Personalizirani pristup liječenja karcinoma jajnika: Obrada i analiza uzoraka

Ćurković, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:014971

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Iva Ćurković

Personalizirani pristup liječenja karcinoma jajnika: Obrada i analiza uzoraka

Završni rad

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Iva Ćurković

Personalized approach to ovarian cancer treatment: Sample processing and analysis

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Split, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Personalizirani pristup liječenja karcinoma jajnika:
Obrada i analiza uzoraka

Iva Ćurković, 311249:

Sažetak

Cilj: Cilj ovog rada je prikazati molekularno testiranja gena BRCA1 i BRCA2 kod pacijentica oboljelih od raka jajnika radi detekcije patogenih mutacija u svrhu primjene ciljane terapije u njihovu liječenju

Materijal i metode: Materijal koji se koristi za analizu može biti krv ili tumorsko tkivo operiranih pacijentica. Opisani su postupci izolacije DNA, mjerenja koncentracije DNA te sekvenciranja uz pomoć komercijalno dostupnih kitova.

Rezultati: Rezultati koji se dobiju sekvenciranjem obrađuju se softwerski i u konačnici se dobije izvještaj koji detaljno prikazuje sve detektirane mutacije u uzorku pacijentice. Dobivene mutacije se selektiraju prema njihovoj patogenosti .

Zaključak: Molekularno testiranja gena BRCA1 i BRCA2 odnosno detekcija mutacija kod pacijentica s rakom jajnika važno je radi određivanja točne ciljane terapije. Da bi se utvrdila prisutnost mutacija potrebno je iz uzorka krvi ili iz tumorskog tkiva pacijentice izolirati DNA , a potom sekvencirati. Pacijentice kod kojih je utvrđena prisutnost patogenih mutacija u BRCA1 i BRCA2 kandidati su za ciljanu terapiju PARP inhibitorima.

Ključne riječi: rak jajnika**;** BRCA1**;** BRCA2**;** PARP inhibitori**;** personalizirano liječenje

Rad sadrži: 33 stranica, 2 tablica, 14 slika i 25 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 21.srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

University Department of Health Studies

Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health

Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Personalized approach to ovarian cancer treatment:

Sample processing and analysis

Iva Ćurković, 311249:

Summary

Objectives: The aim of this paper is to present molecular testing of the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with ovarian cancer in order to detect pathogenic mutations for the purpose of applying targeted therapy in their treatment.

Material and methods: The material used for analysis can be blood or tumor tissue of operated patients. Procedures for DNA isolation, measurement of DNA concentration and sequencing with the help of commercially available kits are described.

Results: The results obtained by sequencing are processed by software and ultimately a report is obtained that shows in detail all detected mutations in the patient's sample. The obtained mutations are selected according to their pathogenicity**.**

Conclusion: Molecular testing of the BRCA1 and BRCA2 genes, i.e. detection of mutations in patients with ovarian cancer, is important in order to determine the correct targeted therapy. In order to determine the presence of mutations, it is necessary to isolate DNA from a blood sample or from the patient's tumor tissue, and then sequence it. Patients with the presence of pathogenic mutations in BRCA1 and BRCA2 are candidates for targeted therapy with PARP inhibitors.

Key words: ovarian cancer**;** BRCA1**;** BRCA2**;** PARP inhibitors**;** personalized medicine

Thesis contains: 33 pages, 2 tables, 14 figures and 25 references

Original in: Croatian

Defense comittee:

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

Defense date: July 21st, 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD ……..1

1.1. Tumor ……...1

1.2. Jajnik ……....3

1.2.1. Karcinom jajnika ……...4

1.3. Personalizirano liječenje raka jajnika …….....…6

1.3.1. BRCA1 i BRCA2 geni ……...…...7

1.3.2. PARP inhibitori …….....8

1.4. Sekvenciranje ……...…10

1.4.1. Sekvenciranje prve generacije…….….10

1.4.2. Sekvenciranje novih generacija ……...11

2. CILJ RADA ……..…12

3. MATERIJAL I METODE …….…… 13

3.1. Materijal ……..…… 13

3.2. Metode …… 14

3.2.1. Izolacija DNA …….. 14

3.2.2. Određivanje koncentracije DNA ……. 15

3.2.3. Sekvenciranje ……....17

4. REZULTATI ……20

5. RASPRAVA ……..21

6. ZAKLJUČAK ……...22

7. LITERATURA ……..23

8. ŽIVOTOPIS ……25

1. UVOD

1.1. Tumor

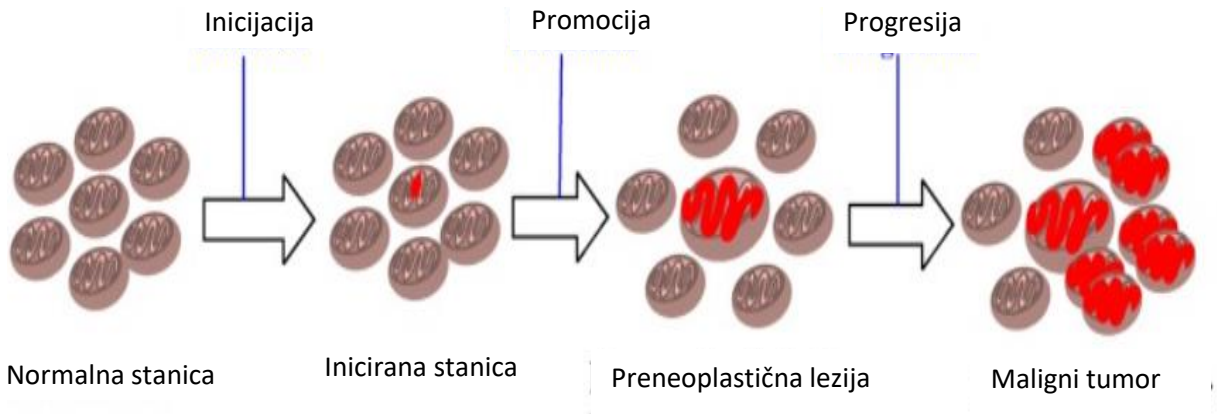
Pojam tumor predstavlja abnormalnu nakupinu stanica koja može biti ili maligna ili benigna. U normalnim se uvjetima u tijelu u svakom trenutku odvija dioba kako bi se stanice dijelile i rasle. Tijekom tih procesa razvitka i diobe mogu se dogoditi greške koje stanice ne uspije ispraviti što za posljedicu ima mutacije. Mutirane stanice ne odumiru, nego se i dalje dijele te stvaraju abnormalne nakupine, odnosno tumore. (1)

Metastaziranje je prijenos tumorskih stanica iz primarnog tumora u druga, udaljena područja organizma. Stanice metastaze imaju ista obilježja, i morfološka i fiziološka, kao i primarni tumor. Metastaza označuje tumor zloćudnog porijekla, što znači da pacijenti s metastazama imaju lošiju prognozu te ograničene mogućnosti liječenja. (1)

Razvoj malignog tumora (karcinogeneza) odvija se kroz četiri stadija :

a) Inicijacija
b) Promocija
c) Progresija
d) Metastaziranje

Procesom transformacije se normalne, zdrave stanice razvijaju u stanice raka. Sam proces je posljedica oštećenja gena (protoonkogena i tumor supresor gena) koji pod svojom kontrolom imaju procese stanične proliferacije, diferencijacije te preživljavanja. Inicijacija je prvi korak procesa transformacije koji upućuje stanicu da postane kancerogena, što izaziva tvar kancerogen. Kancerogen može biti zračenje, kemikalije ili virus. Sljedeći korak procesa je promocija, odnosno razvijanje. Promocija nema učinak na stanice koje nisu prošle kroz prvi korak, korak inicijacije, s obzirom da u ovom koraku, konkretno, stanica postaje kancerogena. Korak progresije podrazumijeva rast primarnog tumora, nakon čega slijedi stadij metastaziranja (Slika 1). (2)



Slika 1. Proces karcinogeneze

Izvor: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29570697/

Protoonkogeni su geni koji kodiraju proteine koji sudjeluju u kontroli proliferacije, diferencijacije te samog preživljenja stanice. Mutacijom protoonkogena nastaju onkogeni, tj. geni koji uzrokuju transformaciju normalnih u tumorske stanice na način da mijenjaju normalne signale, čime se gubi kontrola rasta i proliferacije te se stanice počinju nekontrolirano dijeliti. Onkoproteini su proteini koje kodiraju onkogeni i oni uzrokuju nekontrolirani rast tumorske stanice. (3)

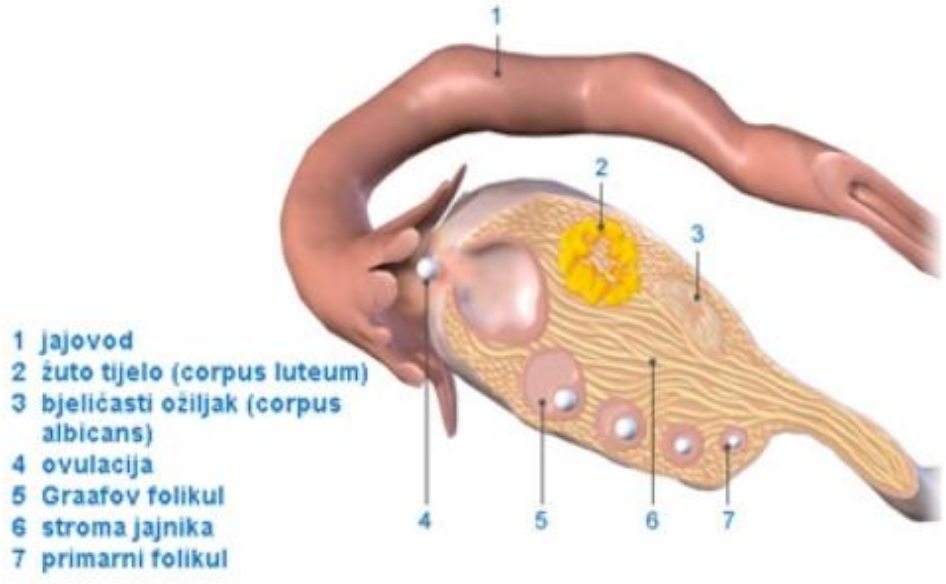
Tumor supresorski geni su geni neophodni za proliferaciju, odnosno kontrolu proliferacije stanica i aktivaciju apoptoze. Ulogu imaju u povezivanju signala oštećene DNA te aktivaciju popravka DNA. Inaktivacija tumor supresor gena je često povezana s inicijacijom te razvojem tumora. Popravak DNA je ključan za preživljavanje normalnih, zdravih stanica, ali isto tako i tumorskih stanica. Homologna rekombinacija (engl. *HR, homologus recombination*) je glavni put popravka dvolančanih lomova DNA. Osim homologne rekombinacije važno je spomenuti i klasično nehomologno povezivanje krajeva (engl. *Cnhej, classical nonhomologus end-joining*). (4)

Proteini koji su kodirani tumor supresorskim genima imaju za zadaću inhibiciju stanične proliferacije i preživljenja, a samim time i razvitak tumora. (3)

1.2. Jajnik

Jajnik *(*lat. *ovarium)* je parni parenhimatozni organ, smješten peritonealno te se nalazi u jami *(*lat. *fossa ovarica)* uz bočnu stijenku male zdjelice. Po svojoj funkciji je spolna žlijezda, prekrivena tunikom serozom, u kojoj se razvijaju ženske spolne stanice i stvaraju ženski spolni hromoni.(5)

Jajnik je prekriven zametnim, kubičnim epitelom ispod kojeg se nalazi čvrsta vezivna čahura *(*lat. *tunica albuginea).* Po građi se sastoji od kore *(*lat. *cortex ovarii)* koja sadrži folikule te srži *(*lat. *medulla ovarii)* koja se nalazi u središtu jajnika Slika 2. (5)



Slika 2. Slika jajnika

Izvor: https://www.cybermed.hr/centri_a_z/rak_jajnika/jajnik_i_jajovod

1.2.1. Karcinom jajnika

Karcinom jajnika je najsmrtonosniji oblik maligniteta u ginekologiji. Dijagnosticira se kod žena u svim životnim dobima, ali se ipak najčešće dijagnosticira kod žena u dobi od 55 do 64 godine života. Oko 90% karcinoma jajnika spadaju u skupinu raka jajnika epitelnih stanica, koji se najčešće otkrivaju kod žena u postmenopauzi. Najvažniji prognostički faktor jest rana dijagnoza dok je tumor još malen te se nije proširio na okolne strukture. (6)

Više od polovine dijagnosticiranih zloćudnih novotvorina jajnika smatraju se odgovornim za isti broj slučajeva smrti uzrokovanih tumorima porijeklom iz ženskog spolnog sustava. Uzrok se može pronaći u činjenici da se zloćudne novotvorine ne dijagnosticiraju u ranoj fazi te se samim time ni na vrijeme ne može započeti liječenje. Oko 80% novotvorina jajnika se ubraja u dobroćudne novotvorine koje se najčešće pojavljuju kod osoba u dobi između 20. do 45. godine života. Za razliku od dobroćudnih, zloćudne se novotvorine pretežno pojavljuju kod žena čija je životna dob u rasponu od 45 do 60 godina.

Histogenetski se novotvorine jajnika mogu svrstati u tri skupine:

a) Epitelno-stromalne novotvorine pokrovnog epitela
b) Novotvorine specijalizirane strome jajnika
c) Tumori spolnih stanica

Osim prethodno navedenih, u jajniku se mogu nalaziti i metastaze drugih organa.(7)

Tumori epitelne površine jajnika (*engl. epithelial ovarian cancers, EOC*) se mogu podijeliti u četiri histološka podtipa, a to su: serozni, mucinozni, endometrioidni te svjetlostanični (*engl. clear cell*). Proučavanje i dijagnostika tumora epitelne površine jajnika, iz molekularne i genetske perspektive, su doveli do novih saznanja, a samim time i novog načina klasifikacije tih tumora. Taj novi model klasifikacije dijeli tumore epitelne površine jajnika na dva tipa: Tip 1 i Tip 2. Tip 1 uključuje karcinom niskog gradusa (*engl. low grade serous cancer*), mucinozni te svjetlostanični tip karcinoma jajnika. Tumori koji po klasifikaciji spadaju u Tip 1 imaju dobru prognozu glede liječenja karcinoma. Za razliku od Tipa 1, tumori Tipa 2 su puno agresivniji tumori koji se brzo razvijaju te za sobom povlače lošiju prognozu. Najdominantiji podtip u klasifikaciji je karcinom jajnika visokog gradusa (*engl. high-grade serous ovarian cancer, HGSOC*) koji uzrokuje oko 70-80%

smrti. Određeni broj slučajeva je povezan s genetikom, odnosno s nasljednim mutacijama gena BRCA1 i BRCA2. (8)

Cilj liječenja karcinoma jajnika je uklanjanje tumorske mase tako da ona bude jednaka nuli. (9) U liječenju karcinoma jajnika primjenjuju se različite metode: kirurški zahvat, radioterapija, kemoterapija te ciljana terapija. Kirurško je liječenje prvi izbor liječenja zbog procjene stanja pacijenta te stadija bolesti. Pristup liječenju karcinoma jajnika uključuje kombinaciju operativnog zahvata te kemoterapije. (10)

Za razliku od tradicionalnog pristupa, laparaskopija se pokazala boljom opcijom s obizrom da se pacijentice prije vrate u svakodnevnicu, minimalan je rizik od postoperativnih komplikacija te znatno manji boravak u bolnici. Odabir kirurškog pristupa ovisi o zdravstvenom stanju pacijentice te njenoj dobi.

Standardni pristup liječenja kemoterapijom nakon kirurškog zahvata uključuje kemoterapiju na bazi platine i taksana. Preporuča se da kemoterapija započne nedugo nakon kirurškog zahvata, otprilike 2 do 4 tjedna. Istraživanja su pokazala da je duže vremensko odlaganje povezano s gorim ishodima liječenja, odnosno bolesti. (11)

Kemoterapija, koja ne djeluje selektivno, se uvelike razlikuje od ciljane terapije koja djeluje precizno te sprječava promjene na tumorskim stanicama koje uzrokuju rast, diobu te naposljetku širenje tumora (Tablica 1).

Tablica 1. Mehanizmi djelovanja ciljane terapije

Djelovanje na imunološki sustav	Imunoterapija
Zaustavljanje rada tumorske stanice	Tumorske stanice mijenjaju određene proteine kako bi došli u stanje konstantne diobe bez signala koji je inače potreban za pokretanje procesa diobe. Ciljani lijekovi interferiraju s određenim promijenjenim proteinima te se na taj način prekida put koji je potreban da se stanica potakne na diobu.
Zaustavljanje angiogeneze	Tumorsko se tkivo brže razvija i raste od normalnog tkiva te mu je potrebna veća krvna opskrba što za posljedicu ima kontiuirano stvaranje krvnih žila odnosno angiogenezu. Ciljani lijekovi za zadatak imaju zaustavljanje stvaranja

	novih krvnih žila oko tumora, čime je onemogućen daljnji rast i razvitak tumorskog tkiva.
Doprema citotoksičnih supstanci u tumor	Određeni ciljani lijekovi se mogu kombinirati s toksinima, citostaticima ili zračenjem. Kada se ciljani lijek veže za tumorksu stanicu, stanica preuzima citotoksičnu supstancu te odumire, a okolne zdrave stanice ostaju netaknute.
Uzrokovanje stanične smrti	Tumorske se stanice odupiru procesu odumiranja, koji je potreban kada je stanica ili oštećena ili više nije potrebna, Postoji terapija, odnosno ciljani lijekovi koji vraćaju te stanice u normalno stanje te proces odumiranja.
Sprječavanje utjecaja hormona	Hormonska terapija

1.3. Personalizirano liječenje raka jajnika

Personalizirano liječenje donijelo je veliki napredak u liječenju karcinoma. S obzirom da postoje razni tipovi tumora koji se razlikuju na samoj molekularnoj razini te je omogućeno da se svakom tipu tumora pristupa na jedinstven način. Važnost personaliziranog liječenja predstavlja i činjenica da se uvodi u rutinu kliničke prakse ciljanih terapija koje imaju povećanu učinkovitost i/ili smanjenu toksičnost.(12)

Lijek dolazi točno do tumorske stanice te nema djelovanja ostale, zdrave stanice organizma. Korišteni lijekovi u ciljanoj terapiji su lijekovi malih molekula odnosno monoklonalna protutijela. Govoreći o ciljanoj terapiji, misli se o visoko selektivnoj terapiji koja zahtijeva da se krv ili tumorsko tkivo pacijenta tkivo testira i utvrdi status određenih biomarkera.(13)

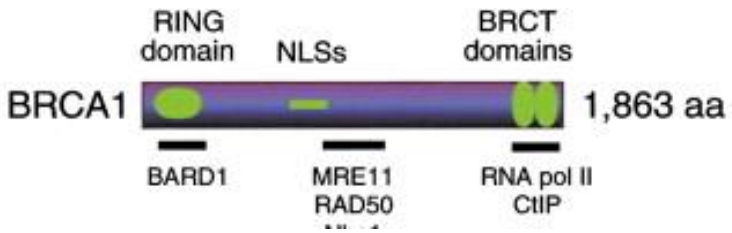
Za primjenu ciljane terapije potrebno je provoditi molekularno testiranje. Oko 5-10% karcinoma jajnika povezano je s mutacijama gena BRCA1 i/ili BRCA2 U slučaju mutacija gena BRCA1 i BRCA2, to jest postojanja patogenih mutacija izbor za ciljanu terapiju su PARP inhibitori. (14)

1.3.1. BRCA1 I BRCA2 geni

Glavna funkcija gena BRCA1 i BRCA2 jest popravak loma dvolančane DNA homolognom rekombinacijom. Mutacije u ovim genima povezane su s defektima popravka DNA te genomskom nestabilnosti i osobe s ovim mutacijama imaju predispoziciju za nasljednu sklonosti obolijevanja od raka jajnika. Žene kod kojih postoji mutacija u genu BRCA1 ili BRCA2 imaju vjerojatnost 11-62% za nastanak raka janika do 70. godine života. U normalnim zdravim stanicama BRCA1 i BRCA2 geni sudjeluju u procesima popravka oštećenja DNA, dok u stanicama tumora, kod osoba koje su nositelji mutacija, BRCA1 i BRCA2 su nefunkcionalni geni. Kod osoba koje naslijede mutaciju jednog ili oba BRCA gena narušava se normalna funkcija gena i povećan je rizik od obolijevanja od raka jajnika ili raka dojke. Takvi su tumori izrazito osjetljivi na agense koji uzrokuju oštećenje DNA i na PARP inhibitore. (14)

Studije su pokazale da pacijentice kod kojih je pronađena mutacija BRCA2 gena imaju bolju stopu preživljenja te odgovor na terapiju. Za razliku od BRCA2 gena, pacijentice kod kojih je pronađena samo mutacija BRCA1 gena nemaju toliko dobar odgovor na terapiju, a samim time pada stopa preživljenja. (15)

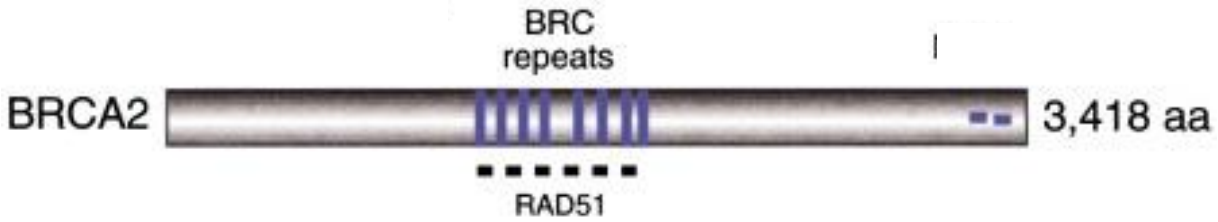
BRCA1 gen nalazi se na 17. kromosomu. Sastoji se od 24 kodirajuća egzona i kodira za protein od 1863 aminokiseline. BRCA1 veže se s različitim proteinima uključenima u napredovanje staničnog ciklusa, regulaciju genske transkripcije, odgovoru na oštećenje molekule DNA i ubikvitinaciju.. C-kraj BRCA1 gena sadrži BRCT domenu zaduženu za olakšano vezanje fosfoproteina. N-kraj BRCA1 gena sadrži RING domenu, koja ima aktivnost E3 ubikvitin ligaze. BRCA1 stvara vezu te djeluje s genom PALB2 (*engl. partner and localizer of BRCA"*) preko domene na C-kraju gena BRCA1 (Slika 3).(15)



Slika 3. BRCA1 gen

Izvor: https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674%2802%2900615-3

BRCA2 gen nalazi se na kromosomu 13q12.3, sadrži 27 kodirajućih egzona i kodira za protein koji se sastoji od 3418 aminokiseline. Sadrži BRC ponavljanja koja su uglavnom uključena u proces vezanja gena BRCA2 te monomernog RAD51. C-kraj BRCA2 gen se također veže za RAD51 radi stabilizacije te fosforilacije određenih elemenata (Slika 4). (15)



Slika 4. BRCA 2 gen

Izvor: https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674%2802%2900615-3

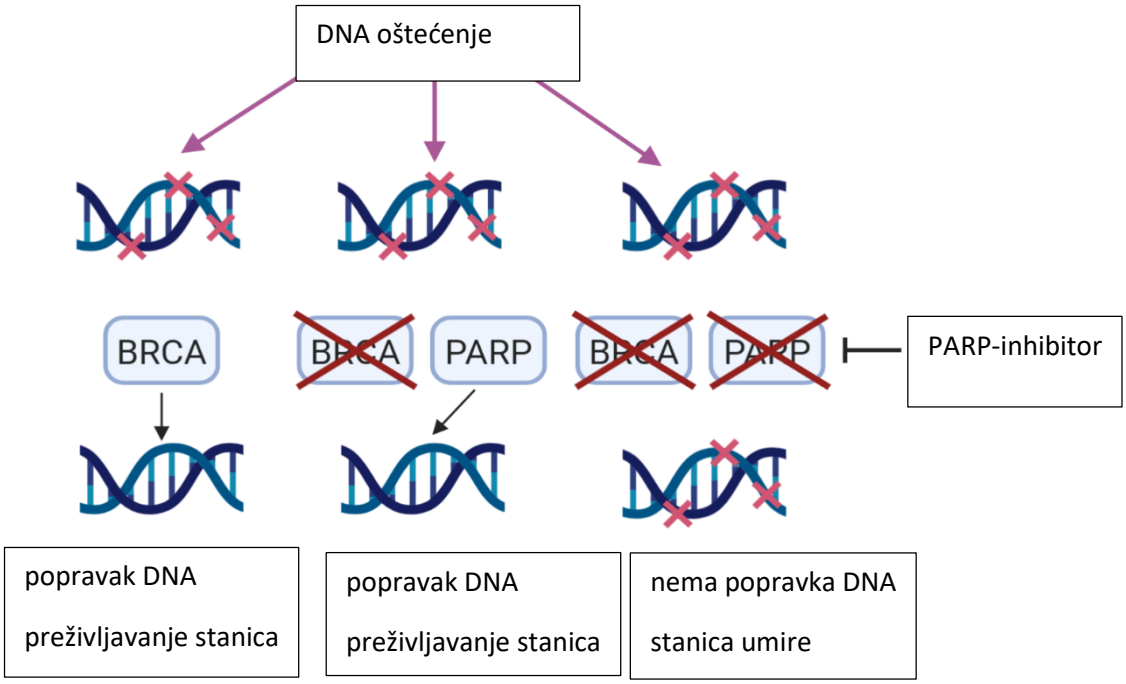
1.3.2. PARP inhibitori

Najnovija su se istraživanja lijeka za rak jajnika fokusirala na ciljane terapije, ciljane lijekove, koji su novi te obećavajući terapeutski pristupi s obzirom da maskimalno djeluju na tumorsko tkivo, a minimalno su toksični za okolne, zdrave stanice.

Postoji nekoliko lijekova koji se mogu koristiti kao ciljana terapija, a da ciljaju točno putove popravka DNA izrezivanjem jedne baze (*engl. base excision repair, BER*). Kod karcinoma jajnika najviše su korišteni PARP inhibitori koji su trenutačno najbolji izbor te su najviše istraženi. (16)

PARP inhibitori su specifični za defekte popravka DNA, poput BRCA mutacija, a podrazumijevaju inhibiciju poli(adenozin difosfat riboza)polimeraza enzima, PARP enzima. Naziv PARP je naziv za enzimski kompleks koji je jedan od 17 enzimskih kompleksa u natporodici PARP, a PARP1 i PARP2 predstavljaju najbolje okarakterizirane podtipove.

Inhibicijom PARP enzima blokira se put popravka izrezivanjem jedne baze. Normalne, zdrave stanice mogu koristiti alternativni put popravka, homolognu rekombinaciju, ali kod stanica koje posjeduju mutaciju BRCA gena to nije slučaj. Te stanice pogođene mutacijom su jako osjetljive na PARP inhibitore. Kombinacijom odsutnosti aktivnosti enzima PARP, PARP inhibitorima te nemogućnost popravka DNA homolognom rekombinacijom zbog nedostatka funkcije BRCA1 i BRCA2 gena, dolazi do apoptoze odnosno zaustavljanja staničnog ciklusa (Slika5). (16, 17)



Slika 5. Djelovanje PARP inhibitora

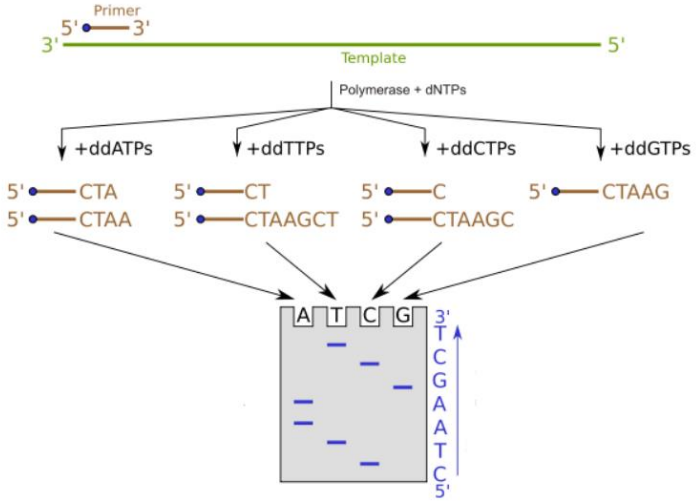
Izvor: https://blogs.ed.ac.uk/institute-genetics-cancer/2019/11/25/cellular-responses-to-dna-damage-mechanistic-insights-and-clinical-applications/

1.4. Sekvenciranje

Prvu generaciju sekvenciranja obuhvaćaju sekvenciranje po Sangeru (sekvenciranje sintezom) i Maxam-Gilbertovo sekvenciranje, odnosno sekvenciranje cijepanjem. Sangerovo sekvenciranje je pružilo temelje za razvoj tehnologije sekvenciranja nove generacije (druge, treće i četvrte generacije). Sangerovo je sekvenciranje prvotno omogućilo određivanje sekvencija različitih genoma, samim time i sekvenciranje ljudskog genoma. (18)

1.4.1. Sekvenciranje prve generacije

Sekvenciranje DNA jest postupak određivanje redoslijeda nukleotida u molekuli DNA. Metoda sekvenciranja prve generacije, poznatija kao Sangerova metoda *(engl. Sanger's method, dideoxy sequencing)*, rabi DNA uzorak, početnicu za sekvenciranje, DNA, polimerazu, nukleotide (dNTPs), dideoksinukleotide (ddNTPs) te reakcijski pufer. Metoda se odvija na način da se postavljaju četiri zasebne reakcije sa radioaktivnim obilježenim nukleotidima te dideoksinukleotidima. Enzim DNA polimeraza u svakom koraku produživanja lanca DNA dodaje ddNTP ili dNTPs. Vezanjem dNTPs (A, T, G ili C) za 3'-kraj DNA lanca biva produljen, a vezanjem ddNTP-a (ddA, ddT, ddG ili ddC) produljenje lanca se zaustavlja (Slika 6).(18)



Slika 6. Sanger sekvenciranje

Izvor: https://www.differencebetween.com/difference-between-sanger-sequencing-and-vs-pyrosequencing/

1.4.2. Sekvenciranje novih generacija

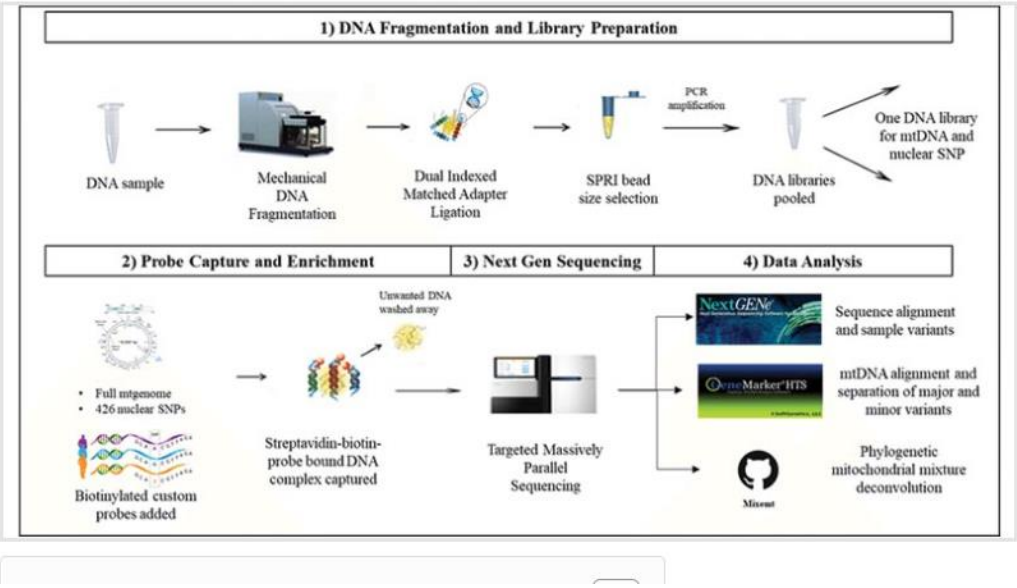
Razvoj druge generacije sekvencera je donio poboljšanja, odnosno uklonjeni su nedostaci prve generacije. Osnovne značajke i prednosti tehnologije sekvenciranja druge generacije su :

a) Paralelno čitanje više milijuna odsječaka
b) Veća brzina postupka
c) Niski troškovi
d) Izravno prepoznavanje ili dokazivanje izlazne sekvencije bez upotrebe elektroforeze

Sve NGS tehnologije sastoje se od slijedećih koraka:

a) Priprema knjižice DNA (stvaranje ili kreiranje zbirke fragmenata za sekvenciranje)
b) Imobilizacija fragmenata knjižice na solidnu potporu
c) Umnožavanje fragmenata
d) Masovno paralelno sekvenciranje fragmenata
e) Računalno postavljanje sekvencije (18)

Većina se metoda sekvenciranja druge generacije temelji na tehnici sekvenciranja sintezom (*engl. sequencing by synthesis*). Koriste se modificirani dNTP-ovi koji sadrže termininatora koji blokira daljnju polimerizaciju, a sadrži fluorescentne markere koji se detektiraju pomoću kamere (Slika7).(19)



Slika 7. Sekvenciranje novije generacije

Izvor: https://microbenotes.com/next-generation-sequencing-ngs/

2. CILJ

Cilj ovog rada je prikazati molekularno testiranja gena BRCA1 i BRCA2 kod pacijentica oboljelih od raka jajnika radi detekcije patogenih mutacija u svrhu primjene ciljane terapije u njihovu liječenju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Testiraju se sve bolesnice sa seroznim karcinomom jajnika, jajovoda ili peritoneuma visokog gradusa, neovisno o obiteljskom opterećenju, radi primjene ciljanog liječenja.

Uzorci koji se koriste za BRCA testiranje:

- uzorak krvi (detekcija germline mutacija)



- parafinski blok s tumorskim tkivom (detekcija germline i somatskih mutacija)



3.2. METODE

3.2.1. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA postoji nekoliko metoda koje uključuju razaranje stanične membrane kao i jezgrine membrane, uklanjanje proteina i ostalih nečistoća te za kraj pročišćavanje i otapanje dobivene genomske DNA.

Za izolaciju DNA iz krvi se koriste komercijalno dostupni kitovi. Jedan od njih je *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) (Slika8).



Slika 8. Kit za izolaciju DNA

Izvor https://lifescience.roche.com/global_en/brands/high-pure.html

U postupku izolacije se u tubici za mikrocentrifugu dodaje uzorak krvi, pufer te Proteinaza K što tvori lizat koji se mora inkubirati, centrifugirati te proći kroz proces ispiranja. Na samom kraju ispiranja u lizat se dodaje pufer za otapanje (engl. *Ellution Buffer*) te se DNA nakon inkubacije i centrifugiranja može kratkoročno pohraniti na -4^{o}C ili dugoročno na -20^{o}C. (21)

Za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin koristi se *cobas DNA Sample Preparation Kit* (Roche) (Slika9).



Slika 9. Kit za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin

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

Postupak izolacije uključuje uklanjanje parafina iz reza debljine 5 mikrometara, lizu stanica te odstranjivanje poprečnih veza na DNA, uzrokovanih fiksacijom, djelovanjem proteinaze K. Dodavanjem izopropanola i centrifugiranjem DNA se veže za dno kolone. Proteini te ostale nečistoće su uklone centrifugiranjem, a koncentracija genomske DNA se može izmjeriti fluorimetrijskom metodom. (22)

3.2.2. Određivanje koncentracije DNA

Za određivanje koncentracije DNA se koristi jedan od također komercijalno dostupnih kitova *Qubit™ dsDNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) (Slika 10).



Slika 10.Qubit™ dsDNA Assay Kit

Izvor: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32854

Uređaj koji se koristi za mjerenje koncentracije je Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Koristi se za mjerenje koncentracije DNA, RNA te proteina a temelji se na fluorimetriji (Slika 11).



Slika 11. Qubit® 3.0 Fluorometer

Izvor: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/cn/en/Q33216

Za sam postupak određivanja koncentracije DNA u otopini nepoznate koncentracije, potrebno je prethodno kalibrirati uređaj standardnim otopinama koje su već dostupne u dobivenom kitu. Radna se otopina priprema na način da se u omjeru 1:200 Qubit® dsDNA HS Reagent otopi u Qubit® dsDNA HS Buffer. Radi se s dva standarda tako da se u dvije odvojene tubice dodaje po 10 µL standarda 1 i 2 te u obje tubice po 190 µL radne otopine (engl. *Qubit® working solution*). Kalibracija uređaja (*Qubit® 3.0 Fluorometer*) (Slika 11) se provodi mjerenjem koncentracija prethodno napravljenih otopina standarda. Za mjerenje koncentracije u uzorku, odnosno otopini nepoznate koncentracije DNA, koriste se mali volumeni uzorka, svega od 1 do 20 µL, s tim da se prema volumenu uzorka prilagođava i volumen radne otopine (od 180 do 199 µL). (23)

3.2.3. Sekvenciranje

Za sekvenciranje uzoraka koristi se komercijalni kit TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit i TruSeq Custom Amplicon Index Kit (Illumina, Inc) (Slika 12).(24)



Slika 12. Kit za sekvenciranje

Izvor:https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-custom-dna-panel.html

Pripremanje biblioteke uzoraka za sekvenciranje radi se u nekoliko koraka prema protokolu proizvođača:

1. Kvantifikacija i razrijeđenje DNA

Izolati moraju imati zadovoljavajuću koncentraciju DNA,stoga ih treba kvantificirati. Dobivene koncentracije se podešavaju i razrijeđuju do koncentracije od 20-50 ng/ul,, ponovno kvantificiraju te još jedanput razrijeđuju i kvantificiraju do željene krajnje koncentracije 4-10 ng.

2. Umnožavanje ciljane DNA

Pomiješa se 5xAmpliSeq HiFi miks sa točno određenim volumenom i dodai vodu do konačnog volumena od 18 ul. Nacijepi se 8ul master mix u dvije jažice (za svaki uzorak) na PCR pločiciu U prvu kolonu dodati 2 ul 5xAmpliSeq BRCA panel 1, a u drugu kolonu dodati 2ul 5xAmpliSeq BRCA panel 2. PCR pločica se postavi u PCR instrument i pokrene AMP program u PCR instrumentu.

3. Djelomična digestija amplikona (razgradnja produkta amplifikacije)

Za svaki uzorak prebaciti 10 ul amplifikacijskog produkta iz jažice dva u jažicu jedan, tako da ukupni volumen u jažici jedan iznosi 20 ul.Dodati 2 ul FuPa reagensa u svaku jažicu odnosno prvu kolonu. .PCR pločicu postaviti u PCR uređaj te pokrenuti program FUPA.

4. Vezivanje indeksa

Dodaju se ineksi kako bi svaki uzorak imao jedinstvenu indeks kombinaciju za sekvenciranje.. Nakon dodavanja potrebnih reagensa PCR pločica se postavi u PCR uređaj i pokrene LIGATE program.

5. Čišćenje knjižnice

Koristi se AMPure XP beads koji veže biblioteku i 70% alkohol za čišćenje. U svaku jažicu dodaje se 30 ul AMPur XP beads, vorteksira kako bi smjesa bila homogena. PCR plčicu stavi se na magnetski stalak i pričeka dok se smjesa ne razbistri te se odbacimo supernatant, a biblioteka je vezana na „beads“ uz stijenku jažice. Zatim se ispire dva puta sa 70% alkoholom. Odstrani se preostali etanol dok je pločica na magnetskom stalku i ostavi se sušiti na zraku (zaostali EtOH može inhibirati amplifikaciju).

6. Umnožavanje biblioteke

U ovom drugom amplifikacijskom koraku umnožava se biblioteku kako bi osigurala dovoljna količinu uzorka za sekvenciranje. U svaku jažicu se doda 50ul master miksa (1x Lib Amp Mix 45ul + 10x Library Amp Primers) ,a zatim se PCR pločica postavi u PCR uređaj i pokrene program AMP_7.

7. Drugo čišćenje

Koristeći AMPure XP beads i 70% EtOH izvodi se drugo čišćenje bibloteke. U ovom koraku visokomolekularna DNA je uhvaćena za zrnca i bit će odbačena, a željena umnožena biblioteka je u supernatantu koji se prebaci u novu PCR pločicu i doda AMPur XP beads. Stavi se na magnetsku ploču dok se smjesa ne razbistri i odstrani supernatant. Biblioteka se ispire dva put sa 70% EtOH. Doda se zatim 30ul Low TE i prebaci se 27ul supernatanta koji sadrži umnoženu biblioteku u novu PCR pločicu.

8. Kvalitativna i kvantitativna provjera biblioteke

Amplificirana i pročišćenu biblioteku kvantificira se i nacijepi na 4% agarozni gel kako bi se vizualizirali dobiveni produkt.

9. Razrijeđenje biblioteke do startne koncentracije za sekvenciranje

Koristeći molaritet izračunati volumen biblioteke i Low TE potreban za razrjeđenje biblioteke do konačne startne koncentracije 1,3pM.

10. Nacjepljivanje ploče za sekvenciranje

Nakon denaturacije i razrijeđenja pomiješati 500 ul biblioteke i 5 ul PhiX kontrole te ih nacijepiti na predhodno otopljenu ploču sa reagensima.

Sekvenciranje uzoraka provodi se na platformi MiniSeqTM System (Illumina) (Slika 13).



Slika 13. MiniSeqTM System (Illumina)

Izvor: https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miniseq.html

4. REZULTATI

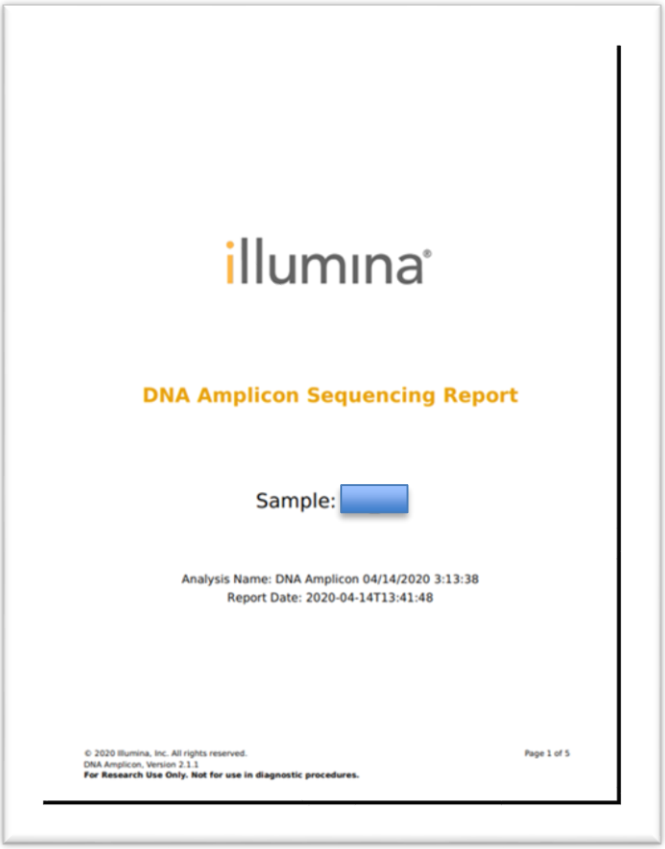
Rezultati analize se dobiju nakon što se podaci dobiveni sekvenciranjem obrade i interpretiraju bioinformatičkim programskim paketima.

Detektirane mutacije razvrstavaju se prema vrsti mutacija i njihovom kliničkom značenju (Tablica 2).

Tablica 2. Vrste mutacija i njihovo kliničko značenje

Vrste mutacija	tip	vjerojatnost patogenosti
Definitivno patogene	5	> 99
Vrlo vjerojatno patogene	4	0,95 - 0,99
Mutacije neodređenog značaja	3	0,05 – 0,949
Vrlo vjerojatno benigne	2	0,001 – 0,049
Benigne	1	< 0,001

Detaljni opis rezultata svakog pojedinačnog uzorka prikazuje se u obliku izvještaja u kojem su specificirane sve detektirane mutacije (Slika 14).


illumina

DNA Amplicon Sequencing Report

Sample:

Analysis Name: DNA Amplicon 04/14/2020 3:13:38
Report Date: 2020-04-14T13:41:48

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.
DNA Amplicon, Version 2.1.1
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Sample Information

Sample ID	Total PF Reads	Percent Q30 Bases	Percent On-target Aligned Reads	Autosome Call Rate
[redacted]	5,564,888	86.74%	96.44%	99.96%

Amplicon Summary

Manifest	Number of Amplicon Regions	Total Length of Target Regions
BRCA.dna_manifest.20180509.txt	265	22,404 bp

The number of amplicon regions and total length do not include the expected off-target regions that are included in the read and base level statistics.

Read Level Statistics

Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
1	2,622,928	94.27%
2	2,595,152	93.27%

Base Level Statistics

Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
1	85.27%	257,837,835	61.37%	0.35%
2	88.22%	255,259,123	60.75%	0.35%

The values for aligned bases exclude bases aligning to the probe sequences.

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

DNA Amplicon, Version 2.1.1
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Variants Summary

	SNVs	Insertions	Deletions
Total Passing	22	1	2
Percent Found in dbSNP	100.00%	0.00%	100.00%
Het/Hom Ratio	4.500	-	-
Ts/Tv Ratio	21.000	-	-

Variants by Sequence Context

	SNVs	Insertions	Deletions
In Genes	22	1	2
In Exons	15	1	0
In Coding Regions	14	1	0
In UTR Regions	1	0	0
In Splice Site Regions	0	0	0

Genes include exons, introns and UTR regions. Exons include coding and UTR regions. UTR regions include 5' and 3' UTR regions. Splice site regions include regions annotated as splice acceptor, splice donor, splice site or splice region.

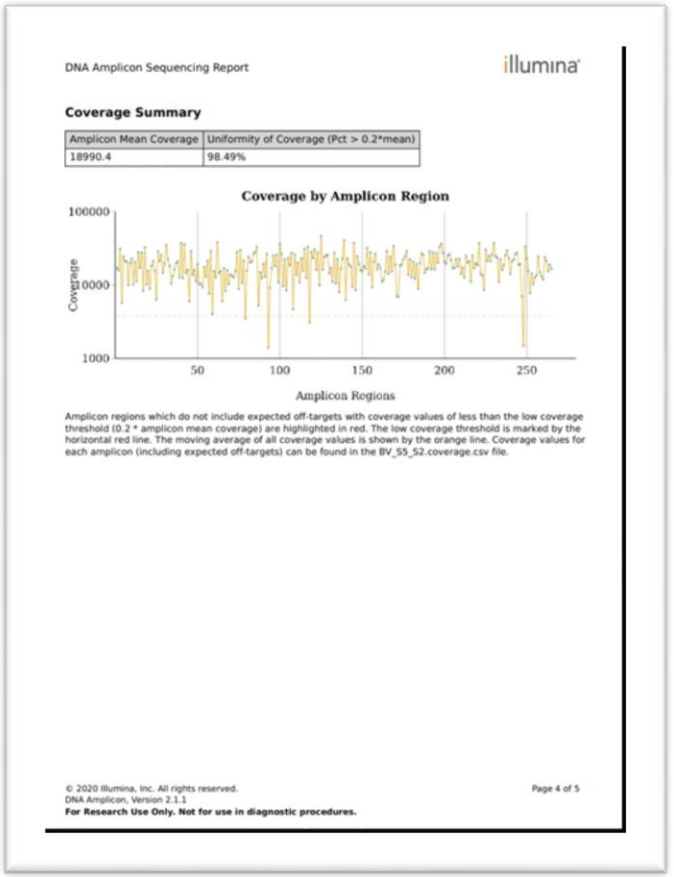
Variants by Consequence

	SNVs	Insertions	Deletions
Frameshifts	-	1	0
Non-synonymous	6	0	0
Synonymous	8	-	-
Stop Gained	0	0	0
Stop Lost	0	0	0

Variation consequences are calculated following the guidelines at http://uswest.ensembl.org/info/genome/variation/predicted_data.html#consequences

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.

DNA Amplicon, Version 2.1.1
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



DNA Amplicon Sequencing Report

illumina

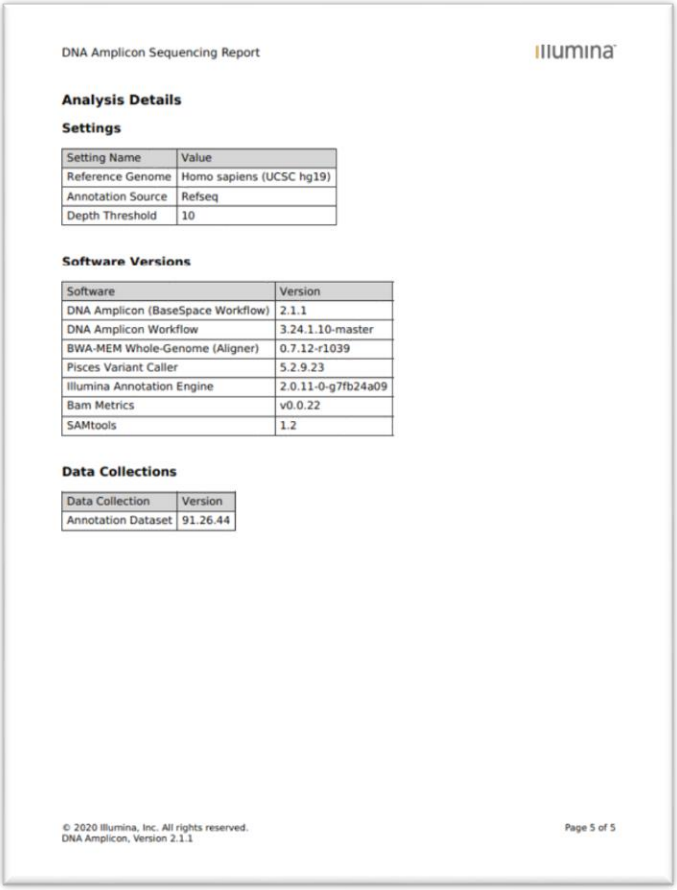
Coverage Summary

Amplicon Mean Coverage	Uniformity of Coverage (Pct > 0.2*mean)
18990.4	98.49%

Coverage by Amplicon Region

Amplicon regions which do not include expected off-targets with coverage values of less than the low coverage threshold (0.2 * amplicon mean coverage) are highlighted in red. The low coverage threshold is marked by the horizontal red line. The moving average of all coverage values is shown by the orange line. Coverage values for each amplicon (including expected off-targets) can be found in the BV_S5_S2.coverage.csv file.

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.
DNA Amplicon, Version 2.1.1
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



DNA Amplicon Sequencing Report

illumina

Analysis Details

Settings

Setting Name	Value
Reference Genome	Homo sapiens (UCSC hg19)
Annotation Source	Refseq
Depth Threshold	10

Software Versions

Software	Version
DNA Amplicon (BaseSpace Workflow)	2.1.1
DNA Amplicon Workflow	3.24.1.10-master
BWA-MEM Whole-Genome (Aligner)	0.7.12-r1039
Pisces Variant Caller	5.2.9.23
Illumina Annotation Engine	2.0.11-0-g7fb24a09
Bam Metrics	v0.0.22
SAMtools	1.2

Data Collections

Data Collection	Version
Annotation Dataset	91.26.44

© 2020 Illumina, Inc. All rights reserved.
DNA Amplicon, Version 2.1.1

Slika 14. Prikaz izvještaja nalaza analize

5. RASPRAVA

Rak jajnika je najsmrtonosniji oblik maligniteta u ginekologiji, dok je njegov podtip, karcinom jajnika visokog gradusa (*engl. high-grade serous ovarian cancer, HGSOC*), oblik koji obuhvaća najviši postotak smrtnih slučajeva. Jedan od najvažnijih faktora o kojima ovisi liječenje i prognoza bolesti jest rana dijagnoza. Više od 50% dijagnosticiranih tumora jajnika se smatraju odgovornima za smrtne slučajeve. U liječenju karcinoma jajnika primjenjuje se nekoliko različitih metoda, a to su: kirurški zahvat, radioterapija, kemoterapija te ciljana, odnosno genska terapija. S obzirom na to da geni BRCA1 i BRCA2 u zdravim stanicama sudjeluju u popravku oštećenja DNA, mutacije tih gena su povezane baš s defektima popravka DNA. Zene koje imaju mutaciju gena BRCA1 i/ili BRCA2 mogu imati veći rizik od od obolijevanja od raka jajnika ili raka dojke. Gledano u postotcima, pacijentice s muitacijama imaju vjerojatnost od 11% do 62% nastanka raka jajnika do 70. godine zivota. (13)

Gensko profiliranje raka neizostavni je dio procesa dijagnostike i liječenja oboljelih od tumora. Personalizirana medicina podrazumijeva liječenje bolesti kod svakog pacijenta posebno, a sve na temelju patologije bolesti te fiziologije individualca. Važno je imati molekularnu podlogu koja daje u uvid u potencijalne karcinogene te druge okolišne čimbenike kao i potencijalne načine popravka. Odgovor na liječenje tumora uvelike ovisi o molekularnoj podlozi tumora, okolišnim čimbenicima te interakciju tumorskih te ostalih, zdravih stanica. Svaka od tri navedene komponente je posebna za individualnog pacijenta i njegovu kliničku sliku.

Činjenica je da podrijetlo i progresija kompleksnih bolesti, kao što je i tumor, pronalazimo u interakciji gen/proteina/metabolizma s okolišnim faktorima te životnim stilom pacijenta. Stoga, neophodno je reći kako budućnost i napredak personalizirane medicine leži u postulatima biologije, koja se bavi istraživanjem procesa od molekularne razine pa sve do razine promatranja i istraživanje cijelog organizma.

Važnost molekularnog testiranja uzoraka pacijentica s mutacijom gena BRCA1 i/ili BRCA2 jest otkrivanje točnog mjesta mutacije te, prema tome, određivanja i biranja ciljane terapija. Ciljana je terapija doživjela velik napredak u liječenju karcinoma te je omogućeno da se tumorima koji se razlikuju na molekularnoj razini, pristupa na jedinstven način. U slučaju mutacija gena BRCA1 i BRCA2, kod pacijentica s karcinomom jajnika, koriste se PARP inhibitori, među kojima je najistraživaniji lijek Olaparib. (25)

6. ZAKLJUČAK

Ovim radom prikazana je važnost genetičkog testiranja BRCA 1 i BRCA 2 gena u pacijentica s karcinomom jajnika radi odlučivanja o primjeni ciljane terapije.

U svrhu molekularnog testiranja, potrebno je izolirati DNA iz uzorka krvi ili uzorka tkiva, za što su dostupni komercijalni kitovi.

Ovakav pristup lječenja predstavlja odmak od tradicionalnih metoda liječenja kod kojih se koristi „jedan lijek za sve“, prema liječenju prilagođenom svakom pojedinom pacijentu - „pravi lijek za pravog pacijenta u pravo vrijeme“

7. LITERATURA

1. http://www.onkologija.hr/sto-je-rak/

2. Dugeč J., Metabolizam stanica raka, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020.

3. Štraus B., Petrik J., Štrausova medicinska biokemija, Medicinska naklada, 2009.

4. Williams, A. B. & Schumacher, B. p53 in the DNA-damage-repair process. Cold Spring Harbor Perspectives Med., 2016 May 6

5. Bajek S., Bobinac D., Jerković R., Malnar D., Marić I., Sustavna anatomija čovjeka, 2007.

6. Perelman School of Medicine: Diagnosis and Managment of Ovarian Cancer, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA 2016.

7. Damjanov I., Jukić S., Nola M., Patologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2008.

8. Lisio M, Lili Fu, Goyeneche A., Gao Zu-hua, Telleria C., High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints, International Journal of Moleucal Sciences, 2019 Jan 18

9. V. Janjanin: Rak jajnika i očuvanje plodnosti, Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, 2017.

10. N. Ljubojević: Ginekologija i porodništvo, Zdravstveno veleučilište, Zagreb 2005.

11. Brian Orr, Robert P. Edwards, Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer, Hematol Oncol Clin North Am, 2018 Dec

12. Jackson S. E., Chester J. D., Personalized Cancer Medicine, Int J Cancer, 2015 Jul 15

13. Jalušić Kris Oliver, Personalizirana medicina – temeljni koncepti i primjena, Sveučilište u Zagrebu, 2015.

14. Levanat S., Levačić Cvok M., Molekularna osnova raka dojke vezana uz gene BRCA1 i BRCA2: Karakteristike i ciljana terapija, 2010.

15. Guyoan L., Da Yang, Yan Sun, Shmulevich I., Xue F., Sood A. K., Zhang W., Differing clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mutations in serous ovarian cancer, Pharmacogenomics, 2012 October

16. Marchetti C, Imperiale L, Gasparri ML, Palaia I, Pignata S, Boni T, Bellati F, Benedetti Panici P., Olaparin, PARP1 inhibitor in ovarian cancer, University of Rome, Department of Gynecologic-Obsetrical and Urologic Sciences, Rome, Italy, 2012 Oct

17. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS., Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers, The New England Journal of Medicine, 2009 Jul 9

18. Štimac I, Martinković F., Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2021.

19. Kaltak M., Metode sekvenciranja novih generacija u dijagnostici, Sveučilište u Zagrebu, 2016.

20. Čule, Ana-Marija, Individualizirani pristup liječenju cistične fibroze, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.

21. High Pure PCR Templation Kit Dostupno na: https://lifescience.roche.com/global_en/products/high-pure-pcr-template-preparation-kit.html

22. cobas DNA Sample Preparation Kit Dostupno na: https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-dna-sample-preparationkit.html

23. Qubit® 3.0 Fluorometer Dostupno na: https://www.thermofisher.cn/order/catalog/product/cn/en/Q33216

24. AmpliSeq for Illumina Custom DNA Panel Dostupno na:

https://support.illumina.com/downloads/ampliseq-for-illumina-custom-and-community-panels-reference-guide-1000000036408.html

25. Štambuk S., Šundov D., Kuret S., Beljan R., Anđelinović Š., Future persppectives of personalized oncology, Solit University, University Center for Forensic Sciences, 2010. June

8. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI:

Ime i prezime : Iva Ćurković

Datum rođenja : 22.04.2001.

Broj mobilnog telefona : 092 320 7276

E-mail adresa : ivacurkovic216@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2007. -2015. Osnovna škola fra Pavla Vučkovića, Sinj

2010. -2016. Glazbena škola Jakova Gotovca, Sinj

2015. -2019. Franjevačka klasična gimnazija u Sinju s pravom javnosti, Sinj

2019. -2022. Sveučilišni odjel zdravtsvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

STRANI JEZICI:

Engleski jezik

Njemački jezik