom gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva bolesnika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om. Potencijalni uzrok neuspješne detekcije gena *c-MYC* te *GAPDH* može biti niska koncentracija izolirane RNA iz egzosoma, degradiranost RNA molekule ili visoki udio miRNA molekula u ukupnoj izoliranoj RNA molekuli.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenoga istraživanja te dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- razlika između ekspresije gena *c-MYC* u ispitanika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om nije statistički značajna ($p > 0,05$);
- nije dokazana mRNA gena *c-MYC* u ukupnoj RNA izoliranoj iz egzosoma ispitanika s potvrđenim CRC-om najvjerojatnije zbog degradacije molekule RNA ili niskoga udjela mRNA u ukupnoj izoliranoj RNA;
- nije dokazan potencijal gena *c-MYC* kao biljega za rano otkrivanje CRC-a primjenom metode tekuće biopsije.

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

AIF - inducirajući faktor apoptoze (engl. *Apoptosis-induced Factor*)

APC - adenomatozna polipoza debelog crijeva (engl. *Adenomatous Polyposis Coli*)

bHLHzip - leucinski zatvarač s motivom “uzvojnica-omča-uzvojnica” (engl. *Basic Helix- loop-helix Leucine Zipper*)

BRAF - stanična signalna molekula (engl. *B - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

CA 19-9 - karbohidratni antigen 19-9 (engl. *Carbohydrate Antigen 19-9*)

Cdc25A - enzim odgovoran za defosforilaciju (engl. *Cell Division Cycle 25 A*)

CDK4 - ciklin ovisna kinaza 4 (engl. *Cyclin-dependent Kinase 4*)

cDNA - komplementarna DNA (engl. *Complementary DNA*)

CEA - karcinoembrionski antigen (engl. *Carcinoembryonic Antigen*)

cfDNA - slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *Cell-free DNA*)

cftDNA - slobodna cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *Cell-free Circulating Tumour DNA*)

CIMP - fenotip metilacije regije DNA bogate CpG sekvencama (engl. *CpG Island Methylator Phenotype*)

CIN - kromosomska nestabilnost (engl. *Chromosomal Instability*)

c-MYC - stanični MYC (engl. *Cellular Myelocytomatosis*)

COX-2 - ciklooksigenaza 2 (engl. *Cyclooxygenase 2*)

CRC - kolorektalni karcinom (engl. *Colorectal Cancer*)

Ct - razina detekcije (engl. *Threshold Cycle*)

CTC - cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *Circulating Tumour Cells*)

CTD - C-terminalna domena (engl. *C-terminal domain*)

DCC - gen koji nedostaje u karcinomu kolona (engl. *Deleted in Colorectal Cancers*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

FAP - obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *Familial Adenomatous Polyposis*)

FFPE - fiksirano formalinom te uklopljeno u parafin (engl. *Formalin-fixed, Paraffin-embedded*)

GAPDH - gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase*)

GIT - gastrointestinalni trakt

GSK3 β - kinaza glikogen sintaze 3 β (engl. *Glycogen Synthase Kinase 3 β*)

HIF-1 α - čimbenik potaknut hipoksijom (engl. *Hypoxia-Inducible Factor- 1 alpha*)

HNPCC - nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer*)

KRAS - Kirstenov virus štakorskog sarkoma (engl. *Kirsten Rat Sarcoma Virus*)

MAPK - enzim koji sudjeluje u regulaciji staničnog dijeljenja (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAX - MYC pridruženi protein X (engl. *MYC Associated Protein X*)

MB - domena koje utječu na transkripcijsku i biološku aktivnost c-MYC gena (engl. *MYC box*)

miRNA - mikro ribonukleinska kiselina (engl. *Micro Ribonucleic Acid*)

MLH1 - protein za popravak neusklađenosti DNA MLH1 (engl. *DNA Mismatch Repair Protein 1*)

MMP-7 - Matriks metaloproteinaza 7 (engl. *Matrix Metalloproteinase 7*)

MMR - geni zaduženi za kontrolu replikacije DNA (engl. *Mismatch Repair*)

MSH2 - protein za popravak neusklađenosti DNA MSH2 (engl. *DNA Mismatch Repair Protein 2*)

MSI - mikrosatelitska nestabilnost (engl. *Microsatellite Instability*)

MYC - mijelocitomatoza (engl. *Myelocytomatosis*)

NFAT - transkripcijski čimbenik (engl. *Nuclear Factor of Activated T Cells*)

NF-IL6 - transkripcijski čimbenik (engl. *Nuclear Factor Interleukin 6*)

NLS - nuklearna lokalizacijska sekvenca (engl. *Nuclear Localization Signal*)

NSAID - nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*)

NTD - N-terminalna domena (engl. *N-terminal Domain*)

p15 - stanična signalna molekula (engl. *Protein 15*)

p21 - stanična signalna molekula (engl. *Protein 21*)

p27 - stanična signalna molekula (engl. *Protein 27*)

pb - par baza

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PFS - razdoblje bez progresije bolesti (engl. *Progression Free- survival*)

PHD - prolil hidroksilaza (engl. *Prolyl Hydroxylase*)

PI3K - enzim koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa (engl. *Phosphoinositol 3-Kinase*)

PKB - protein kinaza B, regulira funkciju drugih proteina fosforilacijom (engl. *Protein Kinase B*)

PMS2 - endonukleaza za popravak neusklađenosti PMS2 (engl. *Mismatch Repair Endonuclease PMS2*)

PPRE - specifična DNA sekvenca unutar promotorske regije (engl. *Peroxisome Proliferator Response Element*)

qPCR - kvantitativni PCR (engl. *Quantitative PCR*)

RAF - stanična signalna molekula (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)
RAS - virus štakorskog sarkoma (engl. *Rat Sarcoma Virus*)
RIN - razina integriteta RNA (engl. *RNA Integrity Number*)
RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic Acid*)
RT - reverzna transkriptaza (engl. *Reverse Transcriptase*)
SMAD4 - stanični signalni proteinski sustav (engl. *Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic 4*)
SNHG15 - gen koji kodira za nekodirajuću dugolančanu RNA (engl. *Small Nucleolar RNA Host gene 15*)
TCF4/LEF - grupa čimbenika prijenosa signala (engl. *T Cell Factor 4/Lymphoid Enhanced Factor*)
TP53 - tumorski supresorski protein 53 (engl. *Tumor Protein 53*)
v-MYC - virusni MYC (engl. *Viral Myelocytomatosis*)
WNT - stanični signalni put (engl. *Wingless Related Integration Sites*)

7. LITERATURA

Abramović, I. (2022) Metilacija nestaničnoga DNA gena APC i LGALS3 u krvi i ejakulatu bolesnika s rakom prostate. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.

Badžek S, Lesko Kelović V, Pleština S, Prejac J, Majerović M, Augustin G. Unutarstanični signalni putevi u karcinogenezi kolorektalnog tumora. *Acta Chir Croat*, 2012, 9(1), 25-34.

Banjari I. KOLOREKTALNI KARCINOM I PREHRANA – ŠTO KAŽU DOKAZI?. *Hrana u zdravlju i bolesti*, 2018, specijalno izdanje(10), 58-63.

Barišić, K. Tekuća biopsija – novi pristup u dijagnozi, predviđanju i praćenju terapijskog odgovora te procjeni ishoda malignih bolesti. U: Zorc, B. (ur.) Knjiga sažetaka, Novo doba farmacije - spremni na izazove, 6. Hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2019, 50-50.

Brkić T, Grgić M. Colorectal Carcinoma. *Medicus*, 2006, 15(1_Gastroenterologija), 89-97.

Dilsiz N. Hallmarks of exosomes. *Future Sci OA*, 2021, 8(1), FSO764.

Dujmović, D. (2014) Izvanstanična cirkulirajuća DNA kao prognostički biljeg u bolesnika s limfomom. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.

Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, Sasaki K. Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9), 2340.

Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj, 2023., <https://www.hzjz.hr/>, pristupljeno 20.4.2023.

Hanžek, A. (2019) Metode za izolaciju cirkulirajućih tumorskih stanica. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, Lim YC, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, Goh KW, Hadi MA. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*, 2022, 14(7), 1732.

Hu X, Fatima S, Chen M, Huang T, Chen YW, Gong R, Wong HLX, Yu R, Song L, Kwan, HY, Bian Z. Dihydroartemisinin is potential therapeutics for treating late-stage CRC by targeting the elevated c-Myc level. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11), 1053.

Kafka, A. (2017) Promjene u strukturi gena i izraženosti proteina DVL-1, DVL-2, DVL-3 te transkripcijskih faktora TCF-1 i LEF-1 u astrocitnim tumorima mozga. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.

Kašuba, A. (2019) Mikrosatelitna nestabilnost adenokarcinoma debelog crijeva. Diplomski rad. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet.

Lotfollahzadeh S, Recio-Boiles A, Cagir B. Colon Cancer. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2022, str. 1-6.

Mazouji O, Ouhajjou A, Incitti R, Mansour H. Updates on Clinical Use of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer Screening, Diagnosis, Follow-Up, and Treatment Guidance. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9, 660924.

Meng X, Pan J, Sun S, Gong Z. Circulating exosomes and their cargos in blood as novel biomarkers for cancer. *Transl Cancer Res*, 2017, 7(2), 226-242.

Micalizzi DS, Maheswaran S, Haber, DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev*, 2017, 31(18), 1827–1840.

Moradifard S, Minucmehr Z, Ganji SM. An investigation on the c-MYC, AXIN1 and COL11A1 gene expression in colorectal cancer. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(4), 1576– 1586.

Múzes G, Bohusné BB, Szabó O, Horgas V, Sipos F. Cell-Free DNA in the Pathogenesis and Therapy of Non-Infectious Inflammations and Tumors. *Biomedicines*, 2022, 10(11), 2853.

Negi RR, Rana SV, Gupta V, Gupta R, Chadha VD, Prasad KK, Dhawan DK. Over-Expression of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(6), 1675-1681.

Obtaining the Highest Quality RNA from Blood Samples, <https://www.thermofisher.com/>, pristupljeno 15.6.2023.

Odsjek za program ranog otkrivanja raka kolona, 2023., <https://www.hzjz.hr/>, pristupljeno 24.4.2023.

Periša J, Bulić P, Špacir Prskalo Z, Gaće M, Mayer Lj. Mogućnost tekuće biopsije u kliničkoj praksi. *Libri Oncol*, 2017, 45(1), 23-0.

Rašić, I. (2017) Klinički značaj izraženosti gena BORIS i MYC u karcinomu pločastih stanica hipofarinksa. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.

Redžović A, Pavlović S, Dobrila-Dintinjana R. Cirkulirajuće tumorske stanice – pogled u budućnost. *Med Flum*, 2015, 51(3).

RNA Integrity Number (RIN) Explained, <https://www.novogene.com/>, pristupljeno 10.6.2023.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel, W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biol*, 2006, 7(3).

Sheng J, Sun H, Yu FB, Li B, Zhang Y, Zhu YT. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci*, 2020, 17(8),1095-1101.

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

Tan L, Peng D, Cheng Y. Significant position of C-myc in colorectal cancer: a promising therapeutic target. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(12), 2295-2304.

Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*, 2016, 13(1), 120–135.

Tomašković, I. (2010) Procjena vrijednosti određivanja izraženosti proteina c-myc i caveolina-1 na biopstatima u otkrivanju signifikantnog raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.

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

Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(44), 16389-97.

Wang W, Deng J, Wang Q, Yao Q, Chen W, Tan Y, Ge Z, Zhou J, Zhou Y: Synergistic role of Cull1 and c-Myc: Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2017, 38(1), 245-252.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1 Sažetak

Kolorektalni karcinom (CRC) zbog visoke incidencije i stope smrtnosti predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Ključni korak u borbi protiv ove maligne bolesti podrazumijeva rano postavljanje dijagnoze. Trenutno su mnoga istraživanja usmjerena na ispitivanje metode tekuće biopsije kao inovativnoga rješenja na području dijagnostike malignih bolesti. S ciljem uvođenja tekuće biopsije u kliničku praksu, javlja se potreba za određivanjem te validacijom potencijalnih biljega za ranu dijagnozu, odabir terapije, praćenje uspješnosti terapije, prognozu bolesti te ranu detekciju recidiva. U ovom radu ispitivao se dijagnostički potencijal gena *c-MYC* usporedbom ekspresije gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva u bolesnika s adenomom (pre-CRC) te bolesnika s CRC-om. U istraživanju je sudjelovalo 46 ispitanika od kojih je 33 ispitanika s pre-CRC-om te 13 ispitanika s potvrđenim CRC-om. Rezultati analize nisu potvrdili potencijal gena *c-MYC* kao biljega za rano otkrivanje CRC-a budući da nije postojala statistički značajna razlika između ekspresije gena *c-MYC* kod pacijenata s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om ($p > 0,05$). Istovremeno, u istraživanju se ispitivao potencijal gena *c-MYC* kao biljega za rano otkrivanje CRC-a primjenom metode tekuće biopsije kod 18 pacijenata s potvrđenim CRC-om. U uzorcima RNA izoliranih iz egzosoma nije detektirana ekspresija ni ciljnoga (*c-MYC*) niti referentnog gena (*GAPDH*) te stoga nije bilo moguće provesti daljnju usporedbu s rezultatima ekspresije gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva bolesnika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om. Neuspješna detekcija *c-MYC* te *GAPDH* gena može biti posljedica niske koncentracije RNA izolirane iz egzosoma, degradiranosti RNA molekule ili visokog udjela miRNA molekula u ukupnoj izoliranoj RNA.

8.2 Summary

Colorectal cancer (CRC) is a significant public health problem due to its high incidence and mortality rate. A key step in the fight against this malignant disease involves early diagnosis. Currently, many studies are focused on testing the method of liquid biopsy as an innovative solution in the field of diagnosis of malignant diseases. With the aim of introducing liquid biopsy into clinical practice, there is a need to determine and validate potential markers for early diagnosis, therapy selection, therapy success monitoring, disease prognosis and early recurrence detection. In this work, the diagnostic potential of the *c-MYC* gene was examined by comparing the expression of the *c-MYC* gene in RNA isolated from a tissue of patients with adenoma (pre-CRC) and patients with confirmed CRC. 46 subjects participated in the study, of which 33 subjects had pre-CRC and 13 subjects had confirmed CRC. The results of the analysis did not confirm the potential of the *c-MYC* gene as a marker for the early detection of CRC, since there was no statistically significant difference between the expression of the *c-MYC* gene of subjects with pre-CRC and confirmed CRC ($p > 0.05$). At the same time, the research examined the potential of the *c-MYC* gene as a marker for early detection of CRC using the liquid biopsy method of 18 subjects with confirmed CRC. Neither the target (*c-MYC*) nor the reference gene (*GAPDH*) expression was detected in RNA samples isolated from exosomes, and therefore it was not possible to carry out a further comparison with the results of *c-MYC* gene expression out of RNA isolated from the tissue of patients with pre-CRC and confirmed CRC. Unsuccessful detection of *c-MYC* and *GAPDH* genes may be due to low concentration of RNA isolated from exosomes, degradation of RNA molecules or a high proportion of miRNA molecules out of total isolated RNA.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

EKSPRESIJA GENA *C-MYC* U PACIJENATA S KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

Karmela Mićan

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) zbog visoke incidencije i stope smrtnosti predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Ključni korak u borbi protiv ove maligne bolesti podrazumijeva rano postavljanje dijagnoze. Trenutno su mnoga istraživanja usmjerena na ispitivanje metode tekuće biopsije kao inovativnoga rješenja na području dijagnostike malignih bolesti. S ciljem uvođenja tekuće biopsije u kliničku praksu, javlja se potreba za određivanjem te validacijom potencijalnih biljega za rano dijagnozu, odabir terapije, praćenje uspješnosti terapije, prognozu bolesti te ranu detekciju recidiva. U ovom radu ispitivao se dijagnostički potencijal gena *c-MYC* usporedbom ekspresije gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva u bolesnika s adenomom (pre-CRC) te bolesnika s CRC-om. U istraživanju je sudjelovalo 46 ispitanika od kojih je 33 ispitanika s pre-CRC-om te 13 ispitanika s potvrđenim CRC-om. Rezultati analize nisu potvrdili potencijal gena *c-MYC* kao biljega za rano otkrivanje CRC-a budući da nije postojala statistički značajna razlika između ekspresije gena *c-MYC* kod pacijenata s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om ($p > 0,05$). Istovremeno, u istraživanju se ispitivao potencijal gena *c-MYC* kao biljega za rano otkrivanje CRC-a primjenom metode tekuće biopsije kod 18 pacijenata s potvrđenim CRC-om. U uzorcima RNA izoliranih iz egzosoma nije detektirana ekspresija ni ciljnoga (*c-MYC*) niti referentnog gena (*GAPDH*) te stoga nije bilo moguće provesti daljnju usporedbu s rezultatima ekspresije gena *c-MYC* iz RNA izolirane iz tkiva bolesnika s pre-CRC-om te potvrđenim CRC-om. Neuspješna detekcija *c-MYC* te *GAPDH* gena može biti posljedica niske koncentracije RNA izolirane iz egzosoma, degradiranosti RNA molekule ili visokog udjela miRNA molekula u ukupnoj izoliranoj RNA.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 7 grafičkih prikaza, 7 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kolorektalni karcinom, tekuća biopsija, egzosomi, RNA, *c-MYC*, qPCR

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

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

Dr. sc. Ivana Čelap, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

***C-MYC* EXPRESSION IN COLORECTAL CANCER PATIENTS**

Karmela Mićan

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is a significant public health problem due to its high incidence and mortality rate. A key step in the fight against this malignant disease involves early diagnosis. Currently, many studies are focused on testing the method of liquid biopsy as an innovative solution in the field of diagnosis of malignant diseases. With the aim of introducing liquid biopsy into clinical practice, there is a need to determine and validate potential markers for early diagnosis, therapy selection, therapy success monitoring, disease prognosis and early recurrence detection. In this work, the diagnostic potential of the *c-MYC* gene was examined by comparing the expression of the *c-MYC* gene in RNA isolated from a tissue of patients with adenoma (pre-CRC) and patients with confirmed CRC. 46 subjects participated in the study, of which 33 subjects had pre-CRC and 13 subjects had confirmed CRC. The results of the analysis did not confirm the potential of the *c-MYC* gene as a marker for the early detection of CRC, since there was no statistically significant difference between the expression of the *c-MYC* gene of subjects with pre-CRC and confirmed CRC ($p > 0.05$). At the same time, the research examined the potential of the *c-MYC* gene as a marker for early detection of CRC using the liquid biopsy method of 18 subjects with confirmed CRC. Neither the target (*c-MYC*) nor the reference gene (*GAPDH*) expression was detected in RNA samples isolated from exosomes, and therefore it was not possible to carry out a further comparison with the results of *c-MYC* gene expression out of RNA isolated from the tissue of patients with pre-CRC and confirmed CRC. Unsuccessful detection of *c-MYC* and *GAPDH* genes may be due to low concentration of RNA isolated from exosomes, degradation of RNA molecules or a high proportion of miRNA molecules out of total isolated RNA.

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

Thesis includes: 45 pages, 7 figures, 7 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Colorectal cancer, liquid biopsy, exosomes, RNA, *c-MYC*, qPCR

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
Ivana Čelap, Ph.D. Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2023.