

# Molekularna dijagnostika i ciljano liječenje karcinoma pluća

---

**Mihaljević, Ivan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:693140>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ivan Mihaljević**

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA I CILJANO LIJEČENJE  
KARCINOMA PLUĆA**

**Završni rad**

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ivan Mihaljević**

**MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA I CILJANO LIJEČENJE  
KARCINOMA PLUĆA**

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

**Završni rad/Bachelor's thesis**

Mentor:

**Doc.dr.sc. Sendi Kuret**

Split, 2023.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo

**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** Doc.dr.sc. Sendi Kuret

## Molekularna dijagnostika i ciljano liječenje karcinoma pluća

Ivan Mihaljević, 311256:

### Sažetak

**Cilj:** Cilj ovog rada je detaljno prikazati molekularno testiranje kojim se utvrđuje status EGFR gena kao prediktivnog biomarkera kod pacijenata oboljelih od karcinoma pluća radi primjene ciljane terapije u njihovu liječenju.

**Materijal i metode:** Materijali koji se koriste za analizu mogu biti: tumorsko tkivo, citološki punktati i krv pacijenta. Opisano je uzorkovanje materija za analizu, izolacija DNA, mjerenje koncentracije DNA te detekcija EGFR mutacija uz pomoć komercijalno dostupnih kitova.

**Rezultati:** Rezultati koji se dobiju detekcijom mutacija EGFR gena obrađuju se softverski i u konačnici se dobije izvještaj koji detaljno prikazuje sve detektirane mutacije u uzorku pacijenta.

**Zaključak:** Molekularno testiranje EGFR gena, odnosno detekcija mutacija kod pacijenta s rakom pluća važno je radi određivanja točne ciljane terapije. Da bi se utvrdila prisutnost mutacija potrebno je iz uzorka krvi ili iz tumorskog tkiva pacijenta izolirati DNA, a potom umnožiti i detektirati. Pacijenti kod kojih je utvrđena prisutnost patogenih mutacija u EGFR genu kandidati su za ciljanu terapiju.

**Ključne riječi:** karcinom pluća; EGFR; personalizirano liječenje

**Rad sadrži:** 36 stranica, 2 tablice, 14 slika i 33 reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav povjerenstva za obranu:

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

**Datum obrane:** 20. srpnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**

**University Department of Health Studies**

**Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health

**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** Doc.dr.sc. Sendi Kuret

### **Molecular diagnostics and targeted treatment of lung cancer**

Ivan Mihaljević, 311256

#### **Summary**

**Objectives:** The aim of this paper is to present detailed molecular testing which solidifies the status of the EGFR gene as a predictive biomarker in patients with lung cancer 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 detection of EGFR mutations with the help of commercially available kits are described.

**Results:** The results obtained by detecting EGFR gene mutations are processed by software and ultimately a report is obtained that shows in detail all detected mutations in the patient's sample.

**Conclusion:** Molecular testing of the EGFR gene, i.e. detection of mutations in patients with lung 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 multiply and detect it. Patients with the presence of pathogenic mutations in the EGFR gene are candidates for targeted therapy.

**Key words:** lung cancer; EGFR; personalized medicine

**Thesis contains:** 36 pages, 2 tables, 14 figures and 33 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

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

**Defense date:** July 20<sup>th</sup>, 2023

# SADRŽAJ

## 1. UVOD

1.1. Pluća .....	1
1.2. Tumor .....	2
1.3. Karcinom pluća .....	4
1.3.1. Adenokarcinom .....	5
1.4. Personalizirano liječenje karcinoma pluća .....	7
1.4.1. Gen <i>EGFR</i> .....	9
1.4.2. Mutacije <i>EGFR</i> gena .....	9
1.4.3. Tirozin kinazni inhibitori .....	9
1.5. Real-time PCR .....	10

## 2. CILJ RADA .....

13

## 3. MATERIJAL I METODE .....

14

3.1. Materijal .....	14
3.2. Metode .....	16
3.2.1. Izolacija DNA .....	16
3.2.2. Određivanje koncentracije DNA .....	18
3.2.3. Umnožavanje DNA .....	19

## 4. REZULTATI .....

22

4.1. EGFR mutacijski test .....	22
---------------------------------	----

## 5. RASPRAVA .....

25

<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>26</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>30</b>

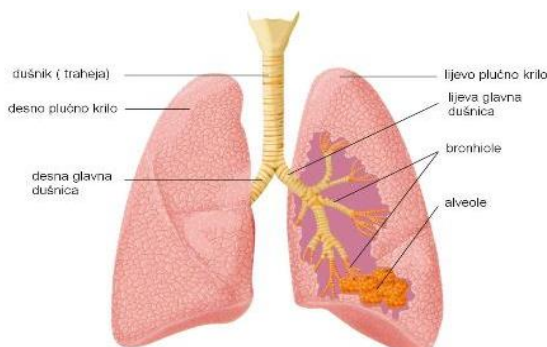
# 1. UVOD

## 1.1. Pluća

Pluća su najveći organ ljudskog respiratornog sustava. Sastoje se od većeg desnog plućnog krila, koje je građeno od tri lobusa, i od manjeg lijevog plućnog krila sa dva lobusa. Cijela pluća su obavijena tankom ovojnicom pleurom koja je građena od dvije membrane. Vanjska membrana (*pleura parietalis*) je poznata kao porebrica, a unutarnja membrana (*pleura visceralis*) kao poplućnica. Međumembranski prostor je ispunjen seroznom tekućinom što rezultira klizanjem pluća po unutarnjoj stijenci prsnog koša prilikom procesa disanja. (6)

Dušnik (trachea) je elastična cijev građena od deset do dvadeset potkovičastih hrskavica spojenih vezivnim prstenovima. Na stražnjoj strani se nalazi ravna vezivno-mišićna opna, održavajući stalan otvor za protok zraka. Unutrašnjost je prekrivena višeslojnim cilindričnim epitelom s trepetljikama. Dušnik se grana na dušnice (bronchos), cijevi obložene višerednim cilindričnim epitelom s trepetljikama i vrčastim stanicama. Odvajaju se sukladno broju režnjeva pojedinog plućnog krila, tj. tri ogranka desne dušnice i dva ogranka lijeve. Daljnjim grananjem dušnice prelaze u bronchiole (bronchiolus), cjevčice promjera 1 milimetar prekrivene jednoslojnim cilindričnim ili kubičnim epitelom bez vrčastih stanica. Na krajevima bronhiola se nalaze alveole, šupljine ispunjene zrakom, koje su ujedno i osnovna građevna jedinica pluća. Obložene su jednoslojnim pločastim epitelom, tzv. pneumocitima prvog reda, a mjestimično i kubičnim stanicama – pneumocitima drugog reda. (Slika 1) (7)

Uloga pluća je izmjena plinova između atmosfere i ljudskog organizma preko alveola i pripadajućih kapilara koje ih okružuju. U procesu disanja dolazi do kretanja udahnutog kisika od alveola u krv kapilara dok ugljikov dioksid prelazi iz kapilara u alveole, eliminirajući štetnu tvar. (6)



Slika 1. Anatomija pluća

Izvor: <https://www.onkologija.hr/rak-pluca/>



## 1.2. Tumor

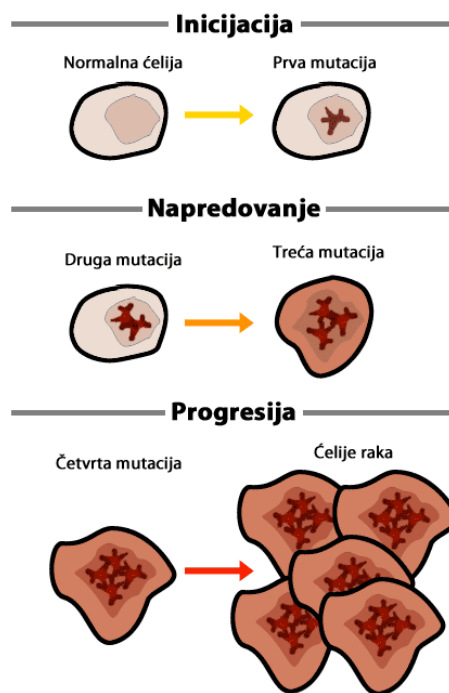
Tumor je naziv kojim opisujemo tkivo nastalo abnormalnom diobom stanica . Zbog postojanja životnog vijeka svih ljudskih stanica, za opstanak organizma potrebne su konstantne diobe i rast stanica. Greške koje se događaju prilikom navedenih procesa, u slučaju da se ne mogu korigirati od strane organizma, dovode do stvaranja mutacija. Najučestalije mutacije koje su zaslužne za nastanak tumora su rast u odsustvu faktora rasta te ignoriranje signala za apoptozu. Rezultat je nakupina čvrstog tkiva koja može biti benigna ili maligna. (1)

Maligni tumori posjeduju mogućnost širenja stanica tumora u udaljena tkiva i organe što nazivamo metastaziranje. Stanice metastaze posjeduju identična fiziološka i morfološka svojstva kao i primarni tumor. Neki od mehanizama koji dovode do stvaranja metastaza su infiltracija strome, izbjegavanje imunog odgovora inhibicijom anti – tumorogenih procesa te razvijanjem otpornosti na određene terapije. (2)

Proces nastanka malignog tumora, također poznat kao karcinogeneza, karakterizirana je sa četiri stadija:

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

Proces transformacije uzrokuje razvoj stanica raka iz zdravih, normalnih stanica. Sam proces je uzrokovan mutacijom u genima odgovornim za normalnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje stanica poznatih kao protoonkogeni i tumor supresorski geni. Transformacija započinje prvim korakom poznatim kao inicijacija (poticanje) u kojemu je stanica potaknuta da postane kancerogena promjenom u staničnom genetskom kodu. Samu promjenu na genetskoj razini potiče kancerogena tvar koja može biti kemijske, fizikalne ili biološke prirode. Drugi korak karcinogeneze je promocija (razvijanje). Uvjet da promocija bude efektivna je prolaz stanice kroz proces inicijacije. U suprotnom, promocija nema učinka. Razvoj primarnog tumora se odvija u koraku progresije, kojeg može slijediti posljednji korak metastaziranje koji pogoršava prognozu pacijenta. (Slika 2).(3)



Slika 2. Proces kancerogeneze

Izvor: <http://kucnilekar.com/kako-nastaje-rak/>

Protoonkogeni su geni zaslužni za pravilnu diobu, rast i preživljavanje stanica. Prilikom mutacije protoonkogen dolazi do njegove aktivacije kada njegova aktivnost nije potrebna. U tom trenutku protoonkogen postaje onkogen koji kodira onkoproteine, čiji učinak je poticanje nekontroliranog rasta i diobe stanica. (4)

Ključan dio procesa koji vodi do stvaranja tumora je aktivnost tumor supresorskih gena koji usporavaju diobu stanica te signaliziraju pravovremenu apoptozu stanice. Neadekvatna aktivnost tih gena dovodi do povećanog rizika nastanka tumora zbog inaktivacije negativnih regulacijskih učinaka. (5)

Prilikom diobe stanice dolazi do replikacije stanične DNK, procesa koji je visoko potencijalan za stvaranje grešaka. Ulogu u sprječavanju tih grešaka imaju geni za popravak DNK čiji učinak se očituje popravljanjem DNK, ili u slučaju nemogućnosti popravka, izazivanjem stanične smrti. Mutacijom ovih gena dolazi do višestrukih grešaka u kodu stanice, što omogućuje nekontrolirani rast stanice. (5)

### 1.3. Karcinom pluća

Karcinom pluća je najčešće dijagnosticiran oblik raka na globalnoj razini proteklih desetljeća. Istraživanje iz 2018. godine je zabilježilo 2.1 milijuna novih slučajeva karcinoma u cijelome svijetu. Od te brojke 1.37 milijuna (65%) dijagnosticiranih su bili muškarci sa najvećom učestalosti na području Mikronezije gdje je zabilježeno da je 54.1 oboljelih na 100,000 muškaraca dok je na području Istočne Europe incidencija 47.2 oboljelih na 100,000 muškaraca. Naspram muškaraca, žene rjeđe obolijevaju od karcinoma pluća prema istom istraživanju iz 2018. godine, čemu svjedoči brojka od 725,000 dijagnosticiranih žena. Najviši udio oboljelih žena je zabilježen u Sjevernoj Americi (30.7 oboljelih na 100,000 žena) dok je na području Zapadne Europe ta brojka niža (25.7 oboljelih na 100,000 žena). Brojčane razlike incidencija između spolova na temelju geografskih podjela prepisuju se povijesnim i kulturološkim razlikama konzumacije duhanskih proizvoda te obavljanja poslova. Smrtnost zbog karcinoma pluća je usko povezana uz samu incidenciju zbog niskih stopa preživljavanja ove bolesti, što dokazuje podatak da je karcinom pluća prvi uzročnik smrti kod muškaraca, a drugi kod žena, između svih smrti uzrokovanih karcinomima. Tokom 2018. godine 1.2 miliona muškaraca i 576,100 žena je preminulo od karcinoma pluća, 20% od svih smrtnih ishoda uzrokovanim različitim tipovima karcinoma. (8)

Pušenje cigareta uzrokuje 7 od 10 svih slučajeva karcinoma pluća, što ga čini glavnim uzročnikom ove bolesti zbog sastava duhanskog dima koji sadrži oko 60 karcinogenih tvari. Jednaku štetu kao i cigarete čine ostali duhanski proizvodi kao što su cigarete i lule ali i potencijalno e-cigarete koje su tijekom posljednjih godina postale sve učestalije u upotrebi. Populacija koja konzumira kanabis također može razviti karcinom zbog učestalog miješanja kanabisa s duhanom. Iako je količina duhana u tom slučaju drastično manja naspram količine u cigareti, dublja inhalacija i duže zadržavanje dima u plućima predstavlja značajan faktor rizika. (9) Ionizirajuće zračenje ima značajnu ulogu u etiologiji karcinoma pluća, vidljivo kod pacijenata liječenim radioterapijama te rudara izloženih radioaktivnom radonu i produktima njegovog raspadanja koji emitiraju  $\alpha$  zračenje. Istraživanje koje je uključivalo 11 kohorti pokazalo je da svaka godina prolongiranog izlaganja radonu linearno povećava rizik od oboljenja za 6%. Kancerogene tvari na radnom mjestu višestruko povećavaju vjerojatnost od oboljenja zbog dugotrajnog i svakodnevnog izlaganja. Azbest i svi njegovi oblici poput krositila, krokidolita i tremolita su imaju kancerogeno djelovanje na pluća čovjeka, pogotovo

u zemljama niskih do srednjih resursa. Metali poput kroma izazivaju karcinom kod radnika koji proizvode kromne boje i kromne platine. Silicijev dioksid povećava rizik od oboljenja, proporcionalno sa količinom izloženosti karcinogenu. Razvoj karcinoma je uočen u većini slučajeva kod populacije s viskom stopom izloženosti. Područja rada koja u opisu posla imaju lončarstvo, izradu cigli, keramičarstvo te rezanje kamena usko su povezana s nastankom silikoze koja može prethoditi karcinogenezi. (10)

### **1.3.1. Adenokarcinom**

Podjela karcinoma pluća je organizirana u dvije skupine: karcinom malih stanica (engl.SCLC – *Small cell lung cancer*) te karcinom ne-malih stanica (engl.NSCLC – *Non-Small Cell Lung Cancer*). Skupini NSCLC pripada adenokarcinom, podtip karcinoma koji se javlja u približno 40% slučajeva svih karcinoma pluća te je najčešći oblik karcinoma pluća. Faktori rizika za razvoj adenokarcinoma su jednaki kao i kod ostalih oblika karcinoma pluća. Primarni faktor je pušenje duhanskih proizvoda, a sekundarni izlaganje raznim kancerogenima poput azbesta, silikata, radona i teških metala. Navedeni kancerogeni mogu potencijalno mutirati p53 gen, najčešći uzrok karcinogeneze prisutan u 52% svih slučajeva adenokarcinoma pluća. Stopa petogodišnjeg preživljavanja je od 12% do 15% sa srednjom dobi dijagnosticiranja od 71 godine. Porast broja pušača ženskog spola, u posljednjih 20 godina, je doprinio povećanom udjelu adenokarcinoma pluća među ostalim karcinomima te preuzeo prvo mjesto u poretku tipova karcinoma pluća ispred karcinoma skvamoznih stanica. (11)

Klasificiranje adenokarcinoma pluća se odvija u 4 tipa: adenokarcinom in situ (AIS), minimalno invazivni adenokarcinom (MIA), invazivni adenokarcinom i varijante adenokarcinoma. Adenokarcinom in situ i minimalno invazivni adenokarcinom, ako su rano otkriveni, imaju bolji prognostički ishod u odnosu na ostale tipove. Organi na koje se karcinom može lokalno proširiti su: pleura, dijafragma, perikard i bronhi. Napredna faza podrazumijeva širenje na medijastinum, velike krvne žile, traheju i jednjak. Metastaziranje u limfne čvorove se odvija u peribronhalnim limfnim čvorovima, migrirajući u medijastinalne i subkardinalne

limfne čvorove, s konačnim ciljem koji je suprotno plućno krilo. Distalne metastaze nastaju u bilo kojem tkivu udaljenom od primarnog tumora, poput mozga, kostiju ili jetre. (11)

Ključan aspekt dijagnosticiranja adenokarcinoma pluća je određivanje njegovog stadija zbog primjene adekvatne terapije. Određivanje stadija je karakterizirano sa 5 stadija, svaki idući stadij prognostički je lošiji za pacijenta. Stadij 0 ili in situ stadij označuje da je karcinom pronađen samo na jednom mjestu, odnosno samo u vanjskoj granici pluća, ne prodirući dublje u tkivo. U stadiju 1 prisutan je mali tumor koji ne pokazuje znakove širenja u limfne čvorove van pluća. Stadij 2 karakterizira širenje tumora u dublje slojeve pluća i limfnih čvorova, bez daljnjeg širenja u distalna tkiva. Ovaj stadij se dijeli na 2 pod-stadija, 2A i 2B, ovisno o jasno definiranoj veličini primarnog tumora i tkivima u koje je karcinom metastazirao. Pod-stadij 2B je više uznapredovao u odnosu na pod-stadij 2A. Sljedeći stadij je stadij 3, definirajući stupanj progresivnog širenja tumora još dublje u pluća i udaljena tkiva. Jasno definirani kriteriji za veličinu tumora i udaljenost metastaza daju uvid u svrstavanje tumora u jedan od 3 pod-stadija: pod-stadij 3A, pod-stadij 3B i pod-stadij 3C. Pod-stadij 3A je najmanje uznapredovao, dok je pod-stadij 3C najviše. Posljednji stadij je stadij 4, u kojemu je karcinom metastazirao na drugo plućno krilo, obližnju tekućinu i distalna tkiva te limfne čvorove. Kao i stadiji prije njega, stadij 4 ima pod-stadije: pod-stadij 4A i pod-stadij 4B. Rast tumora izvan prsnog koša je obilježje pod-stadija 4A, a obilježje pod-stadija 4B je metastaziranje u više organa ili na više različitih mjesta u istom organu. (12)



Slika 1. Presjek adenokarcinoma pluća

Izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Adenocarcinoma\\_of\\_the\\_lung](https://en.wikipedia.org/wiki/Adenocarcinoma_of_the_lung)

## 1.4. Personalizirano liječenje karcinoma pluća

Personalizirana medicina u području onkologije donosi veliki napredak u liječenju karcinoma, uzimajući u obzir genske varijable tumora te način života pacijenta. Najveća prednost personaliziranog liječenja je mogućnost adaptacije terapije prema točno određenim karakteristikama tumora i onkogeni koji su potaknuli kancerogenezu. Poboljšani odgovor tumora na terapiju omogućen je regulacijom toksičnih učinaka same terapije. Smanjena toksičnost u kombinaciji sa poboljšanim odgovorom tumora dovodi do očuvanja organa i tkiva. Svi navedeni postupci su usmjereni prema poboljšanoj kvaliteti života pacijenta. (13)

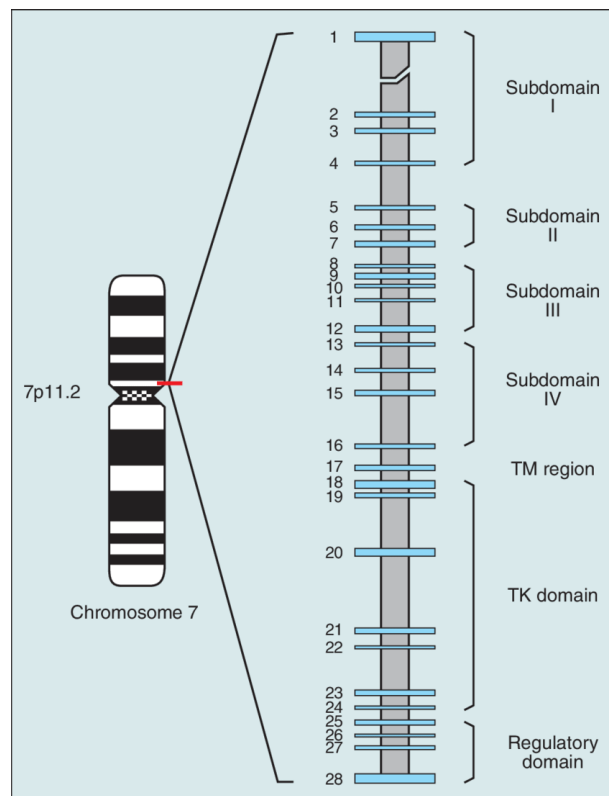
Ciljani pristup se temelji na djelovanju lijeka na tumorsku stanicu, izbjegavajući stanice organizma koje su zdrave. Konstantna istraživanja rezultiraju većim brojem tipova ciljanih stanica što dovodi do razvoja novih lijekova specifičnih za te stanice. Da bi pacijent mogao primiti terapiju, odnosno odgovarajuće lijekove, potrebno je preliminarno testiranje pacijenta kojim se utvrđuje postoji li adekvatan lijek za ciljane stanice tumora. Pacijentu se može odobriti ciljana terapija ako rezultati testiranja dokažu postojanje ciljanih biomarkera, odnosno mutacija. Lijekovi koji se koriste u ovakvim terapijama su lijekovi malih molekula, tj. monoklonalna protutijela.(14)

EGFR gen je osnovni biomarker za testiranje kod pacijenata kojima je dijagnosticiran karcinomane-malih stanica (NSCLC), a među njima je 10% do 15% ljudi koji imaju karcinom pozitivan na receptor epidermalnog faktora rasta (eng. Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR). (15)

### 1.4.1. EGFR gen

EGF (epidermalni faktor rasta) je protein građen od 53 aminokiseline sa 3 disulfidne veze, kojeg se može pronaći u tkivima i tjelesnim tekućinama. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) je transmembranski protein koji je sastoji od 3 domene: ekstracelularne koja veže ligand, hidrofobne transmembranske domene te citosolne odnosno tirozin kinazne domene. EGFR, poznat i kao ErbB1/HER1, je član porodice receptora protein-tirozin kinaze uz ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4. (16)

Opisan je kao monomer tipa I membranskih receptora, a građen je od polipeptidnog lanca sa 1186 aminokiselinskih ostataka i N-vezujućih oligosaharida. Ekrstacelularna domena zbog visokog afiniteta veže EGF te TGF- $\alpha$ , a sastoji se od 4 dijela. Dijelovi I i III, bogati leucinom, sudjeluju pri procesu vezanja liganda, dok dijelovi II i IV sa ostacima cisteina izgrađuju disulfidne veze i dimere receptora. EGFR gen je lociran na kromosomu 7p12 (Slika 4). (17)



Slika 2. Kromosomska lokacija i egzonska struktura EGFR gena

Izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Chromosomal-location-of-the-EGFR-gene-its-exon-structure-and-EGFR-protein-domains\\_fig2\\_7046863](https://www.researchgate.net/figure/Chromosomal-location-of-the-EGFR-gene-its-exon-structure-and-EGFR-protein-domains_fig2_7046863)

Spajanje liganda s receptorom faktora epidermalnog rasta prema sistemu ključ-brava potiče povezivanje receptora i obližnjeg EGFR proteina. Navedeni proces dimerizacije aktivira receptorski kompleks te posljedično aktivira unutarstanične signalne puteve koji u konačnici potiču proliferaciju i diobu stanice. Amplifikacija genskih kopija EGFR gena, povećana ekspresija EGFR receptora i mutacije genskog koda EGFR dovode do abnormalnog staničnog ciklusa s krajnjim produktom poremećene homeostaze što u konačnici dovodi do nastanka tumora. (18)

### 1.4.2. Mutacije EFGR gena

Mutacije u EFGR genu su najzastupljenije u papilarnom, acinarnom i solidnom podtipu adenokarcinoma, ali su rijetke kod mikropapilarnog i mucinoznog tipa adenokarcinoma. (19)

Mutacije EGFR gena mogu se podijeliti u 3 klase:

Klasa I: 44% svih EGFR mutacija se odnose na delecije na egzonu 19 te rezultiraju gubitkom aminokiselinske sekvence u rasponu od leucina na poziciji 747 do glutaminske kiseline s pozicijom 749.

Klasa II: točkaste mutacije, od kojih je najznačajnija supstitucija na egzonu 21 na kodonu 858 (L858R) čija je posljedica supstitucija arginina za leucin. Ta mutacija čini 41% svih EFGR mutacija. Supstitucija na egzonu 18 na kodonu 719 (G719X) zaslužna je za zamjenu glicina serinom, alaninom ili cisteinom te čini 4% EGFR mutacija.

Klasa III: duplikacije i insercije koje se odvijaju na egzonu 20, čine 5% svih EGFR mutacija. Razlog za stvorenu rezistenciju na tirozin kinaza inhibitore mogu biti insercije na egzonu 20. (20)

### 1.4.3. Tirozin kinazni inhibitori

EGFR tirozin kinazni inhibitori su mikromolekule koje djeluju blokirajući EGFR autofosforilaciju što sprječava receptorsku aktivaciju i prijenos signala unutar stanice. Tirozin kinazni inhibitori prve generacije, gefitinib i erlotinib, su oralni biodostupni sintetički anilinokinazolini koji se reverzibilno vežu na intracelularnu tirozin kinaznu domenu EGFR te kompetitivno inhibiraju vezanje molekule adenozin-5' trifosfata (ATP).

Daljnijim napretkom razvijene su nove generacije EGFR tirozin kinaznih inhibitora sa novim svojstvima, od kojih je jedno ireverzibilno vezanje na tirozin kinaznu domenu. Afatinib, dacomitinim i neratinib su inhibitori koji su još u procesu istraživanja i usavršavanja, a ireverzibilno ciljaju EGFR, HER2 i HER4. (21)



EGFR inhibitori tirozin kinaza se dijele u 3 generacije, a to su EGFR TKI prve, druge i treće generacije.

EGFR inhibitori tirozin kinaze prve generacije (Gefitinib) je prvi inhibitor EGFR tirozin kinaze koji se koristio za terapiju NSCLC, koji selektivno inhibira EGF-stimulirani rast tumorskih stanica blokirajući EGFR autofosforilaciju stanica. Također može inicirati apoptozu stanica karcinoma. Primjenjuje se kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim ili metastatskim NSCLC. Erlotinib je EGFR inhibitor tirozin kinaze koji smanjuje autofosforilaciju u čitavim stanicama raka. Odobren je kao terapija uznapredovalog NSCLC nakon neuspjeha barem jedne citotoksične terapije. (22)

EGFR inhibitori tirozin kinaze druge generacije: Afatinib je ireverzibilni inhibitor EGFR tirozin kinaze druge generacije koji postiže neprekidnu i selektivnu blokadu ErbB tipa receptora. Dvije studije u trećoj fazi su pokazale da je afatinib poboljšao stopu preživljenja u odnosu na kemoterapiju kod oboljelih s NSCLC s prisutnom mutacijom del19.

EGFR inhibitori tirozin kinaze treće generacije: Osimertinib je ireverzibilni TKI koji selektivno djeluje na EGFR aktivacijske mutacije, poput L858R/T790M. Ovaj TKI nadvladava T790M posredovanu otpornost na EGFR inhibitore prve i druge generacije kod NSCLC. (23)

## 1.5. Real-time PCR

Laboratorijska tehnika koja se koristi za stvaranje velikog broja kopija specifično određenog segmenta molekule DNA naziva se Lančana reakcija polimerazom -PCR (engl. *Polymerase chain reaction*). Konvencionalnom PCR metodom, umnoženi DNA segment je detektiran na kraju ciklusa amplifikacije. (24)

Pravilno izvođenje PCR reakcije je uvjetovano prisustvom svih potrebnih komponenti reakcijske smjese. Reakcijska smjesa sadrži: DNA predložak, početnice, dNTP (deoksiribonukleotid trifosfate), enzim DNA/Taq polimerazu te bivalentne ione  $Mg^{2+}$ .

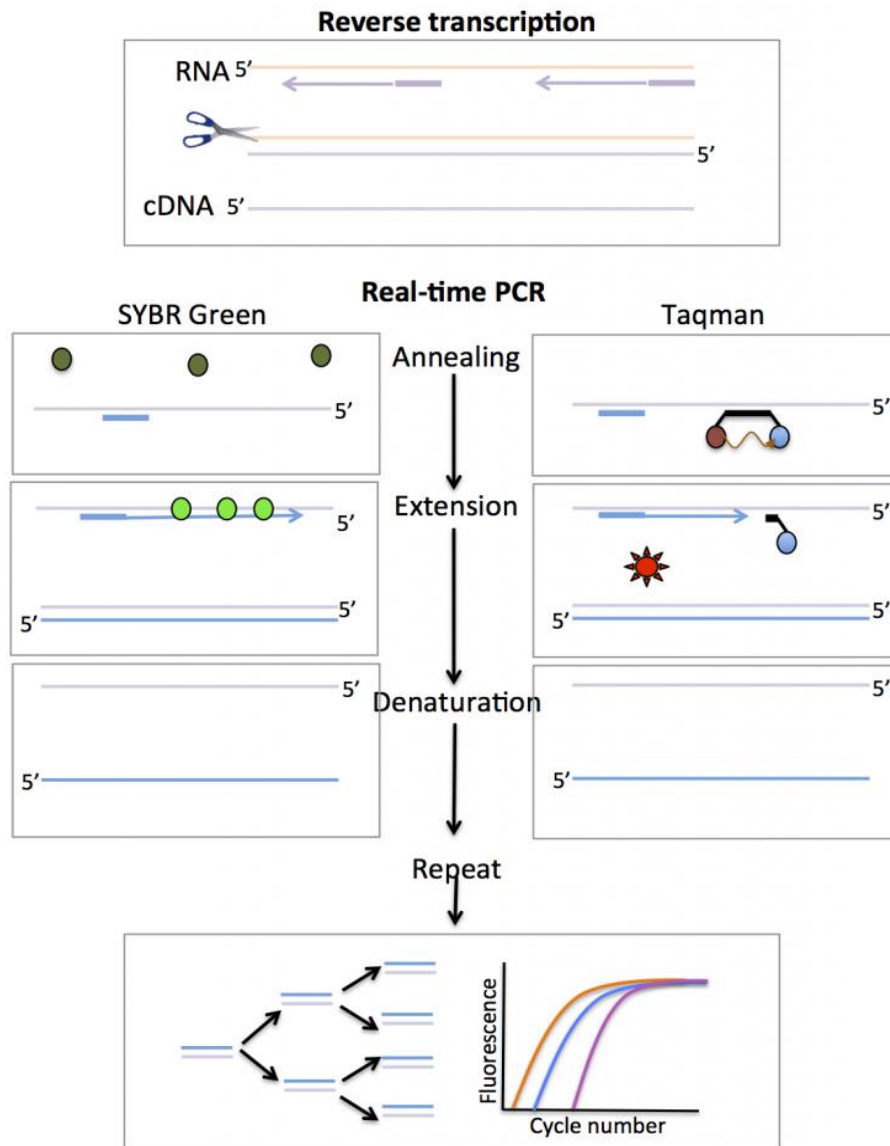
DNA polimeraza povezuje pojedinačne nukleotide koji postaju građevni blokovi za novu molekulu DNA. (25)

Umnožavanje DNA odvija se u tri osnovna koraka:

1. Denaturacija (eng. *Denaturation*): odvija se pri 95°C, pri čemu dolazi do denaturacije dvostruke uzvojnice na dva odvojena lanca kidanjem vodikovih veza.
2. Hibridizacija (eng. *Annealing*): pri 50 – 65°C, početnice se vežu komplementarno na jednolančani DNA predložak.
3. Produljivanje lanca (eng. *Elongation*): na temperaturi od 72°C Taq DNA polimeraza, nakon spajanja na početnice, koristi deoksinukleotidne trifosfate za formiranje nove DNA .

Ova tri osnovna koraka se ponavljaju 20 do 40 puta u ciklusima, a svakim ciklusom dolazi do udvostručavanja ciljanje molekule DNA. (26)

Za razliku od konvencionalne PCR metode, PCR u stvarnom vremenu (real-time PCR) se temelji na mjerenju količine amplificiranog produkta nakon svakog ciklusa PCR reakcije „u stvarnom vremenu“. Detekcija produkata je omogućena korištenjem fluorescentnih reporterskih molekula koje rezultiraju povećanom fluorescencijom svakim idućim ciklusom reakcije zbog povećanog broja amplikona. Koriste se dvije vrste fluorescentnih reporterskih molekula: SYBR green i Taqman probe. SYBR green se veže na dvolančanu DNA molekulu te nakon svjetlosne eksitacije daje signal fluorescencije znatno veći nego kada je nevezana za DNA. To svojstvo rezultira sa rastom fluorescencije koji je proporcionalan količini dvolančane DNA. Taqman probe se sastoje od genski specifične probe nukleinske kiseline koja je spojena s reporterskim i prigušivačkim molekulama. Ova vrsta probe se temelji na udaljenosti između reporterske molekule, koja emitira fluorescenciju, i prigušivačke molekule, koja emitiranu fluorescenciju apsorbira. Tijekom faze elongacije PCR reakcije proba se uništava, čemu slijedi otpuštanje reporterske molekule što omogućuje njezinu detekciju. (27) (Slika 6)



Slika 5. Shema real-time PCR reakcije

Izvor: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr/>

## **2. CILJ**

Cilj ovog rada je detaljno prikazati molekularno testiranje kojim se utvrđuje status EGFR gena kao prediktivnog biomarkera kod pacijenata s karcinomom pluća radi primjene ciljane terapije u njihovu liječenju.

### 3. MATERIJAL I METODE

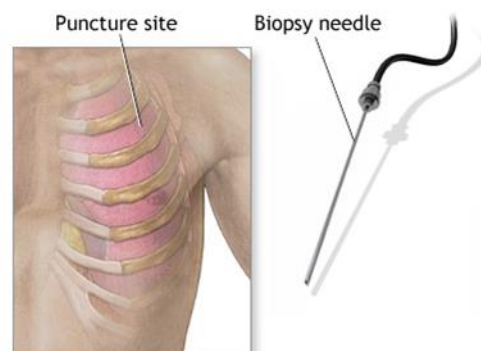
#### 3.1. Materijal

Molekularno testiranje zahtijeva određenu minimalnu količinu tkiva koje mora biti uzorkovano. Manje od 30% karcinoma pluća ne-malih stanica je resektibilno prilikom otkrivanja. Stoga, većina uzoraka uzetih kod osoba s uznapredovalim NSCLC su malene biopsije, koje su fiksirane u formalinu te uklopljene u parafin, te citološki punktati.

1. parafinski blok sa tumorskim tkivom



2. citološki punktati



Zlatnim standardom za molekularno testiranje se smatraju uzorci tkiva uklopljeni u parafin, no ako oni nisu dostupni, citološki punktati može pružiti jednako preciznu dijagnostičku mogućnost. Količina stanica i izolirane DNA predstavlja manji problem kod analiziranja smrznutih uzoraka zbog mogućnosti korištenja osjetljivijih metoda detekcije kod malih biopsija koje daju manju količinu izolirane DNA. Broj stanica potrebnih za uspješnu detekciju mutacija varira u intervalu od 100 do 400 stanica. Citološki uzorci trebaju zadovoljiti barem jedan od tri kriterija: koncentracija DNA >25 ng/  $\mu$ L, >30 tumorskih stanica ili 30% tumorske celularnosti. Idealni uzorak za molekularno testiranje bi trebao imati veliku količinu tumorskih stanica, a minimalnu količinu nekrotičnih stanica. (28)

Nakon uzorkovanja, tkivo dobiveno biopsijom se fiksira 10%-tnim formalinom na 6 do 12 sati za male i 8 do 19 sati za velike uzorke. (29)

Korištenje krvne plazme je preporučeno za molekularna testiranja nakon uzorkovanja tekuće biopsije. Koriste se epruvete sa EDTA kako bi se spriječila stanična degradacija, ali samo ako uzorak može biti obrađen u roku od 1 do 2 sata nakon uzorkovanja. U suprotnom, preporučuju se stabilizacijske epruvete koje sadrže prezervative koji osiguravaju stabilizaciju krvi na sobnoj temperaturi na više od 7 dana. Jedna od tih epruveta je proizvedena od strane tvrtke Roche, pod nazivom „Cell-Free DNA Collection Tube“ (Slika 7) Svježu krvnu plazmu je potrebno pohraniti na temperaturi od -20 ili -80°C, te koristiti suhi led pri transportu. (29)



Slika 6. Cell- Free DNA Collection Tube (Roche)

Izvor: <https://www.medicalexpo.com/prod/roche-sequencing-solutions/product-128233-944543.html>

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija DNA

#### *1. Izolacija DNA iz tkiva uklopljenog u parafin*

Izolacija DNA se provodi korištenjem komercijalnog kita *cobas® DNA Sample Preparation Kit* (Roche, Njemačka) (Slika 8).



Slika 7. Kit za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafin

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

Materijali i reagensi od kojih se sastoji kit su:

- pufer za liziranje tkiva
- proteinaza K
- pufer za vezanje parafina
- pufer za ispiranje I
- pufer za ispiranje II
- pufer za otapanje DNA
- filter tube s čepovima
- tube za sakupljanje

Dodatni potrebni materijali uključuju: ksilen, apsolutni etanol, izopropanol, sterilnu vodu, pipetore s mogućnosti pipetiranja 5 – 1000 µL, mikrocentrifugu i pripadajuće tubice s poklopcem te vorteks mikser.

Kako bi uopće mogli početi s izolacijom DNA, uzorak tkiva je potrebno deparafinizirati, a nakon toga deparafinizirana sekcija tkiva, debljine 5 mikrona, se lizira inkubirajući se na povišenoj temperaturi u prisustvu proteinaze K i pufera za liziranje tkiva. Nakon dodavanja izopropanola, cijeli sadržaj se prebaci u kolonu sa filterom od staklenih vlakana i centrifugira se. Tijekom centrifugiranja, DNA se veže na filter, a nečistoće, proteini i soli prolaze kroz filter i skupljaju u tubicu i odstranjuju. Nukleinske kiseline koje su ostale vezane na filter u koloni dodatkom pufera za opanje odvoje se u čistu tubicu.

## 2. Izolacija cfDNA iz uzorka plazme

Komercijalno dostupan *cobas*® *cfDNA Sample Preparation Kit* (Roche, Njemačka) koristi se za ručnu izolaciju izvanstanične DNA, odnosno „cell-free DNA“ iz krvi (Slika 9).



Slika 8. Kit za izolaciju cfDNA iz uzorka plazme

Izvor: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-cfdna-sample-preparation-kit.html>

Sadržaj komercijalnog kita za izolaciju cfDNA je:

- proteinaza K
- pufer za ispiranje I



- pufer za ispiranje II
- elucijski pufer
- filter tube (HPEA FT – High Pure Extension Assembly Filter Tubes)
- tube za sakupljanje (CT- Colleciton Tubes)

Osim komercijalnog kita, potreban je i dodatni materijal: apsolutni etanol, izopropanol, sterilna voda, pipetori s mogućnošću pipetiranja 5 – 1000  $\mu$ L, centrifuga i mikrocentrifuga s pripadajućim tubama.

Samo krv koja je uzorkovana u epruvetu s dodatkom K2 EDTA, može biti korištena za izolaciju cfDNA.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije DNA

Komercijalni kit koji se koristi za određivanje koncentracije izolirane DNA je Qubit™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) (Slika 10).



Slika 9. Qubit™ dsDNA Assay Kit

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

Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) je uređaj za mjerenje koncentracije DNA, RNA i proteina u kliničkoj praksi. Mjerenje koncentracija zadanih molekula temelji se na fluorimetriji (Slika 11).



Slika 10. Qubit® 3.0 Fluorometer

Izvor: <https://www.thermo-fisher.com/order/catalog/product/Q32854>

Nakon izolacije DNA, potrebno je promiješati uzorke s bojom i puferom prema protokolu proizvođača i zatim prenijeti u tubice koje se postavljaju u Qubit® 3.0 uređaj. Fluorescentna boja se veže na molekulu DNA, a Qubit® 3.0 detektira intenzitet fluorescencije i daje rezultat tj. podatak o koncentraciji DNA.

### 3.2.3. Umnožavanje DNA

Za detekciju mutacija EGFR gena kod pacijenata sa karcinomom pluća ne-malih stanica koristi se komercijalni kit *cobas® EGFR Mutation Test v2* (Roche, Njemačka). Cobas® EGFR test je real-time PCR test dizajnirana za otkrivanje supstitucijskih mutacija G719X u eksonu 18, delecijjskih mutacija u eksonu 19, supstitucijskih mutacija T790M i S768I i insercijskih

mutacija u egzonu 20 i L858R i L861Q supstitucijske mutacije u egzonu 21 u EGFR genu (Slika 12).



Slika 11. Kit za detekciju EGFR mutacija kod oboljelih od NSCLC

Izvor: <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/params/cobas-egfr-mutation-test-v2.html>

Kit cobas® EGFR Mutation Test v2 sadrži:

- EGFR Master Mix 1 (EGFR MMX-1)
- EGFR Master Mix 2 (EGFR MMX-2)
- EGFR Master Mix 3 (EGFR MMX-3 v2)
- magnezijev acetat
- EGFR kontrola mutacije
- Pufer za razrjeđivanje uzorka

Na početku rada je potrebno postaviti plan pločice s jažicama sa pozicijama svih uzoraka i kontrola koje će biti korištene u analizi. Kontrola mutacije, ili pozitivna kontrola (MC), postavlja na pozicije A01 – A03, a negativna kontrola (NEG) na pozicije B01 – B03. Razrijeđenim uzorcima (S#) pripadaju tri seta od tri stupca, počevši od C01 – C03 do H10 – H12. Oznaka „MMX #“ označuje Master Mix 1, 2 ili 3 v2 (Slika 13).

Row / Column	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<b>A</b>	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
<b>B</b>	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
<b>C</b>	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
<b>D</b>	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
<b>E</b>	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
<b>F</b>	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
<b>G</b>	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
<b>H</b>	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

Slika 12. Raspored pločice za cobas® EGFR Mutation Test v2

Prije umnažanja koncentracije izolirane DNA svakog uzorka mora biti podešena na koncentraciju od 2 ng/ $\mu$ L. Priprema EGFR Master Mixa 1, 2 ili 3 v2, zahtijeva računanje prema formuli: Volumen potrebnog EGFR MMX (1/2/3 v2) = (broj uzoraka + 2 kontrole + 1) x 20  $\mu$ L. U pločicu sa jažicama se postave kontrola, EGFR MMX-a i uzoraka i tako pripremljena stavlja se u uređaj cobas z 480 (Roche,Njemačka) (Slika14) i pokrene se analiza.



Slika 13. uređaj cobas z 480

Izvor : [https://www.bostonind.com/image/data/Photo/SKU-41601-41800/SKU-41688/SKU-41688-%20\(1\).JPG](https://www.bostonind.com/image/data/Photo/SKU-41601-41800/SKU-41688/SKU-41688-%20(1).JPG)

## 4. REZULTATI

### 4.1. EGFR mutacijski test

EGFR mutacijskim testom može se kvalitativno otkriti definirane mutacije gena receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) koje su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Popis mutacija koje se detektiraju EGFR mutacijskim testom

Exon	EGFR Mutation Group	EGFR Nucleic Acid Sequence	COSMIC ID <sup>6</sup>
Exon 18	G719X	2156G>C	6239
		2155G>A	6252
		2155G>T	6253
Exon 19	Ex19Del	2240_2251del12	6210
		2239_2247del9	6218
		2238_2255del18	6220
		2235_2249del15	6223
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2237_2254del18	12367
		2240_2254del15	12369
		2240_2257del18	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2235_2255>AAT	12385
		2237_2252>T	12386
		2239_2258>CA	12387
		2239_2256>CAA	12403
		2237_2253>TTGCT	12416
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
		2237_2251del15	12678
		2236_2253del18	12728
		2235_2248>AATTC	13550
2235_2252>AAT	13551		
2235_2251>AATTC	13552		
2253_2276del24	13556		
2237_2257>TCT	18427		
2238_2252del15	23571		
2233_2247del15	26038		
Exon 20	S768I	2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9GCGTGGACA	13428
2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	13558		
Exon 21	L858R	2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	12429
	L861Q	2582T>A	6213


Provjera valjanosti analize i uzoraka izvodi se pomoću softvera cobas® 4800. Valjana analiza može uključivati važeće i nevažeće rezultate uzorka. Dobiveni rezultati se objašnjavaju kako je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz i objašnjenje rezultata EGFR mutacijskog testa

Rezultat testiranja		Objašnjenje rezultata
Utvrđena mutacija	Ex19Del	Mutacija utvrđena u određenoj regiji EGFR gena.
	S768I	
	L858R	
	T790M	
	L861Q	
	G719X	
	Ex20Ins	
	Postojanje više od jedne mutacije	
Nije utvrđena mutacija	N/A	Mutacija nije dotkrivena u ciljanim regijama EGFR gena
Nevaljan test	N/A	Rezultat testa je nevažeći. Ponoviti testiranje uzoraka s nevažećim rezultatima.
Neuspješno testiranje	N/A	Testiranje nije uspjelo zbog kvara hardvera ili softvera.

Rezultati testa se mogu prikazati u obliku izvještaja koji sadrži sve podatke o izvedenom testiranju (Slika 14).

cobas® 4800



**cobas EGFR Tissue P1 Test Report**

Start of run:	16-Jun-2023 09:03:51
System:	c4CZC4020LKC
Serial No.:	z 480: 51055
Test version:	1.0.0
Operator:	Labmanager
Printed By:	Labmanager

MWP ID:	OE7054170
DNA Sample Prep Kit-ID #1:	AD1J075778N0165
Lot / Exp Date:	J07577 / Sep-2023
EGFR Mut Test v2 Kit-ID #1:	IA1J103552O00KI
Lot / Exp Date:	J10355 / Mar-2024

**Run name**      16-JUN-2023 09:03 EGFR Tissue P1

**Test status:**      VALID

**Controls**

Position	Sample ID	Kit	Control Type	Result	Flags	Accepted by
A01:A02:A03	IA1J103552O00KI	1	Mutant Control	Valid		
B01:B02:B03	IA1J103552O00KI	1	Negative Control	Valid		

**Specimens**

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2	Flags	Accepted by
C01:C02:C03		1	No Mutation Detected	N/A		
D01:D02:D03		1	No Mutation Detected	N/A		
E01:E02:E03		1	No Mutation Detected	N/A		
F01:F02:F03		1	No Mutation Detected	N/A		

cobas® 4800 software    2.2.0
19-Jun-2023 11:42:54

Slika 14. EGFR izvještaj

## 5. RASPRAVA

Većina karcinoma pluća spada u skupinu karcinoma pluća ne-malih stanica (engl. Non Small Cell Lung Carcinoma), čija je podskupina adenokarcinom. Taj oblik karcinoma je prisutan u 30% svih oboljelih od karcinoma pluća, te 50% dijagnosticiranih s karcinomom pluća ne-malih stanica. Rast adenokarcinoma je sporiji u odnosu na rast ostalih tipova karcinoma pluća, što poboljšava šansu otkrivanja u ranim fazama razvoja, prije širenja i metastaziranja. Načini na koje će pacijent biti liječen mogu varirati i biti uvjetovani stanjem pacijenta i stadijem tumora. Liječenje se provodi: kirurškim zahvatom, zračenjem, imunoterapijom, kemoterapijom i ciljanom terapijom. Pristupi u liječenju se mogu aplicirati zasebno ili u kombinaciji s drugim tipom liječenja. (30)

Prisustvo EGFR mutacije označava agresivniji oblik tumora, što rezultira s lošijom prognozom za pacijenta. Prekomjerna ekspresija ovog gena dovodi do nekontroliranog rasta i razvoja stanica. Korištenjem lijekova koji ciljano inhibiraju receptorsku tirozin kinazu, moguće je potaknuti apoptozu stanice te zaustaviti proliferaciju stanice. Od 50 pacijenata s karcinomom pluća ne-malih stanica, njih 34% je testirano pozitivno na ekspresiju EGFR gena. (31)

Napredak u načinima liječenja je doveo do razvoja personalizirane medicine, čija bit leži u analizi različitih biomarkera. Prediktivni prognostički markeri ranog odgovora su osobito važni. Tehnologije poput CT-a i PET-skeniranja već godinama doprinose ranom otkrivanju karcinoma. Molekularnom dijagnostikom je moguće osigurati pacijentu personalizirano liječenje, na temelju patologije bolesti i fiziologije pacijenta te okolišnih čimbenika. (32)

Postavljanje dijagnoze i terapije je uvjetovano ishodom testiranja gena, genske ekspresije i proteina. Otkrivanjem točnog mjesta mutacije na EGFR genu, omogućuje se jedinstveni pristup pacijentu zbog molekularnih specifičnosti tumora koji se liječi. Lijekovi koji se koriste za liječenje karcinoma s EGFR mutacijama su tirozin kinazni inhibitori (TKI), od koji je najčešći u kliničkoj praksi Osimertinib, koji se koristi za liječenje karcinoma pluća od prvog do četvrtog stadija. (33)



## 6. ZAKLJUČAK

Ovim radom je predstavljena važnost genetičkog testiranja EGFR gena kod osoba dijagnosticiranih s karcinomom pluća ne-malih stanica kako bi se mogla primijeniti odgovarajuća ciljana terapija.

Kako bi se provelo molekularno testiranje, potrebna je izolirati DNA iz uzorka tkiva dobivenog biopsijom ili resekcijom, ili uzorka plazme dobivene iz pune krvi. U svrhu izolacije DNA koriste se komercijalni kitovi. Koristeći izoliranu DNA, real-time PCR metodom detektiraju se mutacije na EGFR genu.

Prikazani tip liječenja predstavlja napredak u odnosu na tradicionalne metode liječenja, koristeći „pravi lijek za pravog pacijenta u pravo vrijeme“, naposljetku povećavajući kvalitetu pacijentovog života.

## 7. LITERATURA

1. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021
2. Zavod za histologiju i embriologiju – Histološki atlas [Internet]. Dostupno na: <http://histomed.uniri.hr/pluca.html>
3. Dugeč J., Metabolizam stanica raka, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020
4. Štraus B., Petrik J., Štrausova medicinska biokemija, Medicinska naklada, 2009.
5. <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>
6. <https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/>
7. Suhail Y, Cain MP, Gireesan KV, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* 2019 Aug 28;9(2):109–27
8. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019 Oct;28(10):1563–79
9. <https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/causes/>
10. Jyoti Malhotra, Matteo Malvezzi, Eva Negri, Carlo La Vecchia, Paolo Boffetta. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J.* 2016 Sep 1;48(3):889
11. Myers DJ, Wallen JM. Lung Adenocarcinoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/>
12. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/lung-cancer/types/adenocarcinoma-of-the-lung>
13. Hoeben A, Joosten EAJ, van den Beuken-van Everdingen MHJ. Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2021 Jan 11;13(2):242
14. Jalušić Kris Oliver, Personalizirana medicina – temeljni koncepti i primjena, Sveučilište u Zagrebu, 2015
15. Greenhalgh J, Dwan K, Boland A, Bates V, Vecchio F, Dundar Y, Jain P, Green JA. First-line treatment of advanced epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation positive non-squamous non-small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016
16. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995 Jul ;19(3):183-232. 156

17. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Oct;26(10):1742-51. 164
18. Hong S, Fang W, Hu Z, Zhou T, Yan Y, Qin T, i sur. A large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese Han population, 2014;4:7268
19. Chen Z, Liu X, Zhao J, Yang H, Teng X. Correlation of EGFR mutation and histological subtype according to the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):8039-8045
20. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009 Aug;28(Suppl 1):S24-S31
21. Roengvoraphoj M, Tsongalis GJ, Dragnev KH, Rigas JR. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: Focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treatment Reviews*. 2013 Dec1;39(8):839–50
22. Abourehab MAS, Alqahtani AM, Youssif BGM, Gouda AM. Globally Approved EGFR Inhibitors: Insights into Their Syntheses, Target Kinases, Biological Activities, Receptor Interactions, and Metabolism. *Molecules*. 2021 Nov4;26(21):6677
23. EGFR | Inhibitors | MedChemExpress [Internet]. Dostupno na: [https://www.medchemexpress.com/Targets/EGFR.html?utm\\_source=google&utm\\_medium=CPC&utm\\_campaign=target&utm\\_content=EGFR&utm\\_term=EGFR%20inhibitor&gclid=CjwKCAjw36GjBhAkEiwAKwIWycAaK7DD3Vs6mEcRH7g2s7fXbiHMPQ00iiTPsmh8z8qDLgZfDDbtuhoCRxIQAvD\\_BwE](https://www.medchemexpress.com/Targets/EGFR.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=target&utm_content=EGFR&utm_term=EGFR%20inhibitor&gclid=CjwKCAjw36GjBhAkEiwAKwIWycAaK7DD3Vs6mEcRH7g2s7fXbiHMPQ00iiTPsmh8z8qDLgZfDDbtuhoCRxIQAvD_BwE)
24. What is Real-Time PCR (qPCR)? | Bio-Rad. Dostupno na: <https://www.bio-rad.com/en-hr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
25. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013 Mar;133(3):e6
26. Excedr. What is the Role of MgCl2 in PCR? [Internet]. Excedr. 2022. Dostupno na: <https://www.excedr.com/resources/what-is-the-role-of-mgcl2-in-pcr/>
27. EMBL-EBI. Real-time PCR | Functional genomics II [Internet]. Dostupno na: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr/>

28. Kim L, Tsao MS. Tumour tissue sampling for lung cancer management in the era of personalised therapy: what is good enough for molecular testing? *European Respiratory Journal*. 2014 Oct 1;44(4):1011–22
29. Gregg JP, Li T, Yoneda KY. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: optimizing the diagnostic journey. *Translational Lung Cancer Research* [Internet]. 2019 Jun [cited 2023 May 25];8(3). Dostupno na: <https://tlcr.amegroups.com/article/view/29030>
30. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/lung-cancer/types/adenocarcinoma-of-the-lung>
31. Bačić I, Stipčević A, Skitarelić N. Izražaj receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) u nesitnostaničnom raku pluća. *Medica Jadertina* [Internet]. 2013 [pristupljeno 09.06.2023.];43(3):155-157. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/107299>
32. Kalia M. Personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*. 2013 Jan;62 Suppl 1:S11-14.
33. <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/symptoms-diagnosis/biomarker-testing/egfr>

## 8. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Ivan Mihaljević

Mjesto i datum rođenja: Knin, 20.08.2001.

Broj mobilnog telefona: 098 918 8849

E-mail: [imihaljevic88@gmail.com](mailto:imihaljevic88@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2008. – 2016. Osnovna škola Antuna Mihanovića, Drniš

2016. – 2020. Srednja škola Ivana Meštrovića, Opća gimnazija, Drniš

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

### STRANI JEZICI:

Engleski

Njemački