

# Učinak mikrosatelitske nestabilnosti i somatskih mutacija gena KRAS i PIK3CA na progresiju raka želuca čovjeka

---

Crnjac, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:347944>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Iva Crnjac

**Učinak mikrosatelitske nestabilnosti i  
somatskih mutacija gena *KRAS* i *PIK3CA*  
na progresiju raka želuca čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za onkološku patologiju Klinike za tumore KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Snježane Ramić te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Snježani Ramić na svom znanju koje mi je prenijela, pomoći pruženoj tijekom pisanja ovog rada i uvijek prisutnoj pozitivnoj energiji. Hvala i mojoj obitelji i prijateljima koji su mi od početka do kraja bili čvrst oslonac, a posebno mome Branimiru na beskrajnoj podršci u svakom trenutku studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak mikrosatelitske nestabilnosti i somatskih mutacija gena *KRAS* i *PIK3CA* na progresiju raka želuca čovjeka

Iva Crnjac

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rak želuca je 2020. godine bio peti najčešći oblik raka te četvrti po smrtnosti na globalnoj razini, sve češće pogađajući osobe mlađe od 50 godina. Karakteriziraju ga mnoge promjene među kojima su i mikrosatelitska nestabilnost (MSI) te mutacije gena *KRAS* i *PIK3CA* koje su česte i u drugih tipova tumora. Cilj ovog rada bio je istražiti imaju li na navedene promjene učinak na progresiju raka želuca čovjeka. U 69 uzoraka raka želuca analizirana je prisutnost mutacija gena *KRAS* (11,6 %) i *PIK3CA* (7,3 %) lančanom reakcijom polimeraze, a imunohistokemijskim bojenjem mikrosatelitska nestabilnost uzoraka (MSI) (31,9 %). Provedenim istraživanjem utvrđena je statistički značajna korelacija veličine tumora sa statusom MSI ( $r_s = -0,283$ ,  $p = 0,020$ ) i prisutnim mutacijama gena *KRAS* ( $r_s = -0,311$ ,  $p = 0,010$ ). Ovo može upućivati na to da su te promjene rani događaj u karcinogenezi koje imaju pokretački karakter (engl. *driver*), zbog čega dolazi do razvoja drugačijeg molekularnog profila raka želuca. Nije utvrđen utjecaj statusa MSI ili mutacija u genima *KRAS* i *PIK3CA* na progresiju raka želuca. U tom smjeru potrebno je provesti dodatna istraživanja na većem broju uzoraka.

Ključne riječi: *KRAS*, *PIK3CA*, MSI, rak želuca  
(64 stranice, 13 slika, 9 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Snježana Ramić  
Komentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:  
Prof. dr. sc. Nada Oršolić  
Izv. prof. dr. sc. Romana Gračan  
Prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 5. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# The impact of microsatellite instability and somatic mutations of *KRAS* and *PIK3CA* genes on the progression of human gastric cancer

Iva Crnjac

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In 2020, gastric cancer was the fifth most common type of cancer and the fourth leading cause of cancer-related mortality globally, increasingly affecting individuals under the age of 50. This malignancy is characterized by various alterations, including microsatellite instability (MSI) and mutations in the *KRAS* and *PIK3CA* genes, which are also frequently observed in other tumor types. The aim of this study was to investigate whether these alterations have an impact on the progression of human gastric cancer. In 69 gastric cancer samples, the presence of *KRAS* (11.6 %) and *PIK3CA* (7.3 %) gene mutations was analyzed using polymerase chain reaction (PCR), while microsatellite instability (MSI) was assessed by immunohistochemical staining (31,9 %). The study identified a statistically significant correlation between tumor size and MSI status ( $r_s = -0.283$ ,  $p = 0.020$ ), as well as between tumor size and the presence of *KRAS* gene mutations ( $r_s = -0.311$ ,  $p = 0.010$ ). This may suggest that these alterations are early events in carcinogenesis with a driver nature, leading to the development of a distinct molecular profile in gastric cancer. No impact of MSI status or mutations in the *KRAS* and *PIK3CA* genes on the progression of gastric cancer was observed. Further research in this direction is required, involving a larger number of samples.

Keywords: *KRAS*, *PIK3CA*, MSI, stomach cancer  
(64 pages, 13 figures, 9 tables, 89 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Snježana Ramić, PhD  
Co-mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Reviewers:  
Prof. Nada Oršolić, PhD  
Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD  
Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: September 5<sup>th</sup>, 2024

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Anatomska i histološka građa želuca.....	2
1.2.	Patogeneza raka želuca .....	4
1.2.1.	Okolišni čimbenici.....	5
1.2.2.	Epigenetske promjene.....	7
1.2.3.	Promjene u genomu .....	9
1.3.	Signalni putevi.....	12
1.3.1.	Signalni put RAS/RAF/MEK/ERK.....	13
1.3.2.	Signalni put PI3K/Akt/mTOR.....	14
1.4.	Kromosomska i mikrosatelitska nestabilnost .....	15
1.5.	Podtipovi raka želuca.....	17
2.	CILJ.....	22
3.	MATERIJAL I METODE .....	23
3.1.	Uzorci tkiva .....	23
3.2.	Priprema tkiva i izolacija DNA .....	24
3.3.	Analiza mutacija u genima <i>KRAS</i> i <i>PIK3CA</i> .....	26
3.4.	Određivanje mikrosatelitske nestabilnosti .....	30
3.5.	Statistička obrada podataka .....	31
4.	REZULTATI.....	33
4.1.	Karakteristike raka želuca.....	33
4.2.	Mikrosatelitska nestabilnost .....	36
4.3.	Mutacije gena <i>KRAS</i> .....	41
4.4.	Mutacije gena <i>PIK3CA</i> .....	45
4.5.	Povezanost MSI i mutacija gena <i>KRAS</i> i <i>PIK3CA</i> s karakteristikama raka želuca .....	47
5.	RASPRAVA .....	50
6.	ZAKLJUČAK .....	54
7.	LITERATURA.....	55

# POPIS KRATICA

ARID1A – (engl. *AT-rich interactive domain-containing protein 1A*)

CDKN2A – (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CIN – kromosomska nestabilnost (engl. *chromosome instability*)

DAb – 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DNMT – DNA metil-transferaza (engl. *DNA methyl-transferase*)

EBV – Epstein Barr virus

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediamine tetra-acetic acid*)

EGFR – ljudski receptor 1 za epidermalne faktore rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

FGFR2 – (engl. *fibroblast growth factor receptor 2*)

GDP – gvanozin-difosfat (engl. *guanosine diphosphate*)

GTP – gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*)

HER2 – ljudski receptor 2 za epidermalne faktore rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HRAS – mali G protein, GTP-aza iz RAS obitelji (engl. *Harvey rat sarcoma virus*)

HRP – peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$ , citokin (engl. *interferon gamma*)

IgA, IgG, IgM – imunoglobulin A/G/M

IGF2 – (engl. *insulin-like growth factor 2*)

IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$

KRAS – GTP-aza iz RAS obitelji, dio RAS/RAF/MEP/ERK signalnog puta (engl. *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*)

MAPK – protein-kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*) znana i kao ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)



MEK – kinaza protein-kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*)

MLH1, MLH2 – homolog gena *MutL* 1 i 2, uključeni u popravak krivo sparenih baza (engl. *MutL homolog 1/2*)

MMR – popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*)

MSH2, MSH6 – homolog gena *MutS* 2 i 6, uključeni u popravak krivo sparenih baza (engl. *MutS homolog 2/3/6*)

MSI – mikrosatelitska nestabilnost (engl. *microsatellite instability*)

MSI-H – visoka mikrosatelitska nestabilnost (engl. *MSI-high*)

MSI-L – niska mikrosatelitska nestabilnost (engl. *MSI-low*)

MSS – mikrosatelitska stabilnost (engl. *microsatellite stability*)

mTOR – ciljna molekula rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)

mTORC1, mTORC2 – mTOR kompleks 1 i 2 (engl. *mTOR complex 1 and 2*)

NRAS – GTP-aza iz RAS obitelji, dio RAS/RAF/MEK/ERK signalnog puta (engl. *neuroblastoma RAS rat sarcoma viral oncogene homolog*)

p57KIP2 – inhibitor kompleksa ciklina i ciklin-ovisnih kinaza

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIK3CA – katalitička podjedinica  $\alpha$  PI3K (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*)

PMS2 – homolog gena *PMS1* 2, uključen u popravak krivo sparenih baza (engl. *PMS1 (postmeiotic segregation increased 1) homolog 2*)

PTEN – fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat 3-fosfataza, tumor supresor (engl. *phosphatase and tensin homolog*)

RAF – obitelj gena (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*)

RAS – obitelj gena (engl. *rat sarcoma virus*)

RTK – receptorska tirozin-kinaza (engl. *receptor tyrosine kinase*)

TNF- $\alpha$  – čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *tumour necrosis factor alpha*)

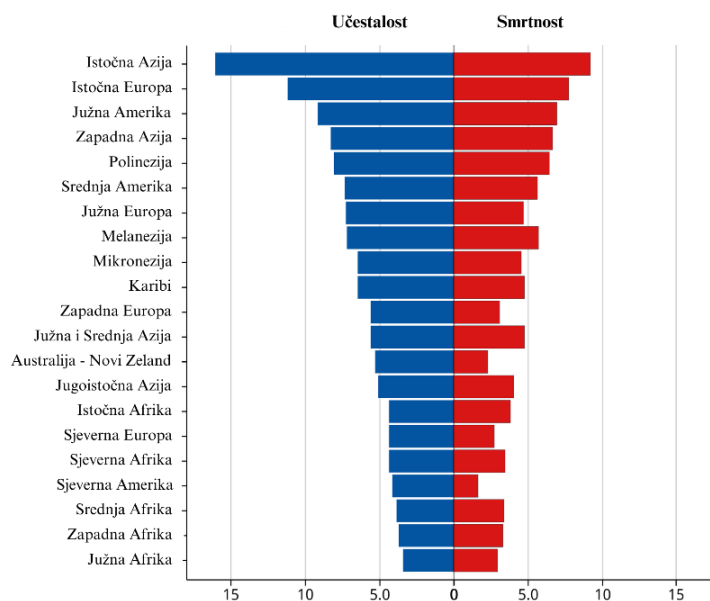
TP53 – tumor protein 53, tumor supresor

WT – uzorci bez detektirane mutacije u analiziranom genu (engl. *wild type*)

# 1. UVOD

Rak želuca je 2020. godine bio peti najčešći oblik raka te četvrti po smrtnosti u svijetu. Do 2040. godine broj oboljelih mogao bi porasti za 62 %, a broj smrtnih slučajeva za oko 65 % pod pretpostavkom da se trenutne stope ne promijene. (Morgan i sur. 2022).

U prosjeku rak želuca čak dvostruko češće pogađa muškarce nego žene, a najviša učestalost zabilježena je u državama istočne Azije i istočne Europe (Slika 1) (Morgan i sur. 2022).



**Slika 1.** Dobno standardizirane stope učestalosti i smrtnosti (svijet) na 100 000 ljudi, oba spola. Preuzeto i prilagođeno prema Ferlay i sur., 2024.

Prema podacima Registra za rak 2020. godine u Republici Hrvatskoj, učestalost raka želuca je 4 % svih novonastalih malignih bolesti u muškaraca i 3 % u žena. Bolest je većinom dijagnosticirana u starijoj životnoj dobi, dok je u 15,4 % slučajeva dijagnosticirana kod osoba mlađih od 60 godina. Stopa smrtnosti je vrlo visoka te iznosi 83,3 % (HZJZ 2022).

Visoka smrtnost česta je pojava i u razvijenijim zemljama s visokom učestalošću što potvrđuje uska povezanost između učestalosti i smrtnosti (Arnold i sur. 2022). S druge strane, u zemljama poput Južne Koreje i Japana, koje također imaju visoku učestalost, primijećena je

niža smrtnost. Razlog tomu mogao bi biti provođenje redovitog nacionalnog probira za rano otkrivanje raka želuca, odnosno ranije otkrivanje i postavljanje dijagnoze (Zhang i sur. 2018).

Unatoč napretku u dijagnostici, terapiji i većem preživljenju pacijenata, mnogi slučajevi raka želuca detektiraju se kasno, u uznapređovalom stadiju, zbog asimptomatskog početka bolesti stoga je i prognoza pacijenata općenito lošija (Lei i sur. 2022). Medijan preživljenja za uznapređovali stadij kraći je od dvanaest mjeseci (Machlowska i sur. 2020).

Iako se u većini dijelova svijeta zbog poboljšanih uvjeta skladištenja hrane učestalost raka želuca smanjuje, ona je ipak u porastu u osoba mlađih od 50 godina što može biti povezano s današnjim prehrambenim navikama i sve češćom pretilosti (Lei i sur. 2022).

## 1.1. Anatomska i histološka građa želuca

Želudac je prošireni dio probavne cijevi smješten u abdomenu, između jetre i slezene. Služi kao spremište hrane u kojemu se ona istodobno i probavlja. Glavne uloge želuca uključuju nastavak probave ugljikohidrata koja je započela u usnoj šupljini, probavu bjelančevina pomoću enzima pepsina, proizvodnju želučane lipaze koja probavlja trigliceride te dodavanje kiseline progutanoj hrani (Mescher 2016).

Započinje želučanim ulazom (lat. *cardia*), mjestom na kojem jednjak ulazi u želudac. Na njega se nastavlja tijelo (lat. *corpus*) i dno (lat. *fundus*) ispod ošita koji su međusobno jednake strukture pa kažemo da želudac ima tri histološki različita dijela. Na svome kraju, želudac zakreće udesno u vratarnik (lat. *pylorus*) te piloričkim sfinkterom prelazi u dvanaesnik (lat. *duodenum*) (Mescher 2016).

Vanjsku površinu želuca, kao i crijeva, jetre i slezene, obavlja visceralni list potrbušnice (lat. *peritoneum viscerale*). S druge strane, unutarnju stijenku čine četiri sloja: sluznica, podsluznica, mišićni sloj i seroza (Mescher 2016).

Seroza (lat. *tunica serosa*), sastavljena od jednoslojnog pločastog epitela i tankog sloja rahlog vezivnog tkiva, vanjska je membrana želuca na koju se naslanja deblji mišićni sloj. Mišićni sloj (lat. *tunica muscularis*) čine vanjski sloj uzdužno raspoređenih, srednji sloj kružno raspoređenih te unutarnji sloj koso raspoređenih glatkih mišića, no granice između ovih slojeva nisu posve oštro određene. Unutar mišićnog sloja također nalazimo i mienterički živčani splet (lat. *plexus myentericus Auerbachii*) koji regulira mišićne kontrakcije. Sljedeći sloj je podsluznica (lat. *tunica submucosa*), gusto vezivno tkivo prožeto krvnim i limfnim

žilama te podsluzničkim živčanim spletom (lat. *plexus submucosus Meissneri*) koji kontrolira mišićnu aktivnost. Unutarnji sloj stijenke želuca čini sluznica (lat. *tunica mucosa*). Sastavljena je od jednoslojnog cilindričnog epitela, lamine proprije te mišićnog sloja (Mescher 2016).

Epitel sluznice je selektivno propusna barijera koja sudjeluje u prijenosu i probavi hrane te apsorpciji hranjivih tvari, a uz to proizvodi razne hormone i sluz. Na epitelu se nalaze i brojne invaginacije, odnosno želučane jamice koje se otvaraju u želučanu šupljinu, a čine ih razgranate tubularne žlijezde karakteristične za određeno područje želuca: kardijalne, želučane i pilorične. One luče sloj sluzi koji je zaštita od hrane, ali i djelovanja snažne kiseline koju želudac izlučuje (Mescher 2016).

Lamina proprija građena je od rahlog vezivnog tkiva prožetog limfnim i krvnim žilama te glatkim mišićnim stanicama, a njezina je glavna zadaća obrana organizma jer sadrži IgA, IgM i IgG. Mišićni sloj sluznice zaslužan je za njezino gibanje neovisno o gibanju probavne cijevi što za posljedicu ima povećani dodir želučane stijenke s hranom, a također odvaja sluznicu od podsluznice. Sluznica i podsluznica su uzdužno nabrane, a ti se nabori ili ruge po punjenju želuca hranom rastežu i zaglađuju te povećavaju površinu za probavljanje hrane (Mescher 2016).

Četiri strukturna dijela želuca međusobno se razlikuju po građi sluznice. Sluznica želučanog ulaza sadržava žlijezde kardije od kojih većina proizvodi sluz i lizozim, enzim s antibakteričnim učinkom. Tu također postoje i obložne stanice koje proizvode klorovodičnu kiselinu, HCl (Mescher 2016).

Tijelo i dno želuca histološki su jednake građe te sadrže žlijezde čije sekretorne stanice prema svojoj funkciji pripadaju jednom od četiri tipa. One mogu biti mukozne, obložne, glavne i enteroendokrine. Mukozne stanice, kao što i sam naziv govori, luče sluz i to tako da one koje se nalaze bliže površini želučane jamice luče manje kiselu tekućinu od mukoznih stanica vrata žlijezde, no obje izlučevine sadrže glikoprotein mucin (Mescher 2016).

Obložne ili parijetalne stanice, koje pronalazimo u bazalnom dijelu želučanih žlijezda umetnute među mukozne stanice vrata, nešto su veće stanice. Kada su aktivne, odnosno kada su potaknute na sintezu HCl, formiraju udubinu stanične membrane koju nazivamo intracelularnim kanalićem. Na njemu se nalaze mnogobrojni mikrovili čime se značajno povećava površina membrane obložne stanice (Mescher 2016).

U stvaranju HCl važna je karboanhidraza. Ovaj enzim posreduje u pretvorbi vode i ugljikovog dioksida u bikarbonatni ion ( $\text{HCO}_3^-$ ) i proton ( $\text{H}^+$ ).  $\text{HCO}_3^-$  izlazi iz obložne stanice i ulazi u krv, a antiportom iz krvi izlazi kloridni ion ( $\text{Cl}^-$ ) i ulazi u stanicu.  $\text{Cl}^-$  se izbacuje u lumen želuca, a djelovanjem ionske pumpe  $\text{H}^+/\text{K}^+$  se u lumen također izlučuje i  $\text{H}^+$ . Međusobnom reakcijom ovih iona u lumenu želuca nastaje klorovodična kiselina (HCl). Unatoč kiselom sadržaju lumena,  $\text{HCO}_3^-$  koji je ušao u krvnu žilu u lamini propriji pomaže održati neutralan pH sluznice. Osim HCl, obložne stanice luče i unutrašnji čimbenik ili intrinzični faktor velikog afiniteta za vitamin  $\text{B}_{12}$  pa tako i vrlo važnog za njegov unos u organizam (Mescher 2016).

Glavne ili zimogene stanice smještene dublje unutar želučanih žlijezda proizvode bjelančevine. Točnije, one proizvode pepsinogen, prekursor pepsina koji se aktivira u kiselom mediju želuca, te želučanu lipazu. Ovi enzimi odgovorni su za probavljanje proteina i mnogih lipida koji se unesu hranom (Mescher 2016).

Posljednji tip sekretornih stanica sluznice želuca su enteroendokrine ili D-stanice, epitelne stanice s endokrinim ili parakrinim djelovanjem. Enteroendokrine stanice u dnu želuca luče serotonin, dok one u pilorusu luče somatostatin, inhibitor gastrina (Mescher 2016).

U duboke želučane jamice pilorusa otvaraju se i piloričke žlijezde koje luče veliku količinu sluzi i lizozima. Ovdje se među mukoznim i enteroendokrinim nalaze još i gastrinske (G) stanice koje proizvode gastrin, enzim odgovoran za poticanje obložnih stanica žlijezda na lučenje kiseline (Mescher 2016).

Budući da su različiti anatomske dijelovi želuca i različito histološki građeni, s navedenom iznimkom tijela i dna, u ovim dijelovima nastaju i razvijaju se i različiti podtipovi raka želuca.

## 1.2. Patogeneza raka želuca

Rak želuca se najčešće odnosi na adenokarcinome, koji predstavljaju oko 95 % svih malignih tumora ovog organa (Ajani i sur. 2017). Rak želuca je heterogena i multifaktorska bolest na čiji razvoj djeluju i genetički i okolišni čimbenici, a većinom se javlja nakon dugotrajne izloženosti karcinogenim tvarima, uglavnom u trajanju od oko dvadeset do trideset godina (Ajani i sur. 2017, Machlowska i sur. 2020).

Budući da prehrana, alkohol i pušenje te zaraza bakterijom *Helicobacter pylori* ili Epstein-Barrovim virusom mogu povećati rizik od razvoja raka želuca, u smanjenju incidencije vrlo je važna prevencija promjenom načina života i preventivnim pregledima, odnosno ranijim dijagnosticiranjem bolesti (Machlowska i sur. 2020).

### 1.2.1. Okolišni čimbenici

Poznato je da infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* može povećati rizik od nastanka raka želuca. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka, IARC-u (engl. *International Agency for Research on Cancer*), infekcija *H. pylori* svrstana je u grupu 1 i klasificirana kao karcinogena za ljude (IARC 2024).

Iako mehanizam još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da je ključna dugotrajna upala, odnosno da važnu ulogu igraju čimbenici upalnog odgovora (Lei i sur. 2022). Kronična upala može uzrokovati oštećenje DNA na epitelu želuca i tako pogodovati nastanku ranih kancerogenih promjena (Reyes 2023).

Histološke promjene započinju kroničnim gastritisom koji, ako se ne liječi, prelazi u atrofični gastritis, a zatim napreduje prema intestinalnoj metaplaziji i displaziji, odnosno transformaciji stanica želučane sluznice u stanice karakteristične za tanko crijevo. U konačnici može doći do razvoja raka želuca (Reyes 2023).

Unatoč tomu što je infekcija bakterijom *H. pylori* usko povezana s razvojem raka želuca, većina osoba nema nikakvih simptoma. Svega 1 – 3 % osoba zaraženih *H. pylori* i oboli od raka stoga je važno razlučiti zašto su pojedinci podložniji obolijevanju kako bi se razvoj ove bolesti u njih mogao spriječiti (Reyes 2023).

Uz *H. pylori*, rizik od nastanka raka želuca povećava i zaraza Epstein Barr virusom (EBV) i to za više od osamnaest puta. Unatoč tomu što je prisutnost EBV-a veća u muškaraca nego žena s rakom želuca, žene koje se zaraze ovim virusom imaju veću vjerojatnost da i razviju rak želuca (Tavakoli i sur. 2020). EBV kodira onkoproteine koji djeluju na stanične signalne puteve, a u karcinogenezi mu pomažu i nepravilnosti u genomu domaćina poput nenormalne metilacije DNA uzrokovane latentnom infekcijom (Iizasa i sur. 2012; Kang i sur. 2015).

Osim hipermetilacije tumor supresorskih gena, EBV infekcija promiče i kroničnu upalu želučane sluznice, a virus i izbjegava imunološki odgovor domaćina, što pogoduje procesu karcinogeneze (Lei i sur. 2022).

Budući da je većina odraslih osoba tijekom svoga života bila izložena EBV-u, prevencija zaraze je vrlo važna stavka u prevenciji razvoja raka želuca. Iz tog razloga je i više od 90 % odrasle svjetske populacije nositelj protutijela na ovaj virus što neke serološke testove detekcije poput PCR-a čini manje pouzdanima (Chen i sur. 2015).

Osim spomenutih infekata, veliku ulogu u nastanku i razvoju raka želuca imaju navike i način života, posebice pušenje i konzumacija alkohola.

Od preko pet tisuća molekula koje nalazimo u duhanskom dimu, za njih 98 pouzdano znamo da su karcinogene, poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, nitrozamina, acetaldehida i aromatskih amina. Ove molekule stvaraju adukte na DNA i uzrokuju mutacije u genima *KRAS* i *TP53* (Hatta i sur. 2024).

Jedan od najaktivnijih sastojaka duhanskog dima je nikotin. Nikotin i njegovi metaboliti vežu se na nikotinske acetilkolinske te nešto manje na  $\beta$ -adrenergičke receptore što potiče proliferaciju stanica, angiogenezu, migraciju stanica i metastaziranje. Posljedično dolazi i do aktivacije signalnih puteva MAPK/ERK i PI3K/AKT (Schaal i Chellappan, 2014; Jia i sur. 2016).

Rota i sur. (2024) su meta analizom 205 studija utvrdili da je relativan rizik pušača za razvoj raka želuca za 53 %, a bivših pušača za 30 % veći u usporedbi s osobama koje nikada nisu pušile. Također, rizik se linearno smanjivao s trajanjem prestanka pušenja te je tek nakon trideset godina došao do razine rizika nepušača.

Kada govorimo o konzumaciji alkohola, etanol sam po sebi nije mutagen niti karcinogen, no njegov metabolit acetaldehid svrstan je u grupu 1 prema IARC-u (2024) kao karcinogen za ljude. Mehanizam karcinogenosti acetaldehida zasniva se na narušavanju procesa metilacije i popravka DNA, induciranju oksidativnog stresa te uplitanja u metabolizam retinoida, što dovodi do oštećenja i stvaranja mutacija u DNA (Hatta i sur. 2024; Ko 2024).

Ipak, iako nije karcinogen, etanol uzrokuje upalu želučane sluznice. Stoga je u osoba koje unose velike količine alkohola prisutna kronična upala, a ona je vrlo povoljna za proces karcinogeneze. Na rizik od nastanka raka želuca u nekih ljudi mogu utjecati i funkcionalni polimorfizmi enzima koji metaboliziraju alkohol poput citokroma P450 2E1, alkohol dehidrogenaze i aldehid dehidrogenaze (Hatta i sur. 2024).

Meta analiza 81 studije pokazala je da je konzumacija alkohola povezana s 20 % većim rizikom za razvoj raka želuca, a kada govorimo o osobama koje konzumiraju tri ili više



alkoholnih pića dnevno, odnosno barem 42 g alkohola na dan taj postotak raste i na 30 % (Deng i sur. 2021).

S većim rizikom od nastanka raka želuca povezuje se i visok unos soli te hrane bogate solju. Sol potiče proliferaciju stanica te kao kokarcinogen sinergistično djeluje s bakterijom *H. pylori* što može pogodovati karcinogenezi. Mnoge studije pokazale su povezanost visokog unosa soli s rizikom od razvoja raka želuca u zemljama Azije, Amerike i Europe (D'Elia i sur. 2014).

Visok unos procesiranog mesa, pretilost, dob, spol i obiteljska anamneza također mogu utjecati na rizik nastanka raka želuca (Ko 2023).

### 1.2.2. Epigenetske promjene

Osim navedenih genetskih i okolišnih čimbenika, na rak želuca učinak imaju i epigenetske promjene. One su nasljedne, a budući da ne uključuju promjene u samom slijedu DNA, i reverzibilne. Najvažnija takva promjena je metilacija CpG otočića u promotorskoj regiji određenih gena. Ova kemijska modifikacija podrazumijeva metilaciju citozina na CpG dinukleotidima pomoću tri tipa enzima DNA-metiltransferaza: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B (Ebrahimi i sur. 2020).

U normalnim stanicama gotovo svi CpG otočići, njih 94 %, ostaju nemetilirani. Pretjerana metilacija, odnosno hipermetilacija tumor supresorskih gena dovest će do njihovog utišavanja i gubitka funkcije. S druge strane, hipometilacija protoonkogeni uzrokovat će njihovu aktivaciju i pretvorbu u stanične onkogene (Puneet i sur. 2018).

Ove promjene zbog svog su utjecaja na ekspresiju gena uključenih u karcinogenezu od velike važnosti u procesu nastanka i progresije raka želuca.

Manjak metilacije, to jest globalna hipometilacija ponavljajućih sljedova DNA povezana je s napretkom iz benignih u maligne tumore. Ova se pojava objašnjava povećanjem genomske nestabilnosti, gubitkom genskog utiska (engl. *imprinting*) te reaktivacijom transpozona, pokretnih genetičkih elemenata koji mogu mijenjati svoj položaj u genomu (Puneet i sur. 2018).

Osim metilacije DNA, u epigenetske promjene stanica raka želuca ubrajamo i modifikacije histona te remodeliranje kromatina (Yang i sur. 2022).

Kromatin je sastavljen od milijuna nukleosoma, pri čemu svaki nukleosom čini dvolančana DNA omotana oko histonskog oktamera, a svaki oktamer sadrži po dvije kopije histona H2A, H2B, H3 i H4. Kromatin je strukturiran u kromosome, a o njegovoj kondenziranosti ovisi transkripcija gena (Song i sur. 2016).

Histoni se kovalentnim promjenama poput metilacije, acetilacije, fosforilacije i ubikvitinacije posttranslacijski modificiraju što utječe na njihovu strukturu te tako i na ekspresiju gena (Yang i sur. 2022).

Kada je kromatin kondenziran nazivamo ga heterokromatinom i tada je njegova transkripcija inaktivirana, a gen utišan. Suprotno, eukromatin je transkripcijski aktivan jer je zbog manje kondenziranosti dostupan za vezanje transkripcijskim čimbenicima (Song i sur. 2016).

Modifikacije histona se većinom očituju u aminokiselinama i ugljikohidratima, no novija istraživanja pokazuju da bi veliku ulogu u ovom procesu mogle imati i nekodirajuće RNA (ncRNA, engl. *noncoding RNA*). Neke od njih kodiraju peptide ili bjelančevine koje reguliraju metabolizam tumora ili inhibiraju njegov stanični ciklus, suprimiraju širenje tumorskih stanica te djeluju na epitelno-mezenhimalnu tranziciju što sve izravno utječe na karcinogenezu i napredovanje raka (Yang i sur. 2022).

Također, nenormalna ekspresija miRNA (engl. *microRNA*) može dovesti do njihovog djelovanja kao onkogeni ili tumor supresori tako što će utjecati na proliferaciju i pokretljivost stanica, angiogenezu i apoptozu (Yang i sur. 2022).

Sve ove promjene mogu dovesti i do neadekvatnog genskog utiska. Ova epigenetska modifikacija gena inače određuje ispoljavanje samo jednog alela, dok se drugi alel utišava. Može dovesti do aktivacije uobičajeno utišanog alela što će monoalelnu ekspresiju zamijeniti bialelnom. Ovakva pretjerana aktivacija gena poput *IGF2* koji potiče rast, uzrokovana hipermetilacijom njegova promotora, može potaknuti proliferaciju, angiogenezu i migraciju tumorskih stanica te izbjegavanje apoptoze (Xie i sur. 2024). Suprotno tomu, gubitak genskog utiska može i suprimirati inače aktivne gene koji inhibiraju rast poput *p57KIP2* što će također dovesti do nekontroliranog nagomilavanja tumorskih stanica (Zuo i sur. 2011).

### 1.2.3. Promjene u genomu

Mutacije u tumorima zahvaćaju gene koji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa, mehanizmima popravka DNA, regulaciji transkripcije, remodeliranje kromatina i apoptozi.

Najčešće mutiran gen u zloćudnim tumorima općenito, pa i u raku želuca, jest *TP53* koji time gubi svoju tumor supresorsku aktivnost (Ajani i sur. 2017; Busuttill i sur. 2014). Produkt ovoga gena, protein p53 vrlo je važan za procese staničnog rasta i diobe te poremećaj u njegovoj ekspresiji može pogodovati nastanku i razvoju tumora. Iako može biti utišan zbog hipermetilacije DNA, češći je razlog gubitak heterogenosti i izravna mutacija gena (Nobili i sur. 2011). Gen *TP53* izmijenjen je u 40 % (Nobili i sur. 2011) do 50 % (Ajani i sur. 2017). slučajeva raka želuca. Osim toga, njegovu funkcionalnost mogu poremetiti i promjene u aktivnosti negativnih regulatora poput proteina Mdm2 i Mdmx koji su u tumora često modificirani (Busuttill i sur. 2014). Pojava mutacija gena *TP53* česta je u ranim stadijima raka želuca, odnosno na samom prijelazu u karcinom, a te mutacije postaju sve učestalije u uznapredovalim stadijima (Busuttill i sur. 2014; Machlowska i sur. 2020).

Osim *TP53*, u raku želuca česta je mutacija i gena *ARID1A*, također tumor supresora. Prisutna je u oko četvrtine slučajeva raka želuca (Pužar Dominkuš i Hudler 2023). Proteinski produkt ovoga gena uključen je u remodeliranje kromatina te sudjeluje u mnogim staničnim procesima poput diferencijacije i popravka DNA utječući na ekspresiju gena (Ajani i sur. 2017; Garattini i sur. 2017). Stoga inaktivacijske mutacije gena *ARID1A* induciraju povećanu proliferaciju i remete odgovor na oštećenje DNA utječući na popravak izrezivanjem baza i nukleotida te popravak krivo sparenih baza, MMR (engl. *mismatch repair*) (Garattini i sur. 2017; Pužar Dominkuš i Hudler 2023).

HER2 je transmembranski protein kodiran genom *ERBB2*. Djeluje kao tirozin kinazni receptor (RTK) za čimbenik rasta, a prekomjerno je eksprimiran u otprilike 15 do 20 % svih slučajeva raka želuca (Pužar Dominkuš i Hudler 2023; Xu i sur. 2023). Budući da posreduje u rastu i diferencijaciji stanica, HER2 je ključan u procesima proliferacije, angiogeneze i apoptoze i u mnogih drugih vrsta tumora. Sukladno tomu, tumori s povećanom aktivnosti HER2 češće su povezani s lošijom prognozom u usporedbi s tumorima bez ekspresije HER2 (Wang i sur. 2017).

Još jedna receptorska tirozin kinaza koja je često amplificirana u stanicama raka želuca jest FGFR2, a njegova pojavnost u oboljelih iznosi oko 4 %. Ovaj receptor za fibroblastni čimbenik rasta dio je mnogih staničnih procesa poput proliferacije, diferencijacije,

pokretljivosti, ali i angiogeneze što također znači da ima ulogu u nastanku i napredovanju tumora. Zbog sličnog učinka kao i HER2, terapije inhibitorima FGFR2, odnosno HER2 mogle bi biti pogodne za osobe s amplifikacijom jednog od ovih receptora (Matsumoto i sur. 2012).

U raku želuca česte su i promjene u genima koji igraju ulogu u adheziji stanica, a jedan od najčešćih takvih gena je *CDH1* koji kodira protein E-kadherin (Ajani i sur. 2017). E-kadherin je tumor supresor, protein s ključnom ulogom u adheziji stanica, a njegov nedostatak pogoduje odvajanju stanica i metastatskom potencijalu tumora (Nobili i sur. 2011). Mutacija gena *CDH1* u reproduktivnim stanicama glavni je uzrok nasljednog difuznog raka želuca, a nasljeđuje se autosomalno dominantno (Ajani i sur. 2017). Ovu mutaciju često prati i hipermetilacija promotorske regije gena *CDH1*, a koja je vrlo česta i u sporadičnih slučajeva raka želuca uz somatske mutacije ovoga gena (Garattini i sur. 2017; Lei i sur. 2022).

Najčešća onkogeno mutacija u svih tumora čovjeka je mutacija *RAS*, a javlja se u oko 20 % tumora (Timar i Kashofer 2020; Sheffels i Kortum 2021). Proteini Ras su male GTP-aze koje sudjeluju u prijenosu signala mnogih receptora čimbenika rasta (Timar i Kashofer 2020). U superporodicu RAS, među ostalima, ubrajamo i onkogene *KRAS*, *NRAS* i *HRAS* koji kodiraju četiri homologne izoforme proteina: *KRAS4A*, *KRAS4B*, *NRAS* i *HRAS* (Sheffels i Kortum 2021). Među njima, najčešća je mutacija gena *KRAS* koja čini 75 % svih mutacija *RAS*, a upravo je ona odgovorna za zloćudnu transformaciju stanica (Sheffels i Kortum 2021; Kim i sur. 2021).

Gen *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue*) najčešće je mutiran onkogen u svih tumora čovjeka. Nalazi se na kraćem kraku 12. kromosoma, a čini ga šest egzona (Timar i Kashofer 2020). Molekulske je mase 23,2 kDa i sadrži 188 aminokiselina (Kim i sur. 2021). Kodira za dva srodna proteina, *KRAS-4A* i *KRAS-4B*, pri čemu se naziv *KRAS* uglavnom odnosi na izoformu *KRAS-4B* (Huang i sur. 2021) koja je znatno više prisutna u stanici (Kim i sur. 2021). Mutacije gena *KRAS* mogu biti homozigotne i heterozigotne, a dovode do promjene ekspresije proteina (Timar i Kashofer 2020).

Proteini Ras sudjeluju u mnogim signalnim putevima, poput onih uključenih u stanični rast i proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje pa mutirani imaju značajan utjecaj na karcinogenezu (Kim i sur. 2021). Vezani na GDP (gvanozin-difosfat, engl. *guanosine diphosphate*), Ras proteini nalaze se u inaktivnom stanju, a aktiviraju se vezanjem za GTP (gvanozin-trifosfat, engl. *guanosine triphosphate*) što dovodi do promjene konformacije i

omogućavanja vezanja različitih proteina poput onih iz obitelji RAF i PI3K (Prior i sur. 2020). Stoga se često kao važni onkogeni u karcinogenezi želuca navode upravo *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* i *NRAS*, a koriste se i kao prognostički alati (Danishevich i sur. 2023).

Dio superporodice RAS je i RhoA, GTP-aza koja sudjeluje u organizaciji citoskeleta, staničnoj adheziji i pokretljivosti te apoptozi (Garattini i sur. 2017, Lei i sur. 2022). Lošija prognoza i smanjena uspješnost terapije često su povezani s mutacijama u genu *RHOA* (Ajani i sur. 2017).

Mutacije gena *PIK3CA* treće su najčešće mutacije u raka želuca (Kim i sur. 2017). Ovaj gen nalazi se na duljem kraku trećeg kromosoma, a njegov produkt je podjedinica p110 $\alpha$  enzima PI3K s katalitičkom aktivnošću. Osim nje, enzym čini i regulatorna p85 podjedinica (Baghery Saghchy Khorasani i sur. 2021; Kim i sur. 2017).

PI3K (engl. *phosphatidyl-inositol-3-kinase*) je obitelj lipidnih kinaza koji mogu aktivirati RTK ili receptori povezani s G proteinima (Porta i sur. 2014). Ove unutarstanične kinaze sudjeluju u kontroli mnogih staničnih procesa poput preživljenja, proliferacije i diferencijacije stanica, njihove migracije te metabolizma (Riquelme i sur. 2015).

Promjene u genu *PIK3CA* su uglavnom delecije te amplifikacije, ali i somatske točkaste mutacije (Takahashi i sur. 2014). 80 % točkastih mutacija grupirano je u tri žarišne točke, dva (E542K i E545K) u helikalnoj domeni egzona 9 te jedan (H1047R) u kinaznoj domeni egzona 20 (Baghery Saghchy Khorasani i sur. 2021).

Remećenjem njihove funkcije dolazi do pojačane proliferacije stanica i invazije tumora pa ove promjene često susrećemo i u drugih tumora, primjerice tumora dojke, jetre, debelog crijeva i jajnika (Kim i sur. 2017). Smatra se da se mutacije gena *PIK3CA*, za razliku od gena *KRAS*, javljaju u kasnoj karcinogenezi.

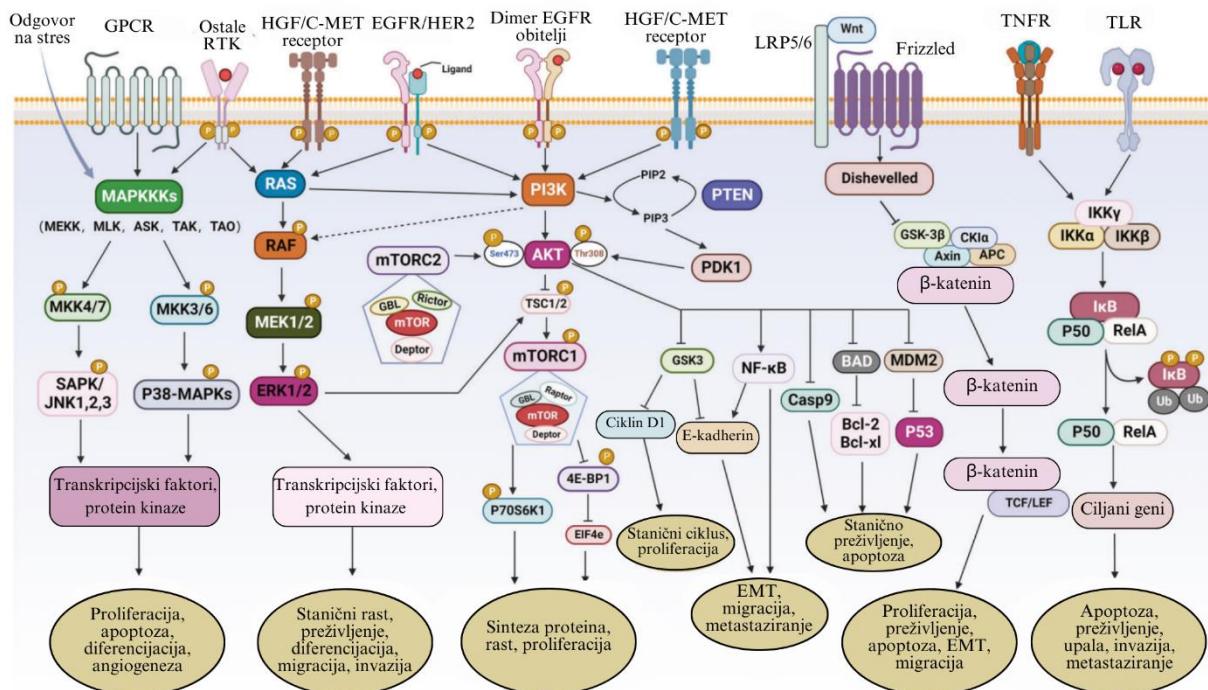
Osim mutacija u samome genu, funkciju *PIK3CA* mogu narušiti i gubitak heterozigotnosti tumor supresorskog gena *PTEN* (engl. *phosphatase and tensin homolog*), hipermetilacija njegove promotorske regije, posttranskripcijsko utišavanje ili mutacija ovoga gena koji djeluje kao glavni negativni regulator *PIK3CA* (Baghery Saghchy Khorasani i sur. 2021).

### 1.3. Signalni putevi

Geni *RAS* i *PIK3CA* ključni su u nekoliko signalnih puteva uključenih u stanični rast, preživljenje i proliferaciju. Dva glavna među njima su signalni putevi RAS/RAF/MEK/ERK te PI3K/Akt/mTOR. Promjene u njima nisu samo često obilježje raka želuca, već se javljaju i kod mnogih drugih tipova tumora, što ih čini značajnima u razvoju i progresiji različitih zloćudnih bolesti (Lei i sur. 2022).

RAS/RAF/MEK/ERK te PI3K/Akt/mTOR uz ostale su signalne puteve i čimbenike uključeni u razvoj raka želuca prikazani na Slici 2 (Lei i sur. 2022).

Oba signalna puta potencijalne su mete ciljane molekularne terapije za uznapredovali rak želuca (Takahashi i sur. 2014). No budući da se ovi signalni putevi često i isprepleću, inhibicija jedne molekule ne uspijeva inhibirati cijeli signalni put. Stoga je neophodna potraga za terapijom koja će inhibirati više ključnih molekula istovremeno (Huang i sur. 2021).



**Slika 2.** Glavni signalni putevi i čimbenici u raku želuca. Preuzeto i prilagođeno prema Lei i sur. (2022)

### 1.3.1. Signalni put RAS/RAF/MEK/ERK

Signalni put RAS/RAF/MEK/ERK, ili kraće MAPK, regulira osnovne stanične funkcije poput rasta, diferencijacije i preživljenja (Degirmenci i sur. 2020). Igra ulogu u kontroli adhezije i pokretljivosti stanica što pogoduje metastaziranju stanica, a smatra se glavnim karcinogenim signalnim putem u oko 40 % slučajeva raka želuca (Riquelme i sur. 2015; Lei i sur. 2022). Signalni put MAPK pokreće aktivacija RAS proteina što uzrokuje kaskadu prenošenja mitogenih signala (Kim i sur. 2021).

MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) je obitelj tirozin kinaza koje na izvanstanični podražaj odgovaraju staničnom reakcijom (Lei i sur. 2022). Vezanjem čimbenika rasta poput EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) na RTK potiče se dimerizacija RTK i autofosforilacija tirozinskih ostataka unutar stanice (Ullah i sur. 2022). Njih prepoznaju proteini sa SH2 ili domenom koja veže fosfotirozin (PTB, engl. *phosphotyrosine-binding domain*) poput Grb2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*) koji zatim privlače proteine SOS (engl. *Son of Sevenless*). Mijenjajući GDP za GTP, SOS proteini aktiviraju RAS (Ullah i sur. 2022).

Vezanjem GTP-a, mijenja se konformacija RAS proteina koja pogoduje reakcijama s nizvodnim faktorima poput kinaza RAF, njihovog vezanja i aktivacije (Lei i sur. 2022). Kinaze RAF aktiviraju se heterolognom ili homolognom dimerizacijom, a njihova se katalitička C-terminalna domena veže za kinaze MEK1/2, fosforilira ih i tako i aktivira (Huang i sur. 2021). One dalje fosforiliraju treoninske i tirozinske ostatke te aktiviraju kinaze ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*) (Ullah i sur. 2022). Nakon aktivacije, ERK1/2 migriraju u jezgru i fosforiliraju različite transkripcijske faktore čime kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje (Kim i sur. 2021).

Povišena aktivacija ERK1/2 može ukazivati na lošiju prognozu po pacijenta jer ove kinaze posreduju u migraciji tumorskih stanica i invaziji zbog svog utjecaja na matriks metaloproteinaze (Lei i sur. 2022).

Točkaste mutacije u genima *RAS* i *RAF* mogu biti one mutacije koje će potaknuti zloćudnu transformaciju, dok točkaste mutacije MEK i ERK, iako vrlo rijetke, mogu biti pokazatelji loše prognoze zbog moguće veće otpornosti mutacija MEK na inhibitore, odnosno produljenja aktivnosti proteina ERK (Degirmenci i sur. 2020).

### 1.3.2. Signalni put PI3K/Akt/mTOR

Tumor podržava stvaranje okoliša stresnog za normalne stanice, stoga je u njegovom razvoju ključan signalni put PI3K/Akt koji regulira preživljenje stanica tijekom izloženosti stresu. Ciljna molekula rapamicina u sisavaca, mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) prenosi različite signale i regulira sintezu proteina uključenih u stanični ciklus, rast i metabolizam stanica (Porta i sur. 2014).

Iako su PI3K/Akt i mTOR dva odvojena signalna puta, toliko su isprepleteni, a njihove uloge u ključnim staničnim procesima slične, da najčešće govorimo o jednom signalnom putu PI3K/Akt/mTOR (Porta i sur. 2014). Važan je u regulaciji staničnih procesa poput preživljenja, proliferacije, diferencijacije te migracije stanica (Riquelme i sur. 2015). Njegovo karcinogeno djelovanje očituje se u inhibiciji apoptoze te poticanju angiogeneze, metastaziranja, epitelno-mezenhimalne tranzicije i otpornosti stanica na kemoterapiju (Matsuoka i Yashiro 2014).

Kaskada započinje aktivacijom RTK vezanjem čimbenika rasta što uzrokuje autofosforilaciju tirozinskih ostataka unutar samog receptora i stvaranje mjesta za vezanje signalnih proteina. Jedan od takvih proteina je PI3K koji se preko domene SH2 svoje regulatorne podjedinice veže za fosforilirane tirozine te dolazi do aktivacije katalitičke podjedinice PI3K (Porta i sur. 2014).

Aktivirani PI3K mijenja molekulu PIP2 u PIP3, sekundarnog glasnika koji privlači određene proteine poput PDK1 i Akt/PKB (engl. *protein kinase B*). Ovi proteini fosforiliraju nizvodne faktore i mogu inaktivirati proapoptotičke čimbenike. Imaju značajnu ulogu u upravljanju rastom i preživljavanjem stanica, a Akt/PKB se smatra i ključnom kinazom ovog signalnog puta (Porta i sur. 2014; Lei i sur. 2021).

Nizvodno se nalazi i mTOR, konzervirana protein kinaza koju čine dva kompleksa, mTORC1 i mTORC2. mTORC1 potiče sintezu proteina i rast stanica, a mTORC2 fosforilira Akt/PKB i kontrolira remodeliranje aktinskog citoskeleta (Matsuoka i Yashiro 2014). mTOR sudjeluje u regulaciji pokretljivosti tumorskih stanica i metastaziranju, a pokazao se pretjerano aktivnim u više od 60 % slučajeva raka želuca (Matsuoka i Yashiro 2014; Lei i sur. 2021).

Amplifikacija *PIK3CA*, aktivacija PI3K, gubitak funkcije *PTEN* gena, aktivacija RTK i pretjerana ekspresija ili mutacije Akt mogu rezultirati aktivacijom signalnog puta



PI3K/Akt/mTOR i potpomoći nastanku i razvoju tumora te otpornosti na lijekove (Riquelme i sur. 2015; Lei i sur. 2021).

#### 1.4. Kromosomska i mikrosatelitska nestabilnost

Česta pojava u mnogim tumorima, a tako i u raku želuca, jest genomska nestabilnost koja se definira velikim brojem nastalih mutacija u genomu tijekom kratkog vremenskog razdoblja. Pripadaju joj dva tipa: kromosomska i mikrosatelitska nestabilnost (Maleki i Röcken 2017).

Kromosomska nestabilnost (CIN, engl. *chromosomal instability*) podrazumijeva promjenu strukture ili broja kromosoma. Njen su uzrok vrlo složeni procesi poput oštećenja telomera, poremećaja u radu diobenog vretena što dovodi do pogrešnog odvajanja kromosoma tijekom mitoze (Vargas-Rondón i sur. 2018) te pogrešaka u kontrolnim točkama staničnog ciklusa (Maleki i Röcken 2017).

Ovi događaji povećavaju učestalost kromosomskih promjena poput fuzije i translokacije kromosoma, duplikacije, insercije i delecije kromosomskih segmenata te aneuploidije (Maleki i Röcken 2017). Navedeni rearanžmani mogu aktivirati protoonkogene i inaktivirati tumor supresor gene te tako pogodovati napredovanju tumora (Nemtsova i sur. 2023).

Nastanak vrlo heterogenog tumora može direktno utjecati na otpornost tumora na terapiju i biti uzrok lošijoj prognozi (Nemtsova i sur. 2023). Uz to, heterogenost otežava i pronalaženje pouzdanih dijagnostičkih metoda za ovaj tip tumora (Maleki i Röcken 2017). Nadalje, CIN tumori slabo su infiltrirani imunološkim stanicama te je prisutna i imunosupresija što također može biti uzrok lošijoj prognozi (Nemtsova i sur. 2023).

Ipak, iako se tumori CIN povezuju s lošom prognozom, postoje istraživanja na životinjskim modelima koja podupiru teoriju da velika količina kromosomskih alteracija može imati suprotan učinak i dovesti do smrti tumorskih stanica i supresije tumora (Silk i sur. 2013).

Druga vrsta genomske nestabilnosti u tumora je mikrosatelitska nestabilnost.

Mikrosateliti, kratki ponavljajući sljedovi DNA koje čini do šest nukleotida, u genomu čovjeka javljaju se u kodirajućim i nekodirajućim regijama, najčešće na krajevima kromosoma, ponavljajući se otprilike između 10 i 60 puta u nizu. Iako izrazito polimorfni u populaciji, mikrosateliti su u svakoga pojedinca stabilni (Ratti i sur. 2018; Li i sur. 2020).

Stabilnost mikrosatelita uvelike ovisi o učinkovitosti mehanizma za popravak pogrešno sparenih baza (MMR), staničnog procesa koji prepoznaje i ispravlja pogreške koje se događaju tijekom DNA replikacije (Ratti i sur. 2018).

Najčešći uzrok nefunkcionalnog MMR-a je hipermetilacija promotorske regije MLH1, jednog od proteina koji sudjeluje u MMR-u. Uz MLH1 (engl. *MutL homolog 1*), najvažniji među njima su i MLH3 (engl. *MutL homolog 3*), MSH2 (engl. *MutS homolog 2*), MSH6 (engl. *MutS homolog 6*) te PMS1 i PMS2 (engl. *post meiotic segregation increased 1 and 2*) (Ratti i sur. 2018). Za samu kontrolu replikacije DNA zaduženi su heterodimeri ovih enzima, MSH2/MSH6 i MSH2/MSH3, koji uočavaju i vežu pogreške, a zatim kompleks MLH1/PMS2 izrezuje pogrešno ugrađen nukleotid i na njegovo mjesto stavlja ispravan (Puliga i sur. 2021).

Promjene u jednom ili više dijelova ovog mehanizma popravka odredit će nedostatak određenih kompleksa i učinkovitost ispravljanja pogrešaka (Puliga i sur. 2021). Tumor je mikrosatelitski stabilan (MSS, engl. *microsatellite stable*) ako su svi proteini eksprimirani. U slučaju kada samo jedan od njih nije izražen tumor se smatra mikrosatelitski nisko nestabilan (MSI-L, engl. *microsatellite instability – low*), a u slučaju dva ili više neizraženih proteina uključenih u MMR mikrosatelitski visoko nestabilan (MSI-H, engl. *microsatellite instability – high*).

Epigenetsko utišavanje gena, najčešće hipermetiliranje promotorske regije MLH1, uočeno je u više od 50 % slučajeva raka želuca. U 12 – 15 % slučajeva mikrosatelitska nestabilnost javlja se zbog mutacija u genima *MLH1* i *MSH2* (Ratti i sur. 2018). Gubitak funkcije MMR-a dovodi do neuspješnog popravka tijekom replikacije, nakupljanja pogrešaka u mikrosatelitima insercijom ili delecijom nukleotida, promjene duljine mikrosatelita te nastanka mutacija (Ratti i sur. 2018; Li i sur. 2020).

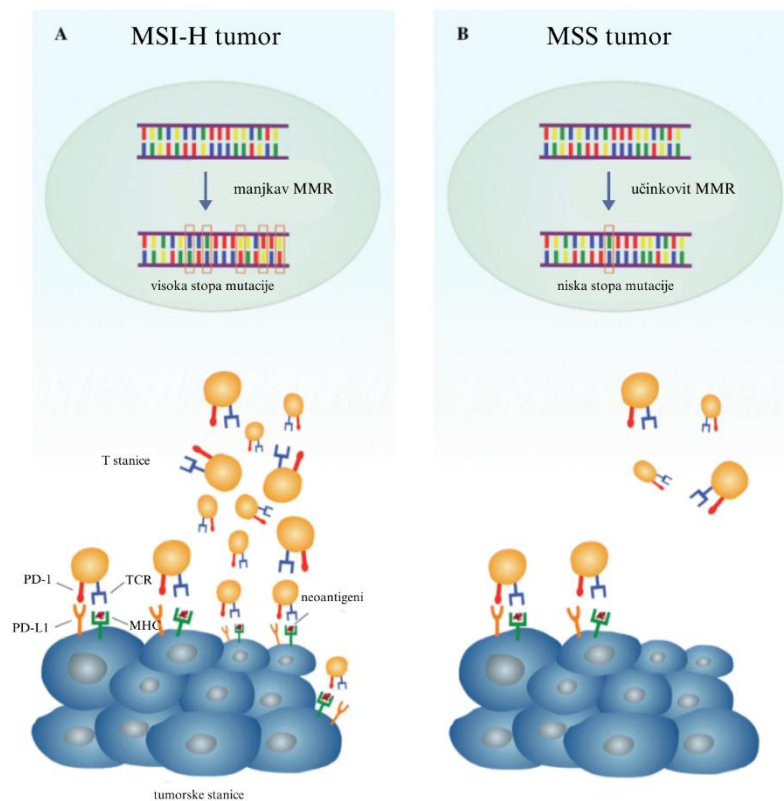
Budući da se pogreške ne popravljaju, mikrosatelitski nestabilni tumori imaju i 100 – 1000 puta veću stopu mutacije od mikrosatelitski stabilnih tumora pa se u ovakvim hipermutiranim stanicama stvaraju i neoantigeni, koji aktiviraju T limfocite i stimuliraju ulazak imunoloških stanica u sam tumor (Ratti i sur. 2018).

Tumor ekspresijom PD-L1 na površini svojih stanica inhibira protutumorsku aktivnost (Ratti i sur. 2018). Ova kontrolna molekula se zbog svoje pretjerane ekspresije stoga koristi i kao biomarker (Pužar Dominkuš i Hudler 2023), a novija istraživanja sugeriraju upotrebu inhibitora ovakvih molekula kao terapije za tip MSI-H tumora (Ratti i sur. 2018).

U tumora MSI uočene su i učestale mutacije u genima čiji su produkti uključeni u signalne puteve koji podržavaju karcinogenezu, kao što su geni *PIK3CA*, *HER2* i *EGFR* (Ratti i sur. 2018). Smatra se i da u nekih tumora promjene gena MHC-I, koji su ključni za prezentiranje antigena, mogu utjecati na izbjegavanje imunološkog odgovora (Pužar Dominkuš i Hudler 2023).

Rak želuca MSI-H rjeđe metastazira u limfne čvorove i povezuje se s povoljnijom prognozom po bolesnika nego što je to slučaj kod tumora tipa MSI-L i MSS.

Usporedba mikrookoliša tumora MSI-H i MSS prikazana je na Slici 3.



**Slika 3.** Različiti imunološki mikrookoliš tumora MSI-H i MSS. Preuzeto i prilagođeno prema Ratti i sur. 2018.

## 1.5. Podtipovi raka želuca

Topografski, rak želuca možemo podijeliti u onaj koji se nalazi u gornjem dijelu želuca, a nazivamo ga kardijalnim, te nekardijalni koji zahvaća donje dijelove želuca. Nekardijalni ili distalni rak želuca se u 90 % slučajeva smatra posljedicom kronične infekcije bakterijom *H. pylori*, dok taj udio za kardijalni rak želuca iznosi tek oko 20 % (Bray i sur. 2024).

Za podjelu raka želuca prema histološkom tipu koristi se Laurenova klasifikacija, koja ih prema strukturi žlijezda dijeli na dva tipa: intestinalni i difuzni. Intestinalni čini oko 50 % slučajeva, difuzni oko 33 %, a preostali su ili miješanog tipa ili su neklasificirani (Laurén 1965).

Intestinalni tip često karakterizira pretjerana ekspresija *HER2* (Wang i sur. 2017), kromosomska i mikrosatelitska nestabilnost, gubitak heterozigotnosti, (Gigek i sur. 2012) te mutacije *KRAS* (Takahashi i sur. 2014). Ovaj se tip češće povezuje i s okolišnim čimbenicima, primjerice infekcijom bakterijom *H. pylori* i načinom prehrane, a uglavnom se javlja kod starijih muških osoba (Ma i sur. 2016).

Intestinalni tip ima diferencirane tubularne i žljezdane strukture, a razvija se procesom koji ide od pojave kroničnog gastritisa, preko metaplazije i displazije do zloćudnog tumora (Gigek i sur. 2012).

S druge strane, difuzni je tip okarakteriziran stanicama bez žljezdane strukture i češće se javlja u osoba mlađe dobi (Ma i sur. 2016). Obiteljski oblik uzrokovan je mutacijom u genu *CDH1*, a nasljeđuje se autosomalno dominantno (Ko 2024). Difuzni tip karakterizira amplifikacija gena *FGFR2* (Matsumoto i sur. 2012), mutacije *NRAS* (Takahashi i sur. 2014), aktivacijske mutacije *RHOA* i mikrosatelitska nestabilnost (Riquelme i sur. 2015).

Ipak, ove podjele nisu bile dovoljno specifične i napretkom tehnologije razvijena je nova, molekularna klasifikacija raka želuca.

Molekularnu klasifikaciju raka želuca u četiri podtipa predložili su istraživači organizacije The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network 2014. godine. Svaki genomski podtip pogađa specifične regije (Slika 4).

Prvu i najučestaliju skupinu raka želuca čine kromosomski nestabilni tumori (CIN, engl. *chromosomal instability*). Oni se javljaju u čak 50 % slučajeva te ih karakterizira promjena broja kopija DNA (TCGA Research Network 2014). Kod intestinalnog tipa česte su takve strukturne varijacije na kromosomima 8q, 17q i 20q, a kod difuznog tipa na 12q i 13q (Chia i Tan 2016) Ovakve promjene mogu dovesti do aneuploidije, translokacija, amplifikacija, delecije ili gubitka heterozigotnosti gubitkom cijeloga alela (Garattini i sur. 2017). U više od 70 % slučajeva mutiran je gen *TP53* (TCGA Research Network 2014), a često su amplificirani i geni staničnog ciklusa poput ciklina i kinaza ovisnih o ciklinima (Garattini i sur. 2017). Javlja se i aktivacija signalnog puta RTK/RAS/MAPK pa su tako amplificirani i

*HER2, RAS, BRAF, EGFR, FGFR2, VEGF* i *VEGFR-2* itd. (Garattini i sur. 2017; Wang i sur. 2019).

Druga skupina jesu mikrosatelitski nestabilni tumori (MSI) i oni predstavljaju oko 22 % svih slučajeva raka želuca (TCGA Research Network 2014). Medijan godina u kojima se rak želuca MSI dijagnosticira je 72, a primijećena je i malo veća učestalost u žena (56 %) (Wang 2019).

Smatra se da je posljedica utišavanja gena, odnosno hipermetilacije promotora gena *MLH1* uključenog u mehanizam popravka krivo sparene baze, MMR. Tumori MSI u 42 % slučajeva nose mutaciju *PIK3CA*, a česte su i mutacije u genima *HER2, ERBB3* i *EGFR* (Riquelme i sur. 2015). U oko trećine tumorskih stanica, i gotovo pola imunoloških stanica u tumorima s visokom razinom mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H) povećana je ekspresija PD-L1 što bi mogao biti i prediktivni čimbenik za uspješnost terapije inhibitorima kontrolnih točaka (Rodriquenz i sur. 2020).

Genomski stabilni tumori (GS, engl. *genomically stable*) prisutni su u 1 od 5 slučajeva raka želuca čineći tako oko 20 % ukupnih slučajeva (TCGA Research Network 2014). Dijagnosticiraju se nešto ranije od ostalih podtipova, medijan godina je 59, ali podjednako kod muškaraca i žena. Histološki gledano, u većini slučajeva su difuznog tipa, a brojke variraju od 58 % (Garattini i sur. 2017) do 73 % (Wang 2019). U njih su primijećene mutacije u genima koji kodiraju za adhezijske molekule poput *CDH1* što uzrokuje i promjene u pokretljivosti samih tumorskih stanica (Garattini i sur. 2017).

Najmanje učestala grupa jesu oni pozitivni na virus Epstein Barr (EBV) koji čine oko 9 % svih slučajeva raka želuca (TCGA Research Network 2014). Oni su posljedica latentne infekcije EBV-om, herpes virusom koji igra ulogu u mnogim malignim bolestima (Derks i sur. 2016).

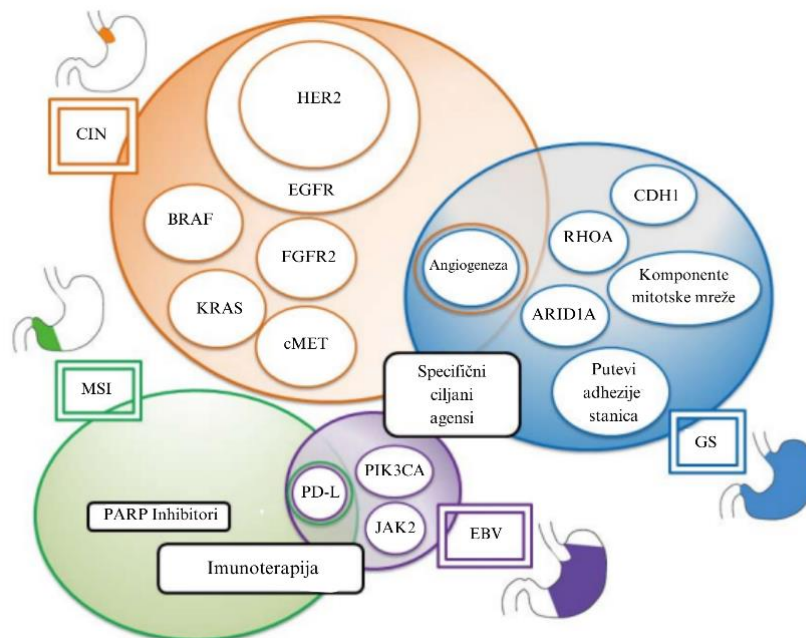
Ovaj podtip raka želuca većinom se javlja u muškaraca, a lokaliziran je u tijelu i dnu želuca (Riquelme i sur. 2015). Rijetko metastazira u limfne čvorove te se uz njega veže dulje preživljenje pacijenata, odnosno niže stope smrtnosti, no mehanizmi koji bi mogli biti odgovorni za ovu pojavu nisu u potpunosti razjašnjeni. Moguće je da CD8<sup>+</sup> limfociti, koji infiltriraju tumor, pomažu u eliminaciji virusom zaraženih stanica, ili da su u EBV-pozitivnim tumorima češće prisutne promjene povezane s većom stopom preživljenja, poput mutacije gena *ARID1A* (Camargo i sur. 2014).

Derks i sur. (2016) uočili su da je u 15 % slučajeva tumora želuca pozitivnih na EBV amplificiran lokus gena *PD-L1* i *PD-L2*. Kao obranu od virusa, infiltrirajuće stanice T luče IFN- $\gamma$  koji dodatno može inducirati ekspresiju PD-L1. Stoga su se počele razvijati strategije korištenja terapije usmjerene na PD-1 koja bi mogla biti učinkovita kod ove skupine pacijenata (Derks i sur. 2016).

Mutacije gena *PIK3CA* javljaju se u oko 80 % slučajeva raka želuca pozitivnog na EBV, više nego u ijednom drugom podtipu (TCGA Research Network, 2014).

Osim toga, ovi tumori imaju i veliku stopu hipermetilacije DNA, a posebno je važna hipermetilacija CpG otočića promotorske regije *CDKN2A*, jednog od najvažnijih tumor supresorskih gena povezanog s rakom želuca, što za posljedicu ima njegovu inaktivaciju te lošiju prognozu po pacijenta. Hipermetilacija ove regije javlja se u svim slučajevima EBV-pozitivnog raka želuca (Tahara i Arisawa, 2015).

Uz sve navedeno, otkrivene su i amplifikacije gena *JAK2* i *ERBB2* te delecije unutar gena *PTEN*, *SMAD4* i *CDKN2A* (Riquelme i sur. 2015).



**Slika 4.** Četiri molekularna podtipa raka želuca s pripadajućom anatomskom raspodjelom i prospektivnim terapijskim strategijama. Preuzeto i prilagođeno prema Garattini, 2017.

Molekularna klasifikacija raka želuca važna je za razumijevanje podloge ove složene bolesti, a sukladno tomu i poboljšanje u terapijskom pristupu svakome pacijentu (Garattini i sur. 2017).

## 2. CILJ

Putevi prijenosa signala RAS/RAF/MAPK i PI3K/Akt/mTOR najčešće su poremećeni putevi u mnogih karcinoma, uključujući i rak želuca. Geni *KRAS* i *PIK3CA* važan su dio ovih signalnih puteva te su kao takvi pokazatelji različitih karakteristika raka želuca, a tako potencijalno i njegove progresije u oboljelih osoba. Proteini sustava MMR (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2), odnosno nedostatak njihove izraženosti, ukazuju na povećanu mikrosatelitsku nestabilnost i posljedično metastatski potencijal raka želuca.

Cilj rada jest istražiti povezanost prisutnosti mutacija u genima *KRAS* i *PIK3CA* te mikrosatelitske nestabilnosti na progresiju bolesti, to jest proširenost raka želuca u limfne čvorove ili udaljene organe uz praćenje vremena proteklog do pojave metastatske bolesti.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Uzorci tkiva

Parafinske kocke uzoraka raka želuca 69 bolesnika izvadila sam iz arhive Odjela za onkološku patologiju Klinike za tumore, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Sestre Milosrdnice u Zagrebu. Iz baze podataka Odjela prikupila sam podatke o progresiji bolesti koji uključuju metastatski status, prisutnost pozitivnih limfnih čvorova, prisutnost udaljenih metastaza, spol bolesnika te dob pri postavljanju dijagnoze. Oznake i odgovarajući opisi patohistoloških karakteristika raka želuca prikazani su u Tablici 1.

Istraživanje je provedeno uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC-a Sestre milosrdnice, poštujući tajnost podataka.

**Tablica 1.** Klasifikacija TNM kod patohistološke dijagnostike raka želuca.

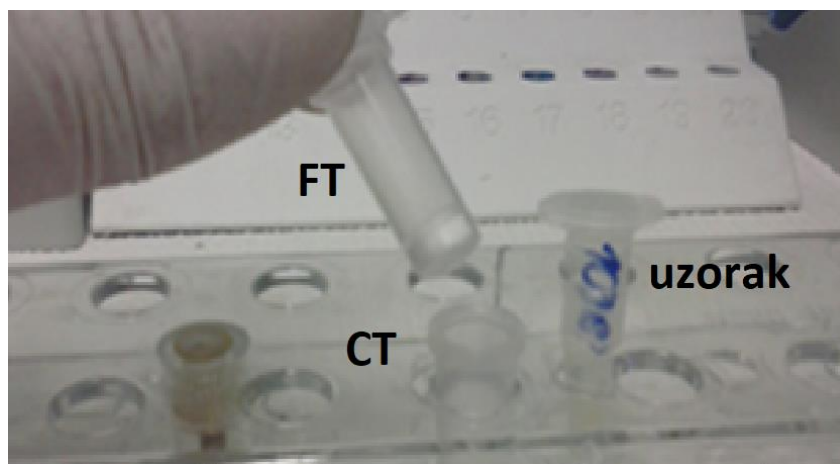
<b>pT</b>	<b>Opis dubine prodora tumorskih stanica</b>
<b>T1</b>	prodor stanica raka u sloj submukoze
<b>T2</b>	prodor stanica raka u mišićni sloj
<b>T3</b>	prodor stanica raka u subserozu
<b>T4</b>	prodor stanica raka u serozu
<b>pN</b>	<b>Broj pozitivnih regionalnih limfnih čvorova</b>
<b>N0</b>	nema pozitivnih limfnih čvorova
<b>N1</b>	1 do 2 pozitivna limfna čvora
<b>N2</b>	3 do 6 pozitivnih limfnih čvorova
<b>N3</b>	7 i više pozitivnih limfnih čvorova
<b>M</b>	<b>Prisutnost udaljenih metastaza</b>
<b>M0</b>	Nema udaljenih metastaza
<b>M1</b>	Prisutne su udaljene metastaze

### 3.2. Priprema tkiva i izolacija DNA

Analiza mutacija napravljena je na tumorskoj DNA izoliranoj iz tumorskog tkiva fiksiranog u 10% puferiranom formalinu i uklopljenog u parafin rutinskom metodom. Tako obrađeno tkivo pohranjeno je u arhivi Odjela za onkološku patologiju. Od odabranih bolesnika iz arhive sam izvadila parafinske kocke s najvećim udjelom tumorskih stanica.

Prije samog rezanja kocke sam pohranila na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  najmanje pola sata kako bi se dobro ohladile. Koristeći mikrotom (*Zeiss Hyrax S50*) napravila sam po barem četiri reza svakog uzorka debljine  $7\text{ }\mu\text{m}$  pazeći da prikupljeni materijal sadrži najmanje 30 % tumorskih stanica. Izrezano tkivo sam stavila u epruvetice, zatim deparafinizirala te iz takvog uzorka izolirala DNA.

Za deparafinizaciju tkiva i izolaciju DNA pratila sam protokol odgovarajućeg kompleta *Cobas® DNA Sample Preparation Kit* (*Roche Diagnostics GmbH*, Njemačka) koji koristi epruvetice s filterom (Slika 5), uz nekoliko manjih izmjena.



**Slika 5.** Epruvetice s filterom (FT) koje sam koristila za izolaciju nukleinskih kiselina (DNA) iz tkiva uklopljenog u parafin.

Prvog dana provela sam rezanje tkiva, postupak deparafinizacije i lize tkiva.

U epruveticu s izrezanim tkivom dodala sam  $1500\text{ }\mu\text{L}$  ksilola za otapanje parafina promućkala i centrifugirala na velikom broju okretaja ( $18\text{ }000\text{ g}$ ) 1 minutu. Odlila sam supernatant te postupak s ksilolom ponovila još jednom. Potom sam u epruveticu dodala  $750\text{ }\mu\text{L}$  apsolutnog

etanola kako bih uklonila sve ostatke ksilola te promućkala i centrifugirala. Postupak sam ponovila još jednom, po potrebi dva puta. Nakon zadnjeg odlijevanja etanola otvorene epruvetice s tkivom stavila sam na termoblok na 56 °C 10 minuta da ispari ostatni alkohol, kako ne bi došlo do inhibicije proteinaze K. U dodatne PCR čiste epruvetice pripremila sam dostatnu količinu proteinaze K koju sam razrijedila s puferom za lizu (engl. *Tris Lysis Buffer*, TLB) koji se nalazi u kompletu (u zadanom omjeru 70 µL proteinaze K + 180 µL TLB-a). Nakon sušenja tkiva u svaku sam epruveticu dodala po 320 µL proteinaze K u TLB-u i zatvorene epruvetice stavila na termoblok na 56 °C uz lagano miješanje preko noći.

Sljedećeg dana sam provela postupak izolacije nukleinskih kiselina.

Nakon završetka lize tkiva potrebno je inhibirati proteinazu K. To sam učinila podižući temperaturu u termobloku na 90 °C 1 sat. Nakon toga sam epruvetice stavila na stalak da se malo ohlade. Potom sam u njih dodala 250 µL pufera koji veže zaostali parafin koji se također nalazi u kompletu (engl. *DNA Paraffin Binding Buffer*, PBB), dobro resuspendirala te ostavila na sobnoj temperaturi 10 minuta.

U međuvremenu sam na stalku pripremila epruvetice s filterom (engl. *filter tubes*, FT) koje sam stavila u donje epruvetice za prikupljanje (engl. *collecting tubes*, CT) i adekvatno obilježila. U epruveticu s uzorkom sam dodala po 180 µL izopropanola da pospješim vezanje DNA za kolonu. Dobro sam resuspendirala i prebacila cijeli sadržaj u FT. Tada sam cijelu FT/CT konstrukciju stavila centrifugirati na 8500 g 1 minutu, a nakon toga epruveticu FT prebacila sam u čistu CT.

Potom sam epruvetice FT isprala jednom s po 700 µL pufera za ispiranje I i II (engl. *Wash Buffer I*, WB I; *Wash Buffer II*, WB II) između kojih sam centrifugirala epruvetice. Nakon drugog ispiranja epruvetice FT/CT sam centrifugirala na 18 000 g 1 minutu da se dobro osuše. U međuvremenu sam pufer za eluciju, koji se nalazi u kompletu, stavila na termoblok da se ugrije na 56 °C. Epruveticu FT sam prebacila u nove čiste PCR epruvetice koje sam adekvatno obilježila. Na sam filter dodala sam 150 µL ugrijanog pufera za eluciju te ostavila 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim sam centrifugirala FT/PCR konstrukciju na 10 000 g 1 minutu.

Pomoću spektrofotometra *Nanodrop* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) odredila sam koncentraciju izoliranih DNA uzoraka tako što sam za svaki uzorak napravila po tri mjerenja, a zatim izračunala aritmetičku sredinu tih vrijednosti.

Prije ispitivanja na prisutnost mutacija u genima *KRAS* i *PIK3CA*, sve sam uzorke razrijedila puferom SD (engl. *Sample Diluent*) do koncentracije 2 ng/ $\mu$ L koristeći formulu ovisno o početnoj koncentraciji (Tablica 2).

**Tablica 2.** Formula za izračun volumena uzorka i pufera SD.

Koncentracija DNA u uzorku (ng/ $\mu$ L)	Volumen uzorka ( $\mu$ L)	Volumen pufera SD ( $\mu$ L)
$c > 63$	5	$\frac{5 \times c}{2} - 5$
$c < 63$	$\frac{160 \times 2}{c}$	$160 - \frac{160 \times 2}{c}$

Za analizu mutacija koristila sam po 25  $\mu$ L razrijeđene izolirane DNA svakog uzorka.

### 3.3. Analiza mutacija u genima *KRAS* i *PIK3CA*

Mutacije u genu *KRAS* određene su metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). Korišten je protokol kompleta *KRAS Mutation Test v2 (LSR)* (*Roche Diagnostics FmbH*, Njemačka). Osnovu ove analize čini PCR umnažanje i detekcija ciljane DNA pomoću međusobno komplementarnih parova početnica i oligonukleotidnih proba. Svaka proba sadrži fluorescentnu boju (engl. *reporter*) kojom je označena i utišivač (engl. *quencher*). U testu se koriste četiri fluorescentne boje za označavanje mutacija, tri smjese za tri neovisne reakcije kojima će se detektirati ciljane mutacije te pozitivna i negativna kontrola.

Test može detektirati i identificirati 28 točkastih mutacija u egzonima 2, 3 i 4 gena *KRAS* u DNA izoliranoj iz tkiva uklopljenih u parafin. Početnice su kreirane tako da definiraju regije gena *KRAS* veličine 79 – 114 parova baza koje će se umnožiti, a svaki od tih sljedova specifična je za pojedinu mutaciju.

Za analizu mutacija u genu *PIK3CA* korišten je komplet *PIK3CA Mutation Test* koji radi na istom principu. Ovaj test može detektirati i identificirati 17 točkastih mutacija na egzonima 1, 4, 7, 9 i 20. DNA sljedovi koji se umnažaju u ovom testu veličine su između 85 i 155 parova baza.

Svaki od ovih komercijalnih kompleta sadrži i pouzdanu pozitivnu kontrolu koja sadrži unaprijed određen, a nama nepoznat, udio DNA s mutacijama. Ona služi kao referentna vrijednost za određivanje granične vrijednosti testa. Za negativnu kontrolu koristila sam vodu bez nukleaza. Nadalje, dio svakog kompleta je i interna kontrola, posebno dizajnirana početnica za određeni DNA slijed koji mora biti detektiran u svakom pojedinom uzorku.

Nakon razrjeđivanja uzoraka puferom SD, uslijedila je priprema uzoraka za PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction, real-time PCR*). Analiza je provedena na PCR pločici s 96 jažica na koju su prema upisanom protokolu dodani reagensi. U softver zadane analize upisala sam sve podatke o uzorcima te je na toj osnovi slijedila priprema reagensa i uzoraka na PCR pločicu.

Pripremila sam tri epruvetice od 2 mL koje sam adekvatno obilježila za tri različite otopine matične smjese (engl. *master mix*). One se sastoje od magnezijevog acetata (MgAc) i odgovarajuće matične smjese sadržane u kompletu, a njihov volumen ovisi o broju uzoraka.

U svaku epruveticu sam dodala MgAc, a zatim i odgovarajuću matičnu smjesu iz kompleta.

Epruvetice sam kratko vorteksirala kako bi se sadržaji dobro izmiješali. Na PCR pločici s 96 jažica sam na pozicije B01/B02/B03 stavila 50  $\mu$ L čiste vode bez nukleaza kao negativnu kontrolu. U stupce 1, 2 i 3 stavila sam po 25  $\mu$ L odgovarajuće otopine matične smjese, preskačući red s negativnom kontrolom.

Uzorke sam jedan po jedan kratko vorteksirala, a onda pažljivo nanijela po 25  $\mu$ L u adekvatnu jažicu prema upisanom protokolu i resuspendirala u otopini matične smjese. Nanosila sam jedan uzorak po redu, počevši od reda C. Uzorci se nanose u svaku otopinu matične smjese.

Posljednju sam, u red A (pozicije A01/A02/A03), nanosila pozitivnu kontrolu, dobro resuspendiranu i sobne temperature. Volumen je iznosio 25  $\mu$ L.

Po završetku nanošenja otopina matične smjese, uzoraka, pozitivne i negativne kontrole, na pločicu sam pažljivo, ali čvrsto zalijepila foliju da uzorci ne bi isparili.

Selektivnu amplifikaciju za oba testa provela sam na uređaju Cobas z 480 analyzer (*Roche Diagnostics FmbH*, Njemačka) na kojemu sam i očitala rezultate prema protokolu proizvođača.

Budući da sam koristila komercijalne komplete, pristup detaljima dobivenih rezultata bio je ograničen te podatak o detektiranoj mutaciji ne prikazuje preciznu gensku promjenu. Zbog toga u ovom radu koristim terminologiju koju koristi proizvođač kompleta.

Detaljan prikaz detektiranih i stvarnih mutacija u oba kompleta navedeni su u Tablicama 3 i 4.

**Tablica 3.** Aktivacijske mutacije koje detektira, identificira i prikazuje KRAS Mutation Test v2 (LSR).

Egzon	Rezultat analize mutacije <i>KRAS</i>	Identificirana mutacija <i>KRAS</i>	Promjena u slijedu DNA
2	G12x	G12A	c.35G>C
		G12C	c.34G>T
		G12D	c.35G>A
		G12R	c.34G>C
		G12S	c.34G>A
		G12V	c.35G>T
	G13x	G13A	c.38G>C
		G13C	c.37G>T
		G13D	c.38G>A
		G13R	c.37G>C
		G13S	c.37G>A
		G13V	c.38G>T
3	A59x	A59E	c.176C>A
		A59G	c.176C>G
		A59S	c.175G>T
		A59T	c.175G>A
	Q61x	Q61E	c.181C>G
		Q61Hc	c.183A>C
		Q61Ht	c.183A>T
		Q61K	c.181C>A
		Q61L	c.182A>T
		Q61P	c.182A>C
		Q61R	c.182A>G

**Tablica 3.** nastavak

4	K117x	K117Nc	c.351A>C
		K117Nt	c.351A>T
	A146x	A146P	c.436G>C
		A146T	c.436G>A
		A146V	c.437C>T

**Tablica 4.** Aktivacijske mutacije koje detektira, identificira i prikazuje komplet PIK3CA Mutation Test.

<b>Egzon</b>	<b>Rezultat analize <i>PIK3CA</i> mutacije</b>	<b>Identificirana <i>PIK3CA</i> mutacija</b>	<b>Promjena u DNA slijedu</b>
1	R88Q	R88Q	c.263 G>A
4	N345K	N345K	c.1035 T>A
7	C420R	C420R	c.1258 T>C
9	E542K	E542K	c.1624 G>A
	E545x	E545A	c.1634 A>C
		E545D	c.1635 G>T
		E545G	c.1634 A>G
		E545K	c.1633 G>A
	Q546x	Q546E	c.1636 C>G
		Q546K	c.1636 C>A
		Q546L	c.1637 A>T
Q546R		c.1637 A>G	
20	M1043I	M1043I	c.3129 G>T
	H1047x	H1047L	c.3140 A>T
		H1047R	c.3140 A>G
		H1047Y	c.3139 C>T
	G1049R	G1049R	c.3145 G>C

### 3.4. Određivanje mikrosatelitske nestabilnosti

Tehnikom imunohistokemijskog bojenja sam u jezgrama tumorskih stanica odredila prisutnost, odnosno odsutnost proteina MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2, koji govore o mikrosatelitskoj stabilnosti, odnosno nestabilnosti. Iz istih parafinskih kocki, korištenih za analizu mutacija, mikrotomom sam napravila rezove debljine 3 – 4  $\mu\text{m}$ , a onda ih pažljivo kistovima prebacila na površinu vode u vodenoj kupelji zagrijanoj na 56 °C te uhvatila na specijalna pozitivno nabijena predmetna stakalca. Rezove sam sušila jedan sat na 65 °C u termostatu. Nakon sušenja, pripremljene rezove sam 20 minuta kuhala u lužnatom puferu Tris/EDTA (High pH Target Retrieval Solution, S 2368, *Glostrup*, Danska; pH 9,0) na 96 °C, a potom ih ohladila. Ovaj korak neophodan je prije samog bojenja radi deparafiniranja i otkrivanja epitopa.

Za imunohistokemijsko bojenje tkiva koristila sam uređaj *Autostainer Link 48* (*Agilent Dako*, SAD) koji je prema protokolu za metodu HRP/DAB dodavao zadane reagensne. Nakon dodavanja svakog reagensa, tkivo je ispirano fosfatnim puferom (PBS, engl. *phosphate-buffered saline*). Tkivo se prvo 5 minuta tretira 3 %-tnim vodikovim peroksidom kako bi se zaustavilo djelovanje endogenih peroksidaza i umanjilo nespecifično bojenje.

Kao primarna protutijela korištena su monoklonska mišja protutijela i to:

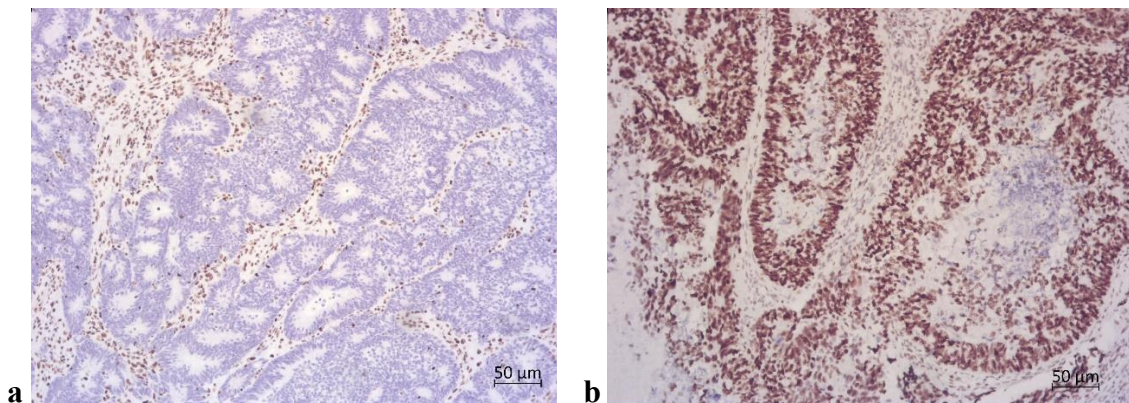
- Monoclonal Mouse Anti-Human MutL Protein Homolog 1 Clone ES05 (*Agilent Dako*, SAD),
- Monoclonal Mouse Anti-Human MutS Protein Homolog 2 Clone FE11 (*Agilent Dako*, SAD),
- Monoclonal Mouse Anti-Human MutS Protein Homolog 6 Clone EP49 (*Agilent Dako*, SAD),
- Monoclonal Mouse Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2 Clone EP51 (*Agilent Dako*, SAD).

Tkivo je primarnim protutijelima bilo izloženo 30 minuta, ispirano je puferom, a zatim izloženo sekundarnim protutijelima također 30 minuta. Sekundarno protutijelo nužno je za vizualizaciju nastalog kompleksa antigen-antitijelo, a koristila sam polimer dekstrana na koji je konjugirano sekundarno protutijelo i molekule peroksidaze hrena. Po isteku 30 minuta tkivo je ispirano fosfatnim puferom i tretirano DAB kromogenim supstratom 10 minuta. DAB reagira s peroksidazom hrena što daje smeđe obojenje ciljanim antigenima. Tkivo se zatim



ispire destiliranom vodom i kontrastno boji hematoksilinom 5 minuta što jezgrama daje karakteristično plavo do ljubičasto obojenje i stvara izvrstan kontrast između jezgara i ciljanih antigena. Svi reagensi potrebni za provođenje ove metode uključeni su u komplet *EnVision FLEX/HRP SM802* (Agilent Dako, SAD).

Obojene i dehidrirane uzorke pregledala sam pod srednjim povećanjem mikroskopa (*Zeiss Axiostar*) i po uzorku prebrojala sto jezgara. Prema broju stanica koje pokazuju reakciju odredila sam udio pozitivnih stanica u svakom uzorku. Pozitivan rezultat definiran je graničnom vrijednosti od 10 %, dok odsustvo pozitivne reakcije u jednom ili više istraživanih proteina ukazuje na mikrosatelitsku nestabilnost. Tumor se karakterizira kao mikrosatelitski stabilan (MSS, engl. *microsatellite stability*) u slučaju izraženosti svih proteina, kao mikrosatelitski nisko nestabilan (MSI-L, engl. *MSI-low*) kod nedostatka izraženosti jednog proteina te kao mikrosatelitski visoko nestabilan (MSI-H, engl. *MSI-high*) u slučaju nedostatka izraženosti dva i više proteina.



**Slika 6.** Imunohistokemijska izraženost MLH1 u raku želuca. Kontrastno obojeno hematoksilinom. Povećanje 200x. (a) Negativan rezultat, jezgre tumorskih stanica nisu obojane. (b) Pozitivan rezultat, vidljiva održana izraženost (smeđe obojenje) proteina MLH1 u jezgrama tumorskih stanica kao i u jezgrama stanice strome oko tumora.

### 3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani grafički i tablično. S obzirom na to da je većina varijabli kategorijska, u statističkoj analizi korišten je hi-kvadrat s Yatesovom korekcijom ili Fisherov egzaktni dvostrani test za analize zavisnosti mutacijskog statusa gena *KRAS* i statusa MSI tumora sa spolom i dobi ispitanika te kliničkim karakteristikama poput gradusa tumora, dubine prodora

tumora, prisutnosti pozitivnih limfnih čvorova, prisutnosti udaljenih metastaza i ishoda te statusa MSI / mutacijskog statusa gena *KRAS*. Analiza je provedena u programu RStudio. Nulta hipotezu o nezavisnosti testiranih varijabli odbačena je u slučaju p-vrijednosti niže od 0,05.

Spearmanovom analizom korelacija analiziran je utjecaj pojedine točkaste mutacije i statusa MSI na pojavu metastaza. Vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) od 0,3 do 0,5 smatrane su slabom korelacijom, a vrijednost iznad 0,5 jakom korelacijom u slučaju p-vrijednosti niže od 0,05.

Za procjenu preživljenja pacijenata korištena je Kaplan-Meierovu krivulja koja prikazuje vrijeme proteklo od postavljanja dijagnoze do nastupanja smrti. Izrađene su tri krivulje: krivulja ukupnog preživljenja bolesnika, krivulja prema postojanju mutacija u genu *KRAS* i krivulja prema statusu MSI raka želuca. Krivulje su izrađene u programu RStudio.

Za usporedbu preživljenja između skupina prema mutacijskom statusu gena *KRAS* te statusu MSI tumora korišten je Log-Rank test.

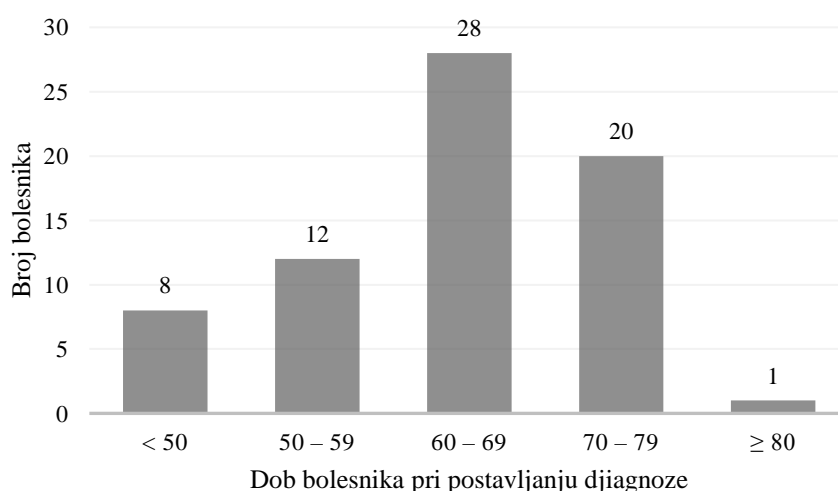
## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike raka želuca

Istraživanje je provedeno na 69 uzoraka raka želuca. Od toga 40 uzoraka (58,0 %) pripada muškarcima, a 29 (42,0 %) ženama. Prosječna dob svih bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze je  $63,2 \pm 9,7$  godina s rasponom godina starosti između 34 i 86 godina (medijan 65 godina). Prosječna dob za muškarce bila je  $63,65 \pm 9,9$  godina i  $62,8 \pm 9,3$  za žene.

Većina analiziranih uzoraka (71,0 %) pripada osobama starijima od 60 godina, najviše u dobi između 60 i 69 godina starosti (40,6 %). 29,0 % osoba oboljelo je prije 60. godine života i to 17,4 % u dobi od 50 do 59 godina, a 11,6 % prije 50. godine života.

Raspodjela analiziranih uzoraka prema dobi bolesnika prikazana je na Slici 7.



**Slika 7.** Raspodjela uzoraka prema dobi bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze.

Prosječna veličina tumora je bila  $54,5 \pm 25,4$  mm (medijan 52,5 mm). Svega 4 tumora (5,9 %) bila su veličine do 20 mm, 34 tumora (50,0 %) bilo je veličine od 10 do 50 mm dok su još 34 tumora (50,0 %) bila veća od 50 mm, od čega tri tumora (4,4 %) veća od 100 mm.

Najviše uzoraka, njih 28 (40,6 %) su slabo diferencirani tumori i pripadaju histološkom gradusu 3 (G3), a slijede ih 23 uzorka (33,3 %) umjereno diferenciranih tumora, odnosno

gradusa 2 (G2). Četiri (5,8 %) tumora bila su nediferencirana (G4), a tri (4,3 %) dobro diferencirana (G1). Za deset uzoraka (14,5 %) histološki gradus nije bio određen.

Najzastupljeniji tumori (58,0 %) bili su oni koji su prodrli u subserozu (T3), zatim oni (26,1 %) koji su probili mišićni sloj (T2), tumori (11,6 %) koji su prodrli u serozu (T4) i najmanje zastupljeni tumori (4,3 %) bili su oni s prodorom stanica raka u sloj submukoze (T1).

U dvanaest uzoraka (17,4 %) nije bilo prisutnosti pozitivnih limfnih čvorova (N0). Po 21 uzorak (30,4 %) pripadao je skupinama N1 s jednim do dva te N3 sa sedam i više pozitivnih limfnih čvorova. Četrnaest uzoraka (20,3 %) imalo je od tri do šest pozitivnih limfnih čvorova i pripadalo skupini N2, a za jedan uzorak (1,4 %) ovaj nam je podatak nepoznat.

Većina uzoraka (82,6 %) raka želuca nije imala prisutnost metastaza u udaljenim organima (M1), dok je manji dio (14,5 %) imao prisutne udaljene metastaze. Za dva uzorka (2,9 %) nemamo podatak o postojanju udaljenih metastaza.

Najčešći ishod bio je smrt pacijenata (44,9 %), u 17,4 % slučajeva zabilježena je progresija, dok kod 30,4 % pacijenata progresije nije bilo. Za pet slučajeva (7,2 %) ishod nije poznat.

Osnovne karakteristike 69 uzoraka koji su bili dio ispitivanja prikazane su u Tablici 5.

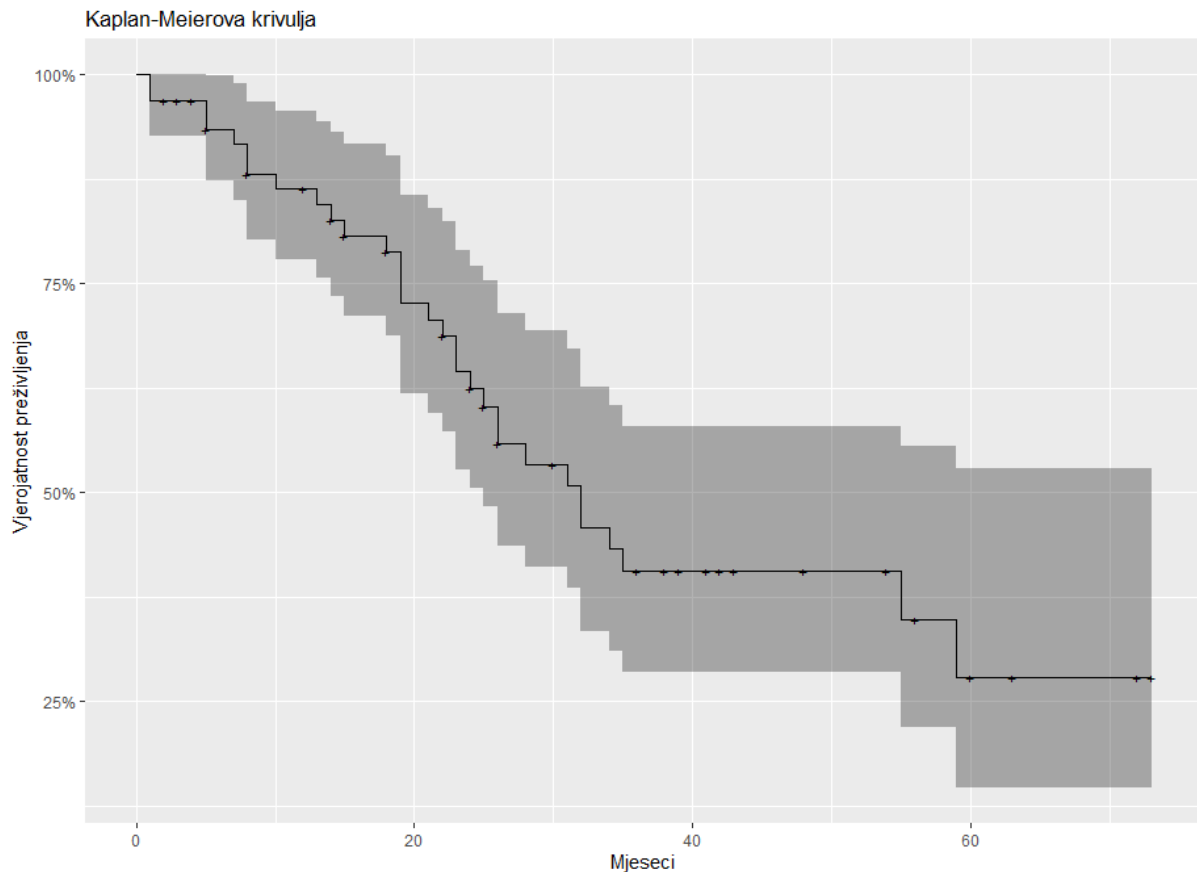
**Tablica 5.** Osnovne karakteristike analiziranih uzoraka raka želuca.

<b>Rak želuca, n = 69</b>		
<b>Spol bolesnika</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
muškarci	40	58,0
žene	29	42,0
<b>Dob bolesnika</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
< 50	8	11,6
50 – 59	12	17,4
60 – 69	28	40,6
70 – 79	20	29,0
≥ 80	1	1,4
<b>Veličina tumora</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
< 50 mm	30	44,1
50 – 100 mm	35	51,5
> 100 mm	3	4,4

Tablica 5. nastavak

<b>Gradus tumora</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1	3	4,3
2	23	33,3
3	29	42,0
4	4	5,8
nepoznato	10	14,5
<b>Dubina prodora tumora</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
T1	3	4,3
T2	18	26,1
T3	40	58,0
T4	8	11,6
<b>Metastaze u limfnim čvorovima</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
N0	12	17,4
N1	21	30,4
N2	14	20,3
N3	21	30,4
nepoznato	1	1,4
<b>Udaljene metastaze</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
M0	57	82,6
M1	10	14,5
nepoznato	2	2,9
<b>Ishod liječenja</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
bez progresije	21	30,4
progresija bolesti	12	17,4
smrt unutar pet godina	31	44,9
nepoznato	5	7,2

Slika 8. prikazuje Kaplan-Meierovu krivulju tijekom preživljenja svih pacijenata neovisno o kliničkim karakteristikama raka želuca. Ukupno preživljenje bolesnika s rakom želuca praćeno je za 64 bolesnika jer za 5 bolesnika nemamo podatke o daljnjem ishodu bolesti te su izuzeti iz analize. Tako je ukupno trogodišnje preživljenje bolesnika s rakom želuca 40,7 %, a petogodišnje 27,9 %.

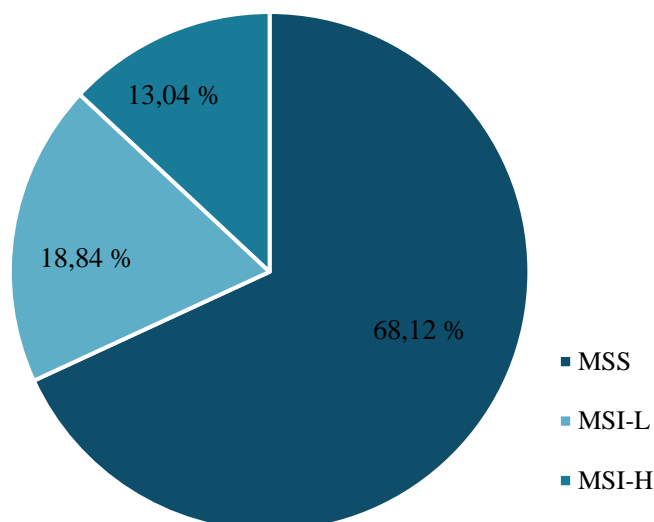


**Slika 8.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja svih bolesnika u istraživanju.

## 4.2. Mikrosatelitska nestabilnost

Metodom imunodetekcije proteina popravka krivo sparenih baza određen je stupanj mikrosatelitske nestabilnosti u fiksiranim prerezima uzoraka raka želuca.

U 22 uzorka (31,9 %) detektirana je mikrosatelitska nestabilnost; u trinaest (18,8 %) niska (MSI-L), a u devet (13,0 %) visoka mikrosatelitska nestabilnost (MSI-H). Među uzorcima je bilo 47 (68,1 %) mikrosatelitski stabilnih (MSS) tumora (Slika 9).



**Slika 9.** Frekvencija mikrosatelitske nestabilnosti u 69 uzoraka raka želuca. MSS, mikrosatelitski stabilni; MSI, mikrosatelitski nestabilni; L, nisko (engl. *low*); H, visoko (engl. *high*).

Od tumora MSI, dvanaest (54,5 %) ih je pripadalo muškarcima, a deset (45,5 %) ženama. Četiri uzorka (18,2 %) pripadala su osobama mlađima od 50 godina, dva (9,1 %) osobama između 50 i 59 godina, deset (45,5 %) onima između 60 i 69 godina te šest (27,3 %) osobama između 70 i 79 godina starosti.

Devet (40,9 %) tumora MSI bilo je umjereno diferencirano, histološkog gradusa 2 (G2), pet (22,7 %) je slabo diferenciranih, gradusa (G3) te po jedan (4,5 %) dobro diferenciran (G1) i nediferenciran (G4) tumor. Šest uzoraka (27,3 %) tumora MSI nije imalo određen histološki gradus.

Najviše tumora MSI, njih šesnaest (72,7 %) prodrlo je u subserozu (T3). Pet (22,7 %) je prodrlo u mišićni sloj (T2), a samo jedan (4,5 %) u serozu (T4).

Šest (27,3 %) tumora MSI nije imalo pozitivnih limfnih čvorova, sedam (31,8 %) je imalo između jednog i tri pozitivna regionalna limfna čvora, pet (22,7 %) je pripadalo skupini N2, a četiri (18,2 %) skupini N3.

Većina (90,9 %) tumora MSI nije imala prisutnih udaljenih metastaza (M0). Tek je kod manjeg dijela uzoraka (9,1 %) primijećena pojava metastaza u udaljenim organima (M1).

Među tumorima MSI tri (13,6 %) ih je imalo mutaciju u genu *KRAS*, od toga su dva (9,1 %) bila MSI-H, a jedan MSI-L (4,5 %). Preostalih 19 (86,4 %) tumora MSI nije imalo mutaciju gena *KRAS*, odnosno imalo je gen divljeg tipa. Prisutnost mutacija u genu *PIK3CA* nije bila

određena u većini slučajeva tumora MSI, njih 19 (86,4 %). U dva slučaja (9,1 %) tumori su imali gen *PIK3CA* divljeg tipa, a u jednom tumoru (4,5 %) detektirana je mutacija (H1047x).

Deset slučajeva (45,5 %) tumora MSI završilo je smrtnim ishodom u roku od pet godina, u četiri slučaja (18,2 %) uočena je progresija, dok je u sedam slučajeva (31,8 %) nije bilo. Za jedan uzorak (4,5 %) podaci nisu poznati.

Tumori MSS čine većinu (68,1 %) analiziranih uzoraka raka želuca. Od toga dvadeset i osam uzoraka (59,6 %) pripada muškarcima, a devetnaest (40,4 %) ženama. Četiri uzorka (8,5 %) pripadaju osobama mlađima od 50 godina, 10 (21,3 %) onima između 50 i 59 godina, 18 (38,3 %) onima između 60 i 69 godina, 14 (29,8 %) onima između 70 i 79 godina te jedan uzorak (2,1 %) osobi starijoj od 80 godina.

Najviše tumora MSS, njih dvadeset i četiri (51,1 %), klasificirani su kao slabo diferencirani tumori, odnosno histološkog su gradusa 3 (G3). Slijede umjereno diferencirani tumori gradusa 2 (G2) kojih je 14 (29,8 %), zatim tri (6,4 %) nediferencirana tumora gradusa 4 (G4) i dva (4,26 %) dobro diferencirana tumora gradusa 1 (G1). Za četiri uzorka (8,5 %) gradus nije određen.

Prema dubini prodora dvadeset i četiri (51,1 %) su tumora čije su stanice probile u subserozu (T3) te trinaest (27,7 %) koji su probili u mišićni sloj (T2). Sedam (14,9 %) ih je probilo u serozu (T4), a (6,4 %) tri tumora probila su kroz submukozu (T1).

Najviše tumora MSS, njih sedamnaest (36,2 %) je prema zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova svrstano u skupinu N3, a samo za tri manje (29,8 %) je onih u skupini N1. Devet uzoraka (19,1 %) kategorizirano je kao N2, šest (12,8 %) nije imalo pozitivnih regionalnih limfnih čvorova (N0), a za jedan uzorak (2,1 %) ovaj podatak nije poznat.

Kod tumora MSS većina (78,7 %) nema udaljenih metastaza (M0), manji dio (17,0 %) ima prisutne metastaze, a za 2 uzorka (4,3 %) nam ovaj podatak nije poznat.

Mutaciju *KRAS* imalo je pet uzoraka (10,6 %) tumora MSS, dok su četrdeset i dva (89,4 %) imala *KRAS* divljeg tipa.

Status gena *PIK3CA* nije bio određen u devet uzoraka (19,1 %). Dva (4,3 %) su imala mutacije u egzonu 9, jedna s promjenom u kodonu 542, a druga u kodonu 545. Divljeg tipa gena *PIK3CA* bilo je 36 uzoraka (76,6 %).



Ishod dvadeset i jednog (44,7 %) tumora MSS bila je smrt, progresija je zabilježena u 8 slučajeva (17,0 %), a u 14 (29,8 %) je nije bilo. Podaci su nepoznati za 4 uzorka (8,5 %).

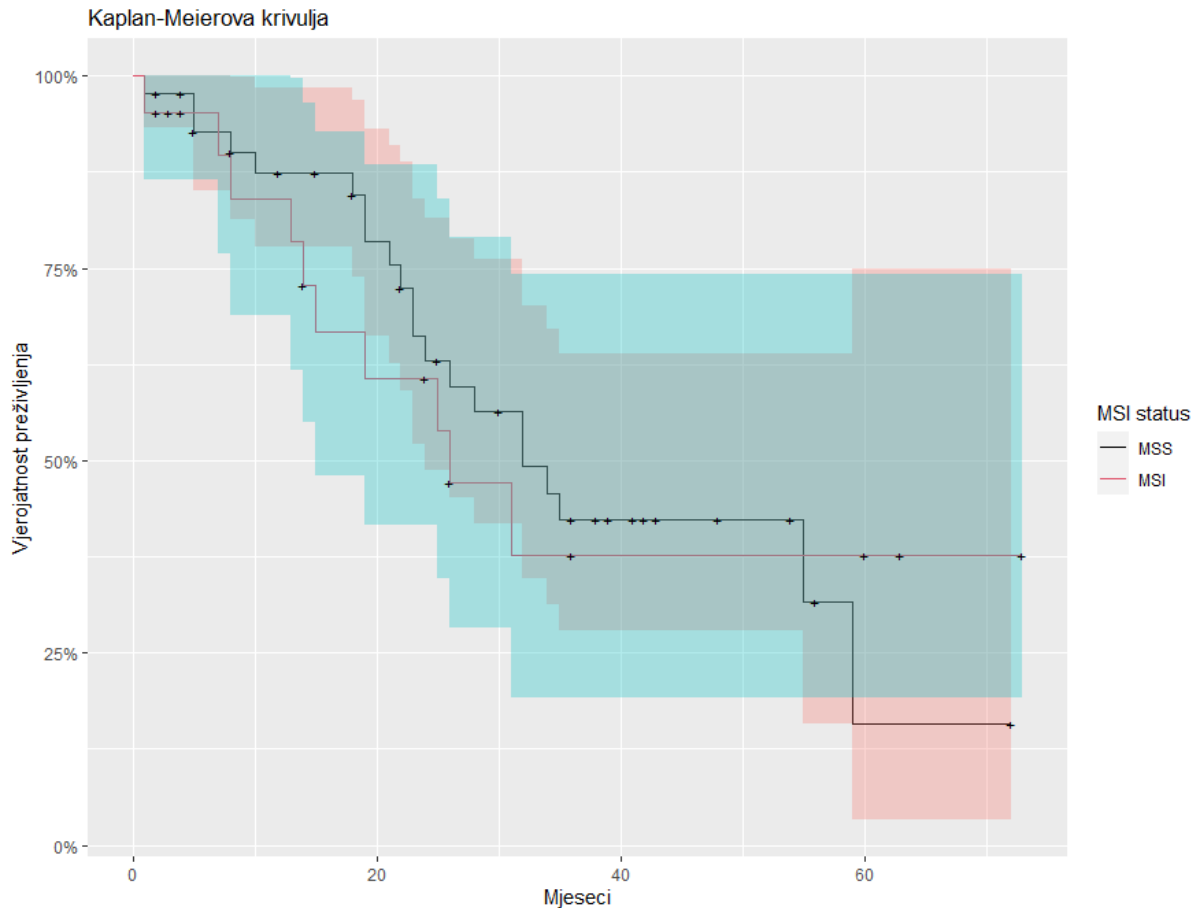
Prikaz karakteristika uzoraka prema statusu MSI nalazi se u Tablici 6.

**Tablica 6.** Detaljan pregled karakteristika tumora MSI i MSS sa statističkom analizom.

<b>Spol</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	<b><i>p</i></b>
muškarci	12	28	$\chi^2 = 0,018$ $p = 0,894$
žene	10	19	
<b>Dob</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
≤ 65	12	29	$\chi^2 = 0,091$ $p = 0,763$
> 65	10	18	
<b>KRAS</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
Mutacija	3	5	$p = 0,703^*$
Divlji tip	19	42	
<b>PIK3CA</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
Mutacija	1	2	$p = 0,209^*$
Divlji tip	2	36	
<b>Gradus</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
G1/2	10	16	$\chi^2 = 2,087$ $p = 0,149$
G3/4	6	27	
<b>Dubina prodora tumora</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
T1/2	5	16	$\chi^2 = 0,451$ $p = 0,502$
T3/4	17	31	
<b>Metastaze u limfnim čvorovima</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
N0	6	6	$p = 0,182^*$
N1/2/3	16	40	
<b>Udaljene metastaze</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
M0	20	37	$p = 0,478^*$
M1	2	8	
<b>Ishod</b>	<b>MSI</b>	<b>MSS</b>	
bez progresije	7	14	$p = 1,000^*$
progresija	4	8	
smrt	10	21	

$\chi^2$ , hi-kvadrat test; \*, Fisherov egzakti test; MSS, mikrosatelitski stabilni tumori; MSI, mikrosatelitski nestabilni

Na Slici 10. prikazana je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja pacijenata prema statusu MSI uzoraka. Za pet uzoraka ovi podaci nisu bili poznati te su u izračun uzeti samo uzorci s poznatim traženim karakteristikama. U bolesnika s tumorom MSI vjerojatnost trogodišnjeg i petogodišnjeg preživljenja iznosi 37,8 %. Kod tumora MSS, vjerojatnost trogodišnjeg preživljenja iznosi 42,3 %, a petogodišnjeg 15,9 %.



**Slika 10.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja pacijenata prema statusu MSI tumora.

Medijan vremena do progresije bolesti u tumora MSI iznosi 20 mjeseci (raspon 2 – 60 mjeseci), a do smrtnog ishoda 14,5 mjeseci (raspon 1 – 31 mjeseca).

U tumora MSS medijan vremena proteklog do progresije bolesti je dvostruko niži nego u MSI i iznosi 10 mjeseci (raspon 2 – 41 mjeseca), dok je do nastupanja smrti medijan vremena veći i iznosi 23 mjeseca (raspon 1 – 55 mjeseci).

Log-Rank testom nije utvrđena statistički značajna razlika u preživljenju između MSI i MSS skupina raka želuca ( $\chi^2 = 0,090$ ,  $p = 0,765$ ).

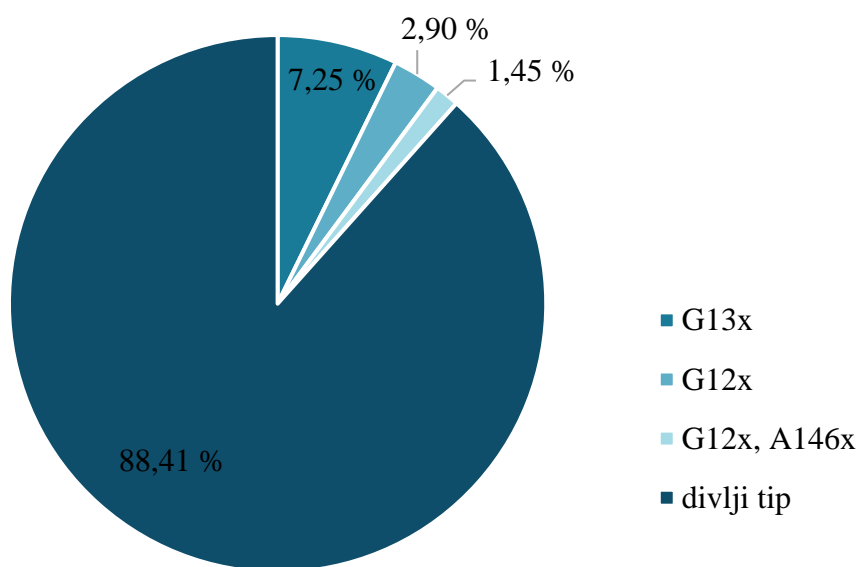
### 4.3. Mutacije gena *KRAS*

Metodom RT-PCR analizirana je prisutnost mutacija gena *KRAS* u 69 uzoraka raka želuca.

U osam uzoraka (11,6 %) raka želuca detektirane su mutacije u genu *KRAS*. U sedam uzoraka (10,1 %) detektirana je po jedna mutacija u genu *KRAS* dok su u jednom (1,4 %) uzorku pronađene dvije mutacije unutar istoga gena. U preostalim 61 (88,4 %) uzoraka nije pronađena niti jedna mutacija ovoga gena, što ih svrstava u divlji tip gena (engl. *wild type*, WT).

Svaki od osam uzoraka (11,6 %) imao je mutaciju u egzonu 2. U pet uzoraka (7,2 %) nastala promjena dovela je do mutacije na 13. kodonu (G13x – G13A/C/D/R/S/V), a u tri uzorka (4,3 %) na 12. kodonu (G12x – G12A/C/D/R/S/V). Dva su uzorka (2,9 %) imala samo tu mutaciju, a jedan uzorak (1,4 %) s već postojećom mutacijom G12x imao je mutaciju i na 146. kodonu egzona 4 (A146x – A146P/T/V).

Slika 11. prikazuje frekvenciju navedenih mutacija gena *KRAS*.



**Slika 11.** Frekvencija pojedinih mutacija gena *KRAS* u 69 uzoraka tkiva raka želuca.

Od osam uzoraka u kojima su detektirane mutacije gena *KRAS*, pet (62,5 %) ih se javilo u žena, a tri (37,5 %) u muškaraca. Prema tomu, udio prisutnosti *KRAS* mutacija po spolu je iznosio 17,2 % u žena i 7,5 % u muškaraca s rakom želuca. Pojavnost mutacija u genu *KRAS* u svim uzorcima kojima je određen *KRAS* status u žena iznosi 7,2 %, a u muškaraca 4,3 %.

U sedam od osam (87,5 %) pacijenata s mutacijom u genu *KRAS*, dijagnoza je postavljena između 60. i 80. godine života; tri (37,5 %) u osoba starosti 60 – 69 godina, a četiri (50,0 %) u osoba starosti 70 – 79 godina. Samo je u jednom (12,5 %) slučaju dijagnoza bila postavljena prije 50. godine života.

Četiri uzorka (50,0 %) klasificirana su kao umjereno diferencirani tumori u histološki gradus 2 (G2), a četiri (50,0 %) u gradus 3 (G3) kao slabo diferencirani tumori.

Kod uzoraka s mutacijom u genu *KRAS* nije bilo tumora koji su tek probili submukozu (T1) ili mišićni sloj (T2). U sedam od osam (87,5 %) uzoraka s mutiranim genom *KRAS* tumor je probio mišićni sloj i ušao u subserozu (T3), a u jednom (12,5 %) uzorku tumor je prošao i kroz serozu (T4).

Jedan (12,5 %) uzorak koji nosi mutaciju *KRAS* nije imao pozitivnih regionalnih limfnih čvorova (N0), tri (37,5 %) uzorka klasificirana su u skupinu N1, i po dva (25,0 %) u skupine N2 i N3.

S druge strane, samo je jedan (12,5 %) od tih uzoraka imao prisutne metastaze u udaljenim organima (M1), a u ostalih sedam (87,5 %) uzoraka udaljene metastaze nisu pronađene (M0).

Među uzorcima s mutiranim genom *KRAS*, u tri (37,5 %) nije bilo progresije, a u pet (62,5 %) slučajeva ishod je bio smrt.

Prikaz karakteristika ispitanih uzoraka raka želuca prema mutacijama koje posjeduju nalazi se u Tablicama 7 i 8. Za uzorke kojima je određen status gena *KRAS* provedena je i statistička analiza (Tablica 7) upotrebom Fisherovog egzaktnog dvostranog testa.

**Tablica 7.** Detaljan pregled karakteristika 69 uzoraka raka želuca s određenim statusom gena *KRAS* uz statističku analizu

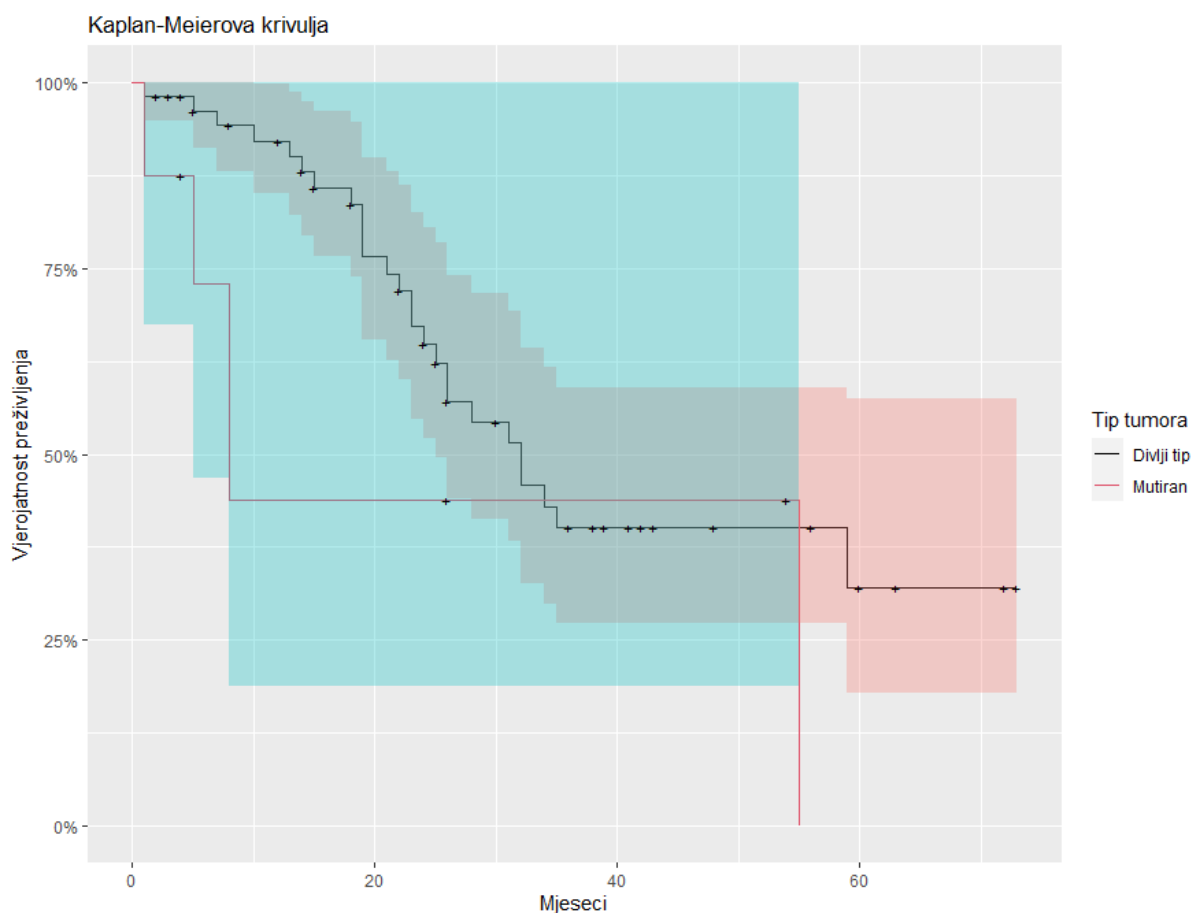
<b>Spol</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
muškarci	3	37	$p = 0,267^*$
žene	5	24	
<b>Dob</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
≤ 65	4	37	$p = 0,706^*$
> 65	4	24	
<b>Status MSI</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
MSI	3	19	$p = 0,703^*$
MSS	5	42	

Tablica 7. nastavak

<b>Gradus</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
G1/2	4	22	$p = 0,722^*$
G3/4	4	29	
<b>Dubina prodora tumora</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
T1/2	0	21	$p = 0,095^*$
T3/4	8	40	
<b>Metastaze u limfnim čvorovima</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
N0	1	11	$p = 1,000^*$
N1/2/3	7	49	
<b>Udaljene metastaze</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
M0	7	50	$p = 1,000^*$
M1	1	9	
<b>Ishod</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>	
bez progresije	3	18	$p = 0,476^*$
progresija	0	12	
smrt	5	26	

\*, Fisherov egzaktni dvostrani test

Kaplan-Meierova krivulja (Slika 12) pokazuje krivulju preživljenja bolesnika ovisno o prisutnim mutacijama u genu *KRAS* (mutiran ili divlji tip). Za pet (7,2 %) uzoraka ishod nije poznat i oni nisu uzeti u izračun. Vjerojatnost trogodišnjeg preživljenja iznosi 43,8 % u tumora s mutiranim genom *KRAS*, a u onih s divljim tipom 40,1 %. Za izračun vjerojatnosti petogodišnjeg preživljenja s tumorom koji nosi mutaciju nije bilo dovoljno podataka jer petogodišnje preživljenje nije dostignuto, dok za gen *KRAS* divljeg tipa vjerojatnost iznosi 32,1 %.



**Slika 12.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja 69 bolesnika s rakom želuca prema postojanju mutacija u genu *KRAS*.

Prosječno vrijeme proteklo do progresije bolesti je za divlji tip gena 17,4 mjeseca, dok u tumora s mutiranim genom *KRAS* nije bilo slučajeva progresije bolesti. U slučaju tumora divljim tipom gena prosječno vrijeme do smrti bilo je 22,3 mjeseca, dok su u slučaju tumora s mutacijom gena *KRAS* do smrti u prosjeku protekla 15,4 mjeseca.

Log-Rank testom nije utvrđena statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika ovisno o statusu somatskih mutacija gena *KRAS* ( $\chi^2 = 1,853, p = 0,173$ ).

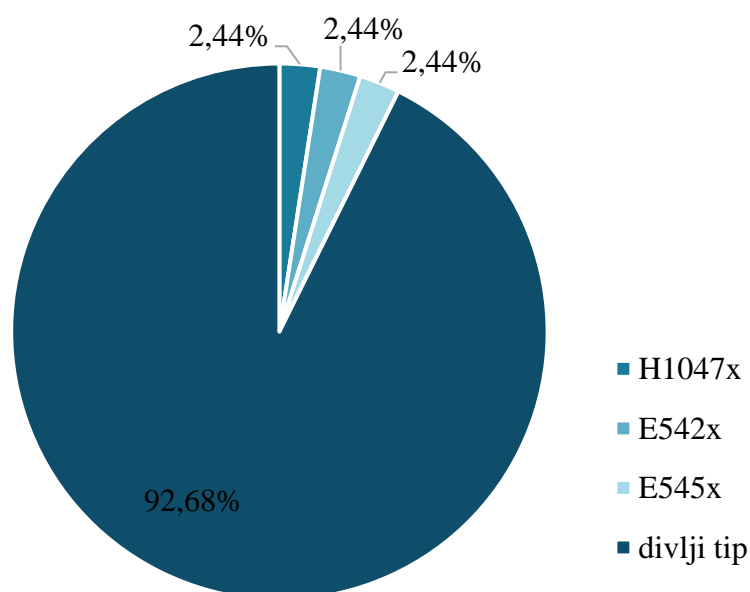
#### 4.4. Mutacije gena *PIK3CA*

Metodom RT-PCR analizirana je prisutnost mutacija gena *PIK3CA* u 41 uzorku raka želuca.

Mutacije u genu *PIK3CA* nisu određene u 28 (40,6 %) uzoraka, a od preostalih 41 mutacije su pronađene u tri (7,3 %) uzorka, dok 38 (92,7 %) uzoraka nema mutaciju u ovome genu i klasificira se kao divlji tip.

Dvije mutacije zabilježene su u egzonu 9, od kojih je jedna lokalizirana na 542. (E542K) kodonu, a druga na 545. (E545x – E545A/D/G/K) kodonu. Jedna mutacija dovela je do promjene na 1047. kodonu 20. egzona (H1047x – H1047L/R/Y).

Frekvencija navedenih mutacija gena *PIK3CA* prikazana je na Slici 13.



**Slika 13.** Frekvencija pojedinih mutacija gena *PIK3CA* u 41 uzorku tkiva raka želuca.

Od tri uzorka s *PIK3CA* mutacijom, dvije (66,7 %) su se javile u žena (E542x, E545x), a jedna (33,3 %) u muškarca (H1047x). Udio prisutnosti mutacija u genu *PIK3CA* prema spolu je stoga 11,8 % u žena i 4,2 % u muškaraca. Pojavnost mutacija u genu *PIK3CA* u svim uzorcima kojima je određen status *PIK3CA* u žena iznosi 4,9 %, a u muškaraca 2,4 %.

Dvije (66,7 %) od tri mutacije gena *PIK3CA* pronađene su u osoba između 60 i 69 godina starosti, a jedna (33,3 %) u osobe koja je imala između 50 i 59 godina.

Jedan od uzoraka (33,3 %) s mutacijom bio je umjereno diferenciran tumor i histološkog je gradusa 2 (G2), dok su preostala dva (66,7 %) slabo diferencirani tumori i histološkog gradusa 3 (G3).

Dva od tri uzorka (66,7 %) koji nose ovu mutaciju pripadaju T3 tumorima, koji su prodrli kroz mišićni sloj, a jedan (33,3 %) je probio i serozu te je klasificiran kao T4 tumor.

Dva uzorka (66,7 %) s *PIK3CA* mutacijom nisu imali pozitivnih limfnih čvorova (N0), dok treći (33,3 %) pripada skupini N3.

Niti jedan od ta tri uzorka nije imao prisutne metastaze u udaljenim organima (M0).

Dva od tri (66,7 %) raka želuca s mutacijom *PIK3CA* nisu progresirali, dok je jedan slučaj (33,3 %) završio smrću.

Za uzorke kojima je određen status gena *PIK3CA* dan je pregled distribucije, ali zbog malog broja uzoraka s prisutnom mutacijom nisam provela statističku analizu (Tablica 8).

**Tablica 8.** Detaljan pregled karakteristika 41 uzorka raka želuca s određenim statusom gena *PIK3CA*.

<b>Spol</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>
muškarci	1	23
žene	2	15
<b>Dob</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>
≤ 65	3	21
> 65	0	17
<b>Status MSI</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>
MSI	1	2
MSS	2	36
<b>Gradus</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>
G1/2	1	16
G3/4	2	17
<b>Dubina prodora tumora</b>	<b>Mutiran</b>	<b>Divlji tip</b>
T1/2	0	15
T3/4	3	23



Tablica 8. nastavak

Metastaze u limfnim čvorovima	Mutiran	Divlji tip
N0	2	3
N1/2/3	1	34
Udaljene metastaze	Mutiran	Divlji tip
M0	3	29
M1	0	7
Ishod	Mutiran	Divlji tip
bez progresije	2	10
progresija	0	8
smrt	1	16

#### 4.5. Povezanost MSI i mutacija gena *KRAS* i *PIK3CA* s karakteristikama raka želuca

Rezultati testiranja (Tablice 6 i 7) pokazuju da se nulta hipoteza o nezavisnosti mutacijskog statusa, kao i o nezavisnosti mikrosatelitske stabilnosti tumora, i svih kliničkih karakteristika ne može odbaciti. To jest, nije pronađena statistički značajna povezanost mutacijskog statusa tumora i kliničkih karakteristika, odnosno mikrosatelitske stabilnosti tumora i njegovih kliničkih karakteristika. Uzrok ovih rezultata može biti mali uzorak ispitanika (69 bolesnika) te mali uzorak tumora s mutacijama (10 uzoraka).

Budući da provedenom statističkom analizom nije utvrđena povezanost statusa MSI i prisutnosti mutacija gena *KRAS* i *PIK3CA* s karakteristikama agresivnijih tumora, poput gradusa i dubine prodora tumora te pozitivnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza, provedena je i Spearmanova analiza korelacija. Budući da za mutacije na genu *PIK3CA* u uzorku nije bilo udaljenih metastaza, Spearmanova analiza korelacija napravljena je samo za mutacije na genu *KRAS* i status MSI (Tablica 9).

Statistički značajna korelacija između MSI i spola ( $r_s = 0,065$ ,  $p = 0,598$ ) te dobi bolesnika ( $r_s = -0,049$ ,  $p = 0,690$ ) nije utvrđena. Slično tomu, nije utvrđena povezanost mutacijskog statusa gena *KRAS* sa spolom ( $r_s = 0,150$ ,  $p = 0,218$ ) ili dobi bolesnika ( $r_s = -0,091$ ,  $p = 0,457$ ).

Također, mutacije gena *PIK3CA* nisu pokazale značajnu korelaciju ni sa spolom ( $r_s = 0,144, p = 0,370$ ), ni s dobi bolesnika ( $r_s = 0,111, p = 0,490$ ).

Utvrđena je slaba korelacija između veličine tumora i mutacija u genu *KRAS* ( $r_s = -0,311, p = 0,010$ ). Srednja vrijednost najvećeg promjera tumora s mutiranim genom *KRAS* je  $77,1 \pm 25,0$  mm (medijan 70,0 mm), dok u tumora s divljim tipom gena srednja vrijednost iznosi  $51,5 \pm 23,9$  mm (medijan 50,0 mm).

Vrlo slaba korelacija utvrđena je i između statusa MSI i veličine tumora ( $r_s = -0,283, p = 0,020$ ). Srednja vrijednost najvećeg promjera tumora MSI je  $62,7 \pm 21,5$  mm (medijan 60,0 mm), a u tumora MSS srednja vrijednost iznosi  $50,9 \pm 26,2$  mm (medijan 45,0 mm).

U tumora s prisutnim mutacijama u genu *PIK3CA* statistički značajna povezanost s veličinom tumora nije utvrđena ( $r_s = -0,178, p = 0,273$ ).

Nema statistički značajne korelacije MSI te mutacija u genima *KRAS* i *PIK3CA* s kliničkim karakteristikama tumora poput gradusa i dubine prodora tumora, udaljenih metastaza i onih u limfnim čvorovima.

Gradus tumora ne pokazuje značajnu povezanost s MSI ( $r_s = 0,204, p = 0,122$ ), mutacijom gena *KRAS* ( $r_s = 0,051, p = 0,700$ ) niti mutacijom gena *PIK3CA* ( $r_s = -0,058, p = 0,737$ ).

Nije utvrđena niti korelacija dubine prodora tumora (pT) s ovim karakteristikama; MSI ( $r_s = -0,049, p = 0,687$ ), mutiranim genima *KRAS* ( $r_s = -0,195, p = 0,109$ ) i *PIK3CA* ( $r_s = -0,198, p = 0,215$ ).

Za povezanost postojanja pozitivnih limfnih čvorova (pN) i mutacija u genima *KRAS* ( $r_s = 0,008, p = 0,945$ ) i *PIK3CA* ( $r_s = 0,189, p = 0,243$ ) nije utvrđena povezanost, kao ni za status MSI ( $r_s = 0,202, p = 0,099$ ).

Udaljene metastaze nisu statistički značajno povezane s MSI ( $r_s = 0,143, p = 0,243$ ), mutacijama u genu *KRAS* ( $r_s = 0,047, p = 0,703$ ) niti mutacijama u genu *PIK3CA* ( $r_s = 0,149, p = 0,352$ ).

Broj pozitivnih limfnih čvorova nije značajno povezan s tumorima MSI ( $r_s = -0,189, p = 0,119$ ) ni mutacijama *KRAS* ( $r_s = 0,047, p = 0,703$ ). Ipak, statistički značajna, slaba korelacija utvrđena je između broja pozitivnih limfnih čvorova i mutacija gena *PIK3CA* ( $r_s = -0,468, p = 0,002$ ). Medijan broja pozitivnih limfnih čvorova u tumora s mutiranim genom *PIK3CA* iznosi 0 (raspon 0 – 14), a u tumora s genom divljeg tipa medijan iznosi 5 (raspon 0 – 31).

Korelacija MSI s ishodom liječenja nije utvrđena ( $r_s = 0,062$ ,  $p = 0,627$ ), a isti slučaj je i kod mutacija gena *KRAS* ( $r_s = 0,117$ ,  $p = 0,358$ ) i gena *PIK3CA* ( $r_s = 0,230$ ,  $p = 0,171$ ).

U Tablici 9 prikazana je vrlo slaba međusobna povezanost mutacija gena *PIK3CA* s MSI ( $r_s = 0,298$ ,  $p = 0,058$ ) i mutacijama *KRAS* ( $r_s = 0,281$ ,  $p = 0,075$ ).

**Tablica 9.** Spearmanova analiza korelacija kliničko-patoloških karakteristika raka želuca s mikrosatelitskom nestabilnošću i statusom mutacija u genu *KRAS* i *PIK3CA*.

Karakteristika		MSI	<i>KRAS</i>	<i>PIK3CA</i>
Spol	$r_s$	0,065	0,150	0,144
	$p$	0,598	0,218	0,370
Dob	$r_s$	-0,049	-0,091	0,111
	$p$	0,690	0,457	0,490
Veličina tumora	$r_s$	-0,283	-0,311	-0,178
	$p$	0,020	0,010	0,273
Gradus tumora	$r_s$	0,204	0,051	-0,058
	$p$	0,122	0,700	0,737
pT	$r_s$	-0,049	-0,195	-0,198
	$p$	0,687	0,109	0,215
pN	$r_s$	0,202	0,008	0,189
	$p$	0,099	0,945	0,243
M	$r_s$	0,143	0,047	0,149
	$p$	0,243	0,703	0,352
Broj pozitivnih limfnih čvorova	$r_s$	-0,189	0,047	-0,468
	$p$	0,119	0,703	0,002
Ishod liječenja	$r_s$	0,062	0,117	0,230
	$p$	0,627	0,358	0,171
MSI	$r_s$		0,066	0,298
	$p$		0,588	0,058
<i>KRAS</i>	$r_s$	0,066		0,281
	$p$	0,588		0,075
<i>PIK3CA</i>	$r_s$	0,298	0,281	
	$p$	0,058	0,075	

MSI, mikrosatelitska nestabilnost; pT, dubina prodora tumorskih stanica; pN, broj pozitivnih limfnih čvorova; M, prisutnost udaljenih metastaza;  $p$ , vrijednost statističke značajnosti testa;  $r_s$ , Spearmanov koeficijent korelacije.

## 5. RASPRAVA

Rak želuca 2020. je godine bio peti najčešći oblik raka te četvrti po smrtnosti u svijetu (Morgan i sur. 2022). Prema podacima Registra za rak, u Republici Hrvatskoj je 2020. godine u muškaraca rak želuca također bio peti najčešći oblik raka, dok je kod žena na devetom mjestu prema učestalosti (HZJZ, 2022).

Najčešće se javlja kod osoba starijih od 60 godina (HZJZ, 2022) što je u skladu s rezultatima ovoga istraživanja. Rak želuca češći je kod muškaraca nego žena. Podaci Registra za rak pokazuju da je 2020. godine 60,2 % novih slučajeva raka želuca zabilježeno kod muškaraca, a 39,8 % u žena. Ovi podaci potvrđuju se i u rezultatima ovog istraživanja gdje je od 69 analiziranih uzoraka raka želuca 58,0 % pripadalo muškarcima, a 42,0 % ženama.

Tumori MSI u ovom istraživanju čine 31,9 %, a tumori MSI-H 13,0 % ispitivanih uzoraka što je u skladu s rasponom 7,8 – 15,3 % utvrđenom u drugim istraživanjima (Polom 2018; Seo 2009; Pietrantonio i sur. 2019; Vos 2023).

Meta-analizom 48 studija Polom i sur. (2018) utvrdili su povezanost statusa MSI sa ženskim spolom, starijom dobi, manjim brojem pozitivnih limfnih čvorova i ukupno nižim stupnjem u klasifikaciji TNM. Suprotno, ovim istraživanjem nije utvrđena zavisnost statusa MSI i kliničkih karakteristika uznapredovalog raka želuca poput gradusa i dubine prodora tumora, metastaza u limfnim čvorovima i udaljenih metastaza što bi se moglo pripisati vrlo malom broju uzoraka na kojemu je istraživanje provedeno.

Utvrđena je vrlo slaba korelacija statusa MSI s veličinom tumora što znači da su s tipom MSI povezani tumori većeg promjera, no ova je korelacija dodatno nepouzdana zbog malog broja uzoraka tumora MSI. Razlog tomu moglo bi biti nakupljanje brojnih mutacija koje sadrže tumori MSI što ubrzava nastanak i razvoj zloćudnog tumora, kao i sama veličina tumora gdje veći broj stanica povećava vjerojatnost pojave novih mutacija. Također, istraživanje koje su proveli Seo i sur. (2009) utvrdilo je postojanje korelacije tumora MSI i njihove veličine.

Neka istraživanja utvrdila su niži rizik od smrti u osoba s MSI rakom želuca od onih s MSS tipom, i to za 28 – 44,7 % (Choi i sur. 2014; Polom i sur. 2018; Pietrantonio i sur. 2019), no u ovom istraživanju statistički značajna korelacija tumora MSI s preživljenjem nije utvrđena.

Razlog tomu mogla bi biti kategorizacija tumora MSI i MSS. U ovom su istraživanju tumori MSI-H i MSI-L svrstani zajedno kao MSI, dok su Pietrantonio i sur. (2019) te Polom i sur.

(2018) kao MSI izdvojili samo tumore MSI-H, a MSI-L i MSS zajedno su činili skupinu tumora MSS. Slično je i u istraživanju koje su proveli Choi i sur. (2014) gdje su skupine određene na isti način, a budući da se radi o meta-analizi, raspodjela skupina ovisila je i o dostupnosti i preciznosti podataka navedenim u originalnim istraživanjima.

Neka istraživanja (Pietrantonio i sur. 2019; Kim i sur. 2020) ukazuju na to da se bolji ishod liječenja tumora MSI-H postiže operativnim zahvatom te nastavno kemoterapijom ili imunoterapijom. Stoga se kao potencijalno učinkovita istražuje i imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka, poput inhibitora PD-1 kao što je pembrolizumab (Rodriquenz i sur. 2020). Najveća meta-analiza do sada (Nie i sur. 2022), koja je obuhvatila sedam studija, pokazala je da tumori MSI-H dobro reagiraju na kemoterapiju nakon operativnog zahvata, čime se značajno poboljšava preživljenje bolesnika te se ovaj oblik terapije preporučuje kao dio liječenja nakon operacije.

Novija istraživanja (Janković i sur. 2023) pokazuju da bi tumori MSI-H mogli biti pogodni i za kemoterapiju kombiniranu sa zračenjem, radi postizanja boljeg ishoda liječenja.

Mutacije gena *KRAS* u ovom su istraživanju identificirane u 11,6 % slučajeva raka želuca, što je iznad raspona 4,0 – 8,7 % iz nekoliko studija (Ghojzadeh i sur. 2022; Polom i sur. 2019; Takahashi i sur. 2014; Wang i sur. 2023). Prema velikom istraživanju Hewitt i sur. (2015) provedenom na 69 studija, medijan učestalosti mutacija *KRAS* iznosi 6,5 %, s rasponom 0 – 29 %, bez velike razlike između istočnih i zapadnih zemalja.

Budući da je u istraživanju detektiran relativno mali broj pojedinih točkastih mutacija, one se nisu kategorizirale zasebno prema kodonima koje pogađaju, već zajedno kao mutirani tip gena *KRAS*.

Provedenom statističkom analizom u ovom istraživanju nije utvrđena zavisnost mutacija u genu *KRAS* s kliničkim karakteristikama uznapredovalog stadija raka želuca poput gradusa tumora, dubine prodora tumora, metastaza u limfnim čvorovima te udaljenih metastaza. Jednake rezultate za gradus, dubinu prodora tumora, prisutnost pozitivnih limfnih čvorova te ukupno preživljenje utvrdila je i velika studija provedena u Europi i Aziji. Obuhvatila je tri kohortne studije iz Velike Britanije, Japana i Singapura, a među populacijama nije pronašla značajne razlike (van Grieken i sur. 2013). Niti studija koju su proveli Lee i sur. (2003) nije utvrdila povezanost mutacija *KRAS* i klasifikacije tumora TNM.

Kao ni u istraživanju Rehkaemper i sur. (2020), povezanost mutacija *KRAS* s dužim ili kraćim preživljenjem bolesnika od tumora s genom divljeg tipa nije utvrđena.

U ovom je istraživanju utvrđena slaba korelacija između mutiranog gena *KRAS* i veličine tumora, no ovaj rezultat sam po sebi nije dovoljan za zaključiti da su tumori s mutiranim genom *KRAS* manje ili više agresivni od onih s divljim tipom gena *KRAS*.

Moguće je da se mutacija na genu *KRAS* pojavila još u ranom stadiju, tijekom formiranja premaligne lezije ili adenoma, prije razvoja zloćudnog tumora. Naime, sve ispitivane mutacije *KRAS* su aktivacijske i aktiviraju RAS/RAF/MEK/ERK signalni put koji se smatra glavnim karcinogenim signalnim putem u oko 40 % slučajeva raka želuca (Riquelme i sur. 2015), a odgovoran je za regulaciju staničnog rasta i diferencijacije te preživljenja (Degirmenci i sur. 2020).

Uz to, *KRAS* sudjeluje i u PI3K/Akt/mTOR signalnom putu koji regulira preživljenje stanica u stresnim uvjetima, rast, metabolizam i stanični ciklus (Porta i sur. 2014). Aktivacija ovog signalnog puta potiče angiogenezu i metastaziranje te dovodi do inhibicije apoptoze što doprinosi zloćudnoj preobrazbi stanica (Matsuoka i Yashiro 2014).

Tako točkaste mutacije u genima RAS mogu potaknuti zloćudnu preobrazbu i često se smatraju ranim događajem u karcinogenezi (Degirmenci i sur. 2020). Ovu pretpostavku potvrđuju i istraživanja (Huang i sur. 2018; Raskov i sur. 2020) na karcinomima kolona koja pokazuju da su mutacije gena *KRAS* jedne od pokretačkih (engl. *driver*) mutacija, onih koje uzrokuju promjene koje će dovesti do zloćudne preobrazbe stanice.

Budući da mutacije gena superporodice RAS potiču pokretanje signalnih puteva RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/Akt/mTOR te se javljaju rano u karcinogenezi, moguće su uzrok većoj veličini tumora.

Mutacije gena *PIK3CA* su u ovom istraživanju identificirane u 7,3 % analiziranih uzoraka raka želuca, što se nalazi unutar raspona 4,3 – 10,6 % nekoliko studija (Li i sur. 2005; Takahashi i sur. 2014; Velho i sur. 2005; Ghojzadeh i sur. 2022).

Iako prema udjelu prisutnosti mutacija gena *PIK3CA* rezultati okvirno odgovaraju ostalim istraživanjima, mutacije su pronađene u samo tri uzorka od ukupno 41 stoga svaka daljnja statistička obrada podataka nije bila pouzdana. Analizu bi trebalo ponoviti na većem broju uzoraka kako bi rezultati bili vjerodostojniji.

Statističkom analizom nije utvrđena zavisnost mutacija u genu *PIK3CA* s kliničkim karakteristikama uznapredovalog stadija raka želuca poput gradusa tumora, dubine prodora tumora i udaljenih metastaza. Međutim, utvrđena je slaba korelacija mutacija gena *PIK3CA* i broja pozitivnih limfnih čvorova. To potvrđuje i istraživanje Lu i sur. (2015) u kojemu nije utvrđena značajna korelacija karakteristika uzoraka poput spola, dobi, gradusa tumora i dubine prodora s mutacijama u genu *PIK3CA*, osim kod broja pozitivnih limfnih čvorova. Naime, učestalost mutacija gena *PIK3CA* bila je veća u osoba kod kojih nisu postojale metastaze u limfnim čvorovima što bi moglo utjecati na povoljniju prognozu u pacijenata s jednom od ovih mutacija.

Kao i kod *KRAS*, sve identificirane mutacije gena *PIK3CA* su aktivacijske te aktiviraju signalni put PI3K/Akt/mTOR uključen u regulaciju mnogih staničnih procesa poput proliferacije, diferencijacije, preživljenja i migracije stanica (Riquelme i sur. 2015). Karcinogeni potencijal pretjerane aktivacije ovoga puta očituje se u pojačanoj angiogenezi, epitelno-mezenhimalnoj tranziciji, metastaziranju i inhibiciji apoptoze (Matsuoka i Yashiro 2014).

Mutacije *PIK3CA* najčešće su u EBV molekularnom podtipu raka želuca gdje njihova učestalost iznosi 40 – 80 % (Danishevich i sur. 2023), no u ovom istraživanju nije bilo dostupnih podataka za status EBV. Međutim, istraživanja (Lee i sur. 2004; Sohn i sur. 2017) su pokazala da se EBV podtip povezuje s manjim brojem pozitivnih limfnih čvorova, povoljnijom prognozom i većim petogodišnjim preživljenjem. Stoga je moguće da se u uzorcima u kojima je identificirana *PIK3CA* mutacija istovremeno radi i o EBV pozitivnom raku želuca, no ovu bi mogućnost trebalo ispitati u daljnjim istraživanjima.

Iako je utvrđena vrlo slaba međusobna povezanost mutacija gena *PIK3CA* s tumorima MSI i prisustvom mutacija *KRAS*, taj rezultat nije pouzdan. Od osam uzoraka kojima je detektirana mutacija *KRAS*, samo je u tri uzorka određen status i mutacija gena *PIK3CA*. Također, od 22 uzorka tumora MSI, samo je u tri određen status *PIK3CA*. Rezultat bi bio precizniji kada bi se istraživanje provelo na većem broju uzoraka.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju ispitivan je učinak mikrosatelitske nestabilnosti te somatskih točkastih mutacija gena *KRAS* i *PIK3CA* na progresiju raka želuca kod ljudi te iz dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između statusa MSI te mutacija u genu *KRAS* i kliničkih karakteristika poput dobi, spola, gradusa tumora, dubine prodora tumora te pozitivnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza koje bi mogle ukazivati na pojačanu agresivnost tumora.
2. Utvrđena je vrlo slaba korelacija statusa MSI i slaba korelacija prisutnosti mutacija *KRAS* s veličinom tumora. Razlog tomu moglo bi biti nakupljanje brojnih mutacija koje čine tumore MSI, a koje će brže dovesti do nastanka i razvoja zloćudnog tumora, kao i veličina tumora gdje veći broj stanica povećava vjerojatnost nastanka novih mutacija, odnosno aktivacija gena *KRAS* te signalnih puteva RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/Akt/mTOR vrlo rano u karcinogenezi.
3. Statistički značajna povezanost mutacija u genu *PIK3CA* i kliničkih karakteristika poput dobi, spola, gradusa tumora, dubine prodora tumora i udaljenih metastaza nije utvrđena.
4. Utvrđena je slaba korelacija prisutnosti mutacija *PIK3CA* i broja pozitivnih limfnih čvorova.
5. Rak želuca je složena, heterogena bolest koju pogađaju mnoge somatske mutacije, ali s niskom učestalošću što statističku obradu podataka čini otežanom. Stoga bi istraživanje trebalo ponoviti na više uzoraka kako bi rezultati bili vjerodostojni.



## 7. LITERATURA

Ajani, J. A., Lee, J., Sano, T., Janjigian, Y. Y., Fan, D., Song, S. (2017). Gastric adenocarcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17036.

Arnold, M., Morgan, E., Bardot, A., Rutherford, M. J., Ferlay, J., Little, A., Møller, B., Bucher, O., De, P., Woods, R. R., Saint-Jacques, N., Gavin, A. T., Engholm, G., Achiam, M. P., Porter, G., Walsh, P. M., Vernon, S., Kozie, S., Ramanakumar, A. V., Lynch, C., Harrison, S., Merrett, N., O'Connell, D. L., Mala, T., Elwood, M., Zalcberg, J., Huws, D. W., Ransom, D., Bray, F., Soerjomataram, I. (2022). International variation in oesophageal and gastric cancer survival 2012-2014: differences by histological subtype and stage at diagnosis (an ICBP SURVMARK-2 population-based study). *Gut*, 71(8), 1532–1543.

Baghery Saghchy Khorasani, A., Pourbagheri-Sigaroodi, A., Pirsalehi, A., Safaroghli-Azar, A., Zali, M. R., Bashash, D. (2021). The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gastric cancer; from oncogenic variations to the possibilities for pharmacologic interventions. *European Journal of Pharmacology*, 898, 173983.

Busuttil, R. A., Zapparoli, G. V., Haupt, S., Fennell, C., Wong, S. Q., Pang, J. M. B., Takeno, E. A., Mitchell, C., Di Costanzo, N., Fox, S., Haupt, Y., Dobrovic, A., Boussioutas, A. (2014). Role of p53 in the progression of gastric cancer. *Oncotarget*, 5(23), 12016–12026.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.

Camargo, M. C., Kim, W. H., Chiaravalli, A. M., Kim, K. M., Corvalan, A. H., Matsuo, K., Yu, J., Sung, J. J., Herrera-Goepfert, R., Meneses-Gonzalez, F., Kijima, Y., Natsugoe, S., Liao, L. M., Lissowska, J., Kim, S., Hu, N., Gonzalez, C. A., Yatabe, Y., Koriyama, C., Hewitt, S. M., Akiba, S., Gulley, M. L., Taylor, P. R., Rabkin, C. S. (2014). Improved survival of gastric cancer with tumour EpsteinBarr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut*, 63(2), 236–243.

Chia, N. Y., Tan, P. (2016). Molecular classification of gastric cancer. *Annals of Oncology*, 27, 763–769.

- Choi, Y. Y., Bae, J. M., An, J. Y., Kwon, I. G., Cho, I., Shin, H. B., Eiji, T., Aburahmah, M., Kim, H. I., Cheong, J. H., Hyung, W. J., Noh, S. H. (2014). Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *Journal of surgical oncology*, 110(2), 129–135.
- Danishevich, A. M., Posphehova, N. I., Stroganova, A. M., Golovina, D. A., Nikulin, M. P., Kalinin, A. E., Nikolaev, S. E., Stilidi, I. S., Lyubchenko, L. N. (2023). Landscape of *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* Mutations and Clinical Features of EBV-Associated and Microsatellite Unstable Gastric Cancer. *Molecular Biology*, 57, 61–73.
- Degirmenci, U., Wang, M., Hu, J. (2020). Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, 9(1), 128.
- D'Elia, L., Galletti, F., Strazzullo, P. (2014) Dietary salt intake and risk of gastric cancer. *Cancer treatment and research*, 159, 83–95.
- Deng, W., Jin, L., Zhuo, H., Vasiliou, V., Zhang, Y. (2021). Alcohol consumption and risk of stomach cancer: A meta-analysis. *Chemico-Biological Interactions*, 336, 109365.
- Derks, S., Liao, X., Chiaravalli, A. M., Xu, X., Camargo, M. C., Solcia, E., Sessa, F., Fleitas, T., Freeman, G. J., Rodig, S. J., Rabkin, C. S., Bass, A. J. (2016). Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget*, 7(22), 32925–32932.
- Ebrahimi, V., Soleimanian, A., Ebrahimi, T., Azargun, R., Yazdani, P., Eyvazi, S., Tarhriz, V. (2020). Epigenetic modifications in gastric cancer: Focus on DNA methylation. *Gene*, 742, 144577.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F. (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.who.int/today> (pristupljeno 2. kolovoza 2024)
- Garattini, S., K., Basile, D., Cattaneo, M., Fanotto, V., Ongaro, E., Bonotto, M., Negri, F. V., Berenato, R., Ermacora, P., Cardellino, G. G., Giovannoni, M., Pella, N., Scartozzi, M., Antonuzzo, L., Silvestris, N., Fasola, G., Aprile, G. (2017). Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(5), 194–208.

- Ghojzadeh, M., Somi, M. H., Naseri, A., Salehi-Pourmehr, H., Hassannezhad, S., Hajikamanaj Olia, A., Kafshdouz, L., & Nikniaz, Z. (2022). Systematic Review and Meta-analysis of TP53, HER2/ERBB2, KRAS, APC, and PIK3CA Genes Expression Pattern in Gastric Cancer. *Middle East journal of digestive diseases*, 14(3), 335–345.
- Gigek, C. O., Chen, E. S., Calcagno, D. Q., Wisnieski, F., Burbano, R. R., Smith, M. A. (2012). Epigenetic mechanisms in gastric cancer. *Epigenomics*, 4(3), 279–294.
- Hatta, W., Koike, T., Asano, N., Hatayama, Y., Ogata, Y., Saito, M., Jin, X., Uno, K., Imatani, A., Masamune, A. (2024). The Impact of Tobacco Smoking and Alcohol Consumption on the Development of Gastric Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 7854.
- Hewitt, L. C., Hutchins, G. G., Melotte, V., Saito, Y., Grabsch, H. I. (2015). KRAS, BRAF and gastric cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 4(6), 429–447.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. (2022). *Incidencija raka u Hrvatskoj 2020.*, Bilten 45, Zagreb.
- Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y., Zhang, H. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), 173–187.
- Huang, L., Guo, Z., Wang, F., Fu, L. (2021). KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 386.
- Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M., Yoshiyama, H. (2012). Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses*, 4(12), 3420–3439.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (2024). IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans, 1–136.
- Janković, S., Ramić, S., Kelava, T., Misir, Z., Kirac, I., Glavčić, G., Filipović-Čugura, J. (2023). Microsatellite instability-high gastric cancer patients may benefit from adjuvant radiotherapy. *Libri Oncologici*, 51(2-3), 71-75.
- Jia, Y., Sun, H., Wu, H., Zhang, H., Zhang, X., Xiao, D., Ma, X., Wang, Y. (2016). Nicotine Inhibits Cisplatin-Induced Apoptosis via Regulating alpha5-nAChR/AKT Signaling in Human Gastric Cancer Cells. *PLoS ONE*, 11, e0149120.

<https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications> (pristupljeno 7. kolovoza 2024.)

Kang, W., To, K. F. (2015). Are Epstein-Barr virus-positive and-negative gastric carcinomas, with lymphoid stroma, single entity or different entities? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(10), 1745–1747.

Kim, H. J., Lee, H. N., Jeong, M. S., Jang, S. B. (2021). Oncogenic KRAS: Signaling and Drug Resistance. *Cancers*, 13, 5599.

Kim, J. W., Lee, H. S., Nam, K. H., Ahn, S., Kim, J. W., Ahn, S. H., Park, D. J., Kim, H. H., Lee, K. W. (2017). PIK3CA mutations are associated with increased tumor aggressiveness and Akt activation in gastric cancer. *Oncotarget*, 8(53), 90948–90958.

Kim, J. W., Cho, S. Y., Chae, J., Kim, J. W., Kim, T. Y., Lee, K. W., Oh, D. Y., Bang, Y. J., Im, S. A. (2020). Adjuvant Chemotherapy in Microsatellite Instability-High Gastric Cancer. *Cancer research and treatment*, 52(4), 1178–1187.

Ko, K. (2024) Risk Factors of Gastric Cancer and Lifestyle Modification for Prevention. *Journal of Gastric Cancer*, 24(1), 99–107.

Laurén, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 64, 31–49.

Lee, S. H., Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, H. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Lee, J. H., Park, J. Y., Cho, Y. G., Kim, C. J., Nam, S. W., Kim, S. H., Lee, J. Y., Yoo, N. J. (2003). BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene*, 22(44), 6942–6945.

Lee, H. S., Chang, M. S., Yang, H. K., Lee, B. L., Kim, W. H. (2004). Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Carcinoma Has a Distinct Protein Expression Profile in Comparison with Epstein-Barr Virus-Negative Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(5), 1698–1705.

Lei, Z., Teng, Q., Tian, Q., Chen, W., Xie, Y., Wu, K., Zeng, Q., Zeng, L., Pan, Y., Chen, Z., He, Y. (2022). Signaling pathways and therapeutic interventions in gastric cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–38.

Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell International*, 20, 16.

- Li, V. S. W., Wong, C. W., Chan, T. L., Chan, A. S., Zhao, W., Chu, K. M., So, S., Chen, X., Yuen, S. T., Leung, S. Y. (2005). Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma. *BMC cancer*, 5, 29.
- Lu, W., Wei, H., Li, M., Wang, H., Liu, L., Zhang, Q., Liu, L., Lu, S. (2015). Identification of KRAS and PIK3CA but not BRAF mutations in patients with gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12, 1219-1224.
- Ma, J., Shen, H., Kapesa, L., Zeng, S. (2016). Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). *Oncology letters*, 11, 2959–2964.
- Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., Sitarz, R. (2020). Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4012.
- Maleki, S. S., Röcken, C. (2017). Chromosomal Instability in Gastric Cancer Biology. *Neoplasia*, 19(5), 412–420.
- Matsumoto, K., Arao, T., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Kato, K., Oda, I., Taniguchi, H., Koizumi, F., Yanagihara, K., Sasaki, H., Nishio, K., Yamada, Y. (2012). FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 106, 727–732.
- Matsuoka, T., Yashiro, M. (2014). The role of PI3K/Akt/mTOR signaling in gastric carcinoma. *Cancers*, 6, 1441–1463.
- Mescher, A. L. (2016). Digestive Tract. U: *Junqueira's Basic Histology 14e*. McGraw-Hill Education/Medical, str. 295–329.
- Morgan, E., Arnold, M., Camargo, M. C., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H. A., Vignat, J., Laversanne, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I. (2022). The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *eClinicalMedicine*, 47, 101404.
- Nemtsova, M. V., Kuznetsova, E. B., Bure, I. V. (2023). Chromosomal Instability in Gastric Cancer: Role in Tumor Development, Progression, and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 16961.
- Nie, R. C., Chen, G. M., Yuan, S. Q., Kim, J. W., Zhou, J., Nie, M., Feng, C. Y., Chen, Y. B., Chen, S., Zhou, Z. W., Wang, Y., Li, Y. F. (2022). Adjuvant Chemotherapy for Gastric

Cancer Patients with Mismatch Repair Deficiency or Microsatellite Instability: Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Surgical Oncology*, 29(4), 2324–2331.

Nobili, S., Bruno, L., Landini, I., Napoli, C., Bechi, P., Tonelli, F., Rubio, C. A., Mini, E., Nesi, G. (2011). Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 17(3), 290–299.

Pietrantonio, F., Miceli, R., Raimondi, A., Kim, Y. W., Kang, W. K., Langley, R. E., Choi, Y. Y., Kim, K. M., Nankivell, M. G., Morano, F., Wotherspoon, A., Valeri, N., Kook, M. C., An, J. Y., Grabsch, H. I., Fucà, G., Noh, S. H., Sohn, T. S., Kim, S., Di Bartolomeo, M., Cunningham, D., Lee, J., Cheong J. H., Smyth, E. C. (2019). Individual Patient Data Meta-Analysis of the Value of Microsatellite Instability As a Biomarker in Gastric Cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(35), 3392–3400.

Polom, K., Marano, L., Marrelli, D., De Luca, R., Roviello, G., Savelli, V., Tan, P., Roviello, F. (2018). Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer, *British Journal of Surgery*, 105(3), 159–167.

Polom, K., Das, K., Marrelli, D., Roviello, G., Pascale, V., Voglino, C., Rho, H., Tan, P., Roviello, F. (2019). KRAS Mutation in Gastric Cancer and Prognostication Associated with Microsatellite Instability Status. *Pathology & Oncology Research*, 25, 333–340.

Porta, C., Paglino, C., Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 64.

Prior, I. A., Hood, F. E., Hartley, J. L. (2020). The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Research*, 80(14), 2969–2974.

Puliga, E., Corso, S., Pietrantonio, F., Giordano, S. (2021). Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. *Cancer Treatment Reviews*, 95, 102175.

Puneet, Kazmi, H. R., Kumari, S., Tiwari, S., Khanna, A., Gopeshwar, N. (2018). Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers. *Pathology & Oncology Research*, 24, 757–770.

Pužar Dominkuš, P., Hudler, P. (2023) Mutational Signatures in Gastric Cancer and Their Clinical Implications. *Cancers*, 15, 3788.

- Raskov, H., Søby, J. H., Troelsen, J., Bojesen, R. D., Gögenur, I. (2020). Driver Gene Mutations and Epigenetics in Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*, 271(1), 75–85.
- Ratti, M., Lampis, A., Hahne, J. C., Passalacqua, R., Valeri, N. (2018). Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 4151–4162.
- Rehkaemper, J., Korenkov, M., Quaas, A., Rueschoff, J., Pamuk, A., Zander, T., Hillmer, A. M., Buettner, R., Hoelscher, A. H., Bruns, C. J., Loeser, H., Alakus, H., Schoemig-Markiefka, B. (2020). Amplification of KRAS and its heterogeneity in non-Asian gastric adenocarcinomas. *BMC cancer*, 20(1), 587.
- Reyes, V. E. (2023). *Helicobacter pylori* and Its Role in Gastric Cancer. *Microorganisms*, 11, 1312.
- Riquelme, I., Saavedra, K., Espinoza, J. A., Weber, H., García, P., Nervi, B., Garrido, M., Corvalán, A. H., Roa, J. C., Bizama, C. (2015). Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget*, 6(28), 24750–24779.
- Rodriquenz, M. G., Roviello, G., D'Angelo, A., Lavacchi, D., Roviello, F., Polom, K. (2020). MSI and EBV Positive Gastric Cancer's Subgroups and Their Link with Novel Immunotherapy. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1427.
- Rota, M., Possenti, I., Valsassina, V., Santucci, C., Bagnardi, V., Corrao, G., Bosetti, C., Specchia, C., Gallus, S., Lugo, A. (2024). Dose–response association between cigarette smoking and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Gastric Cancer*, 27, 197–209.
- Schaal, C., Chellappan, S. P. (2014) Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Molecular Cancer Research*, 12, 14–23.
- Seo, H. M., Chang, Y. S., Joo, S. H., Kim, Y. W., Park, Y. K., Hong, S. W., & Lee, S. H. (2009). Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *Journal of surgical oncology*, 99(3), 143–147.
- Sheffels, E., Kortum, R. L. (2021). The Role of Wild-Type RAS in Oncogenic RAS Transformation. *Genes*, 12, 662.
- Silk, A. D., Zasadil, L. M., Holland, A. J., Vitre, B., Cleveland, D. W., Weaver, B. A. (2013). Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress

tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(44), E4134–E4141.

Sohn, B. H., Hwang, J. E., Jang, H. J., Lee, H. S., Oh, S. C., Shim, J. J., Lee, K. W., Kim, E. H., Yim, S. Y., Lee, S. H., Cheong, J. H., Jeong, W., Cho, J. Y., Kim, J., Chae, J., Lee, J., Kang, W. K., Kim, S., Noh, S. H., Ajani, J. A., Lee, J. S. (2017). Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clinical Cancer Research*, 23(15), 4441–4449.

Song, Y., Wu, F., & Wu, J. (2016). Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives. *Journal of hematology & oncology*, 9(1), 49.

Tahara, T., Arisawa, T. (2015). DNA Methylation as a Molecular Biomarker in Gastric Cancer. *Epigenomics*, 7(3), 475–486.

Takahashi, N., Yamada, Y., Taniguchi, H., Fukahori, M., Sasaki, Y., Shoji, H., Honma, Y., Iwasa, S., Takashima, A., Kato, K., Hamaguchi, T., Shimada, Y. (2014). Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer. *BMC Research Notes*, 7, 271.

Tavakoli, A., Monavari, S. H., Solaymani Mohammadi, F., Kiani, S. J., Armat, S., Farahmand, M. (2020). Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 20(1).

The Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513, 202–209.

Timar, J., Kashofer, K. (2020) Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39, 1029–1038.

Ullah, R., Yin, Q., Snell, A. H., Wan, L. (2022). RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 85, 123–154.

van Grieken, N. C., Aoyama, T., Chambers, P. A., Bottomley, D., Ward, L. C., Inam, I., Buffart, T. E., Das, K., Lim, T., Pang, B., Zhang, S. L., Tan, I. B., Carvalho, B., Heideman, D. A., Miyagi, Y., Kameda, Y., Arai, T., Meijer, G. A., Tsuburaya, A., Tan, P., Yoshikawa, T., Grabsch, H. I. (2013). KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch



repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *British journal of cancer*, 108(7), 1495–1501

Vargas-Rondón, N., Villegas, V. E., Rondón-Lagos, M. (2018). The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers*, 10(1), 4.

Velho, S., Oliveira, C., Ferreira, A., Ferreira, A. C., Suriano, G., Schwartz, S. Jr., Duval, A., Carneiro, F., Machado, J. C., Hamelin, R., Seruca, R. (2005). The prevalence of *PIK3CA* mutations in gastric and colon cancer. *European Journal of Cancer*, 41(11), 1649–1654.

Vos, E. L., Maron, S. B., Krell, R. W., Nakauchi, M., Fiasconaro, M., Capanu, M., Walch, H. S., Chatila, W. K., Schultz, N., Ilson, D. H., Janjigian, Y. Y., Ku, G. Y., Yoon, S. S., Coit, D. G., Vanderbilt, C. M., Tang, L. H., Strong, V. E. (2023). Survival of Locally Advanced MSI-high Gastric Cancer Patients Treated With Perioperative Chemotherapy: A Retrospective Cohort Study. *Annals of Surgery*, 277(5), 798–805.

Wang, H.-B., Liao, X.-F., Zhang, J. (2017). Clinicopathological factors associated with HER2-positive gastric cancer. A meta-analysis. *Medicine*, 96(44), e8437.

Wang, L., Saeedi, B. J., Mahdi, Z., Krasinskas, A., & Robinson, B. (2023). Analysis of KRAS Mutations in Gastrointestinal Tract Adenocarcinomas Reveals Site-Specific Mutational Signatures. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 36(2), 100014.

Wang, Q., Liu, G., Hu, C. (2019) Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Research*, 12(6), 275–282.

Xie, G., Si, Q., Zhang, G., Fan, Y., Li, Q., Leng, P., Qiao, F., Liang, S., Yu, R., Wang, Y. (2024) The role of imprinting genes' loss of imprints in cancers and their clinical implications. *Frontiers in Oncology*, 14, 1365474.

Yang, Q., Chen, Y., Guo, R., Dai, Y., Tang, L., Zhao, Y., Wu, X., Li, M., Du, F., Shen, J., Yi, T., Xiao, Z., Wen, Q. (2022). Interaction of ncRNA and Epigenetic Modifications in Gastric Cancer Focus on Histone Modification. *Frontiers in Oncology*, 11, 822745.

Yeoh, K. G., Tan, P. (2022). Mapping the Genomic Diaspora of Gastric Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 22, 71–84.

Zhang, X., Li, M., Chen, S., Hu, J., Guo, Q., Liu, R., Zheng, H., Jin, Z., Yuan, Y., Xi, Y., Hua, B. (2018). Endoscopic Screening in Asian Countries Associates With Reduced Gastric Cancer Mortality: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Gastroenterology*, 155(2), 347–354.

Zuo, Q., Yan, R., Feng, D., Zhao, R., Chen, C., Jiang, Y., Cruz-Correa, M., Casson, A. G., Kang, X., Han, F., Chen, T. (2011). Loss of imprinting and abnormal expression of the insulin-like growth factor 2 gene in gastric cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 50(5), 390–396.

# ŽIVOTOPIS

Iva Crnjac rođena je u Zagrebu 24. srpnja 1997. godine. Nakon završene osnovne škole Nikole Hribara u Velikoj Gorici, pohađa XV. gimnaziju u Zagrebu. Potom upisuje preddiplomski studij Biologije i kemije u Splitu, a po završetku i diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, u Zagrebu.