

# Molekularno profiliranje nesitnostaničnih karcinoma pluća

---

**Sikirić, Magdalena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:714498>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU MEDICINSKI FAKULTET**

**Magdalena Sikirić**

**Molekularno profiliranje nesitnostaničnih  
karcinoma pluća**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2024.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. prim. Lovorke Batelje Vuletić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

## POPIS I OBJAŠNJENJA KRATICA

AAH - Atipična adenomatozna hiperplazija pluća  
AIS - Adenokarcinom in situ  
ALCL - Anaplastic Large Cell Lymphoma  
ALK - Anaplastic Lymphoma Kinase  
ASC - Adenoskvamozni karcinom pluća  
AW106 cRNA - Artificial cRNA Standard  
BRAF - B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase  
BRAF v600 E - B-Raf Proto-Oncogene, mutacija V600E  
CD117 - Cluster of Differentiation 117  
CD56 - Neural Cell Adhesion Molecule 1  
CDX2 - Caudal Type Homeobox 2  
CCND1 - Cyclin D1  
CK - Citokeratin  
CK5/6 - Citokeratin 5/6  
cDNA - Complementary DNA  
Ct/Cq - Cycle Threshold/Cycle Quantification  
ctDNA - Circulating Tumor DNA  
DNA - Deoxyribonucleic Acid  
ddPCR - Droplet-Digital PCR  
EBUS - Endobronchial Ultrasound  
EBV - Epstein-Barr Virus  
EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor  
EMA - Epithelial Membrane Antigen  
ESMO - Europsko Društvo za Medicinsku Onkologiju  
EUS - Endoscopic Ultrasound  
EWSR1 - Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1  
FDA - Američka Agencija za Hranu i Lijekove  
FDG-PET - Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography  
FISH - Fluorescent In Situ Hybridization  
FRET - Förster Resonance Energy Transfer  
FUS - Fused in Sarcoma  
GAP - GTPase-Activating Proteins

GAPDH - Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase  
GDP - Guanosine Diphosphate  
GEF - Guanine Nucleotide Exchange Factors  
GTP - Guanosine Triphosphate  
GTPase - Guanosine Triphosphatase  
HNF4A - Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha  
IHC - Immunohistochemistry  
IMA - Invazivni mucinozni adenokarcinom  
INMA - Invazivni ne-mucinozni adenokarcinom pluća  
INSM1 - Insulinoma-associated 1  
ITM - Inflammatory Myofibroblastic Tumor  
JAK-STAT - Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription  
KIT - KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase  
KRAS - Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog  
KRAS G12C - Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, mutacija G12C  
LCC - Karcinom velikih stanica pluća  
LDCT - Low-Dose Computed Tomography  
MAPK-ERK - Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellular Signal-Regulated Kinase  
MIA - Minimalno invazivni adenokarcinom pluća  
mTOR - Mechanistic Target of Rapamycin  
NCCN - Nacionalni Komprehenzivni Centar za Rak  
NGS - Next-Generation Sequencing  
NTRK - Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase  
NSCLC - Non-Small Cell Lung Cancer  
PDGFR - Platelet-Derived Growth Factor Receptor  
PDGFRA - Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha  
PI3K - Phosphatidylinositol-3-Kinase  
PIK3CA - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha  
PLCγ - Phospholipase C Gamma  
PPC - Pleomorfni karcinom pluća  
qPCR - Quantitative PCR  
RB1 - Retinoblastoma Protein 1  
RET - Rearranged during Transfection  
RNA - Ribonucleic Acid  
ROS1 - ROS Proto-Oncogene 1

RT-PCR - Reverse Transcription PCR  
SCC - Karcinom pločastih stanica pluća  
SMARCA4-UT - SMARCA4-deficijentni nediferencirani tumor  
SMA - Smooth Muscle Actin  
SOX2 - SRY-Box Transcription Factor 2  
Taq - Thermus aquaticus  
TGF- $\alpha$  - Transforming Growth Factor- $\alpha$   
TKI - Tyrosine Kinase Inhibitors  
TMB - Tumorsko Mutacijsko Opterećenje  
TP63 - Tumor Protein 63  
TPS - Tumor Proportion Score  
TTF-1 - Thyroid Transcription Factor-1  
VAMS - Video-Assisted Mediastinoscopy  
VATS - Video-Assisted Thoracic Surgery  
VPVP - Vidna polja velikog povećanja  
WHSC1L1 - Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 Like 1  
WNT - Wingless-Type MMTV Integration Site Family

# SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1	UVOD.....	1
2	WHO KLASIFIKACIJA NEOPLAZMI PLUĆA.....	2
2.1	EPITELNE NEOPLAZME PLUĆA.....	2
2.1.1	Prekursorske lezije adenokarcinoma.....	2
2.1.2	Adenokarcinomi.....	3
2.1.3	Skvamozne prekursorske lezije.....	4
2.1.4	Skvamozni karcinomi.....	4
2.1.5	Karcinom velikih stanica pluća.....	5
2.1.6	Adenoskvamozni karcinom pluća.....	5
2.1.7	Sarkomatoidni karcinomi pluća.....	5
2.1.8	Tumori tipa žlijezda slinovnica.....	6
2.1.9	Neuroendokrine neoplazme pluća.....	8
3	MOLEKULARNE ALTERACIJE KOJE SE ANALIZIRAJU PREMA AKTUALNIM SMJERNICAMA.....	10
3.1	EGFR.....	10
3.2	ALK.....	11
3.3	ROS1.....	13
3.4	KRAS.....	14
4	OSNOVNE MOLEKULARNE METODE.....	16
4.1	RT-PCR.....	16
4.2	NGS.....	19
5	AKTUALNE SMJERNICE.....	24
5.1	AKTUALNE NCCN SMJERNICE.....	24
5.2	AKTUALNE ESMO SMJERNICE.....	28
5.3	NACIONALNE SMJERNICE U REPUBLICI HRVATSKOJ.....	31
6	DIJAGNOSTIČKI ALGORITAM U PRAKSI.....	32
7	ZAKLJUČAK.....	33
8	ZAHVALE.....	35
9	LITERATURA.....	36
10	ŽIVOTOPIS.....	40

## SAŽETAK

Molekularno profiliranje nesitnostaničnih karcinoma pluća

Magdalena Sikirić

Cilj ovog diplomskog rada je dati pregled aktualnih smjernica dijela patološke dijagnostike, molekularne patološke dijagnostike nesitnostaničnih karcinoma pluća.

Aktualne smjernice molekularnog profiliranja različite su za različite neoplazme pluća. Patohistološka dijagnoza daje se sukladno aktualnoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine prema kojoj se neoplazme pluća dijele na epitelne, mezenhimalne neoplazme, hematolimfoidne tumore i tumore ektopičnog tkiva. Smjernice i preporuke za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnika s nesitnostaničnim karcinomom pluća pružaju NCCN (Nacionalni komprehenzivni centar za rak) i ESMO (Europsko društvo za medicinsku onkologiju). Smjernice se temelje na rezultatima najnovijih kliničkih studija, naglašavajući važnost molekularnog testiranja za personalizirani pristup liječenju. Naglasak je stavljen na ključne molekularne alteracije i njihovu ulogu u razvoju karcinoma te metode detekcije i terapijske pristupe povezane s njima. Zahvaljujući incidenciji te postojećim lijekovima vezanim uz njihovo postojanje dominantne su molekularne promjene slijedećih gena: EGFR, ALK, ROS1 i KRAS.

Detekcija molekularnih promjena temelji se na dvjema laboratorijskim metodama: lančanoj reakciji polimeraze (PCR) i sekvenciranju nove generacije (NGS). PCR metoda omogućuje brzo i precizno umnažanje specifičnih dijelova DNA ili RNA za otkrivanje pojedinačnih genetskih mutacija. NGS tehnologija predstavlja veliki napredak u sekvenciranju DNA i RNA, omogućujući brzu i sveobuhvatnu analizu istovremeno većeg broja gena pa i cijelog genoma. Opisane su različite NGS metode i njihovi principi rada, uključujući Roche 454, SOLiD, Illumina i Ion PGM, kao i tehnologije treće generacije poput SMRT i sekvenciranja nanoporama, koje imaju mogućnost sekvenciranja pojedinačnih molekula DNA u stvarnom vremenu.

Aktualne smjernice naglašavaju važnost integriranja molekularnih analiza u svakodnevnu dijagnostiku kliničke patologije kako bi pacijenti, sada s naglaskom na pacijente s nesitnostaničnim karcinomom pluća, imali mogućnost ciljanog liječenja.

Ključne riječi: neoplazme pluća, klasifikacija, smjernice, molekularno profiliranje



## SUMMARY

### Molecular Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer

Magdalena Sikirić

The aim of this master's thesis is to provide an overview of current guidelines in certain areas of pathological diagnostics, specifically molecular pathological diagnostics of non-small cell lung cancer.

Current guidelines for molecular profiling differ for various lung neoplasms.

Pathohistological diagnosis is made per the latest classification by the World Health Organization from 2021, which divides lung neoplasms into epithelial, mesenchymal neoplasms, hematolymphoid tumours, and tumours of ectopic tissue. Guidelines and recommendations for diagnosing, treating, and monitoring patients with non-small cell lung cancer are provided by the NCCN (National Comprehensive Cancer Network) and ESMO (European Society for Medical Oncology). These guidelines are based on the results of the latest clinical studies, emphasising the importance of molecular testing for a personalised treatment approach. Emphasis is placed on key molecular alterations and their roles in cancer development, as well as the associated detection methods and therapeutic approaches. Due to their incidence and the existing drugs related to their presence, the dominant molecular changes are in the following genes: EGFR, ALK, ROS1 and KRAS.

Detection of molecular changes is based on two laboratory methods: polymerase chain reaction (PCR) and next-generation sequencing (NGS). The PCR method allows rapid and precise amplification of specific parts of DNA or RNA to detect individual genetic mutations. NGS technology represents a significant advancement in sequencing DNA and RNA, enabling rapid and comprehensive analysis of a larger number of genes simultaneously, including the entire genome. Various NGS methods and their principles of operation are described, including Roche 454, SOLiD, Illumina, and Ion PGM, as well as third-generation technologies such as SMRT and nanopore sequencing, which are capable of sequencing individual DNA molecules in real time.

Current guidelines highlight the importance of integrating molecular analyses into everyday clinical pathology diagnostics so that patients, with a current focus on patients with non-small cell lung cancer, have access to targeted treatment.

Keywords: lung neoplasms, classification, guidelines, molecular profiling

# 1 UVOD

Nesitnostanični karcinomi pluća (NSCLC) najčešći su oblik karcinoma pluća, čineći oko 85% svih dijagnosticiranih slučajeva. Karakterizira ih heterogenost, što predstavlja izazov u njihovoj dijagnozi i liječenju.

Uobičajene metode dijagnostike uključuju radiološku dijagnostiku (kompjuterizirana tomografija, magnetska rezonanca) te patološku dijagnostiku koja uključuje analizu citoloških i tkivnih uzoraka, njihove morfologije, imunohistokemijskog profila te, prema potrebi, molekularnog profila.

Važno je precizno klasificirati NSCLC kako bi se sukladno patohistološkoj dijagnozi mogao slijediti algoritam molekularnog profiliranja te sukladno rezultatima molekularnog profiliranja pacijentu pružiti najučinkovitiju terapiju uključujući i mogućnost ciljanog liječenja.

## 2 WHO KLASIFIKACIJA NEOPLAZMI PLUĆA

Aktualna klasifikacija neoplazmi pluća klasifikacija je Svjetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine. Prema aktualnoj klasifikaciji neoplazme pluća dijele se na epitelne, mezenhimalne neoplazme, hematolimfoidne tumore i tumore ektopičnog tkiva.

### 2.1 EPITELNE NEOPLAZME PLUĆA

U epitelne neoplazme spadaju papilom, adenomi, premaligne epitelne lezije, karcinom in situ, mikroinvazivni adenokarcinom, karcinom pločaste diferencijacije, adenoskvamozni karcinom, sarkomatoidni karcinom, velikostanični karcinom, drugi epitelni tumori, tumori tipa žlijezda slinovnica te plućne neuroendokrine neoplazme.

#### 2.1.1 Prekursorske lezije adenokarcinoma

**Atipična adenomatozna hiperplazija pluća** (AAH) mala je lezija promjera do 5 mm koja se tipično nalazi subpleuralno na periferiji puća i prekursor je za nastanak adenokarcinoma in situ. Mikroskopski, uočava se lokalizirana proliferacija pneumocita tipa II s blagom do umjerenom staničnom atipijom koji oblažu prethodno postojeće stijenke alveola (lepidički rast). Atipičnu adenomatoznu hiperplaziju pluća treba razlikovati od reaktivne hiperplazije pneumocita koja se javlja u upalnim ili fibroznim promjenama parenhima (1).

**Adenokarcinom in situ** (AIS) je lezija promjera 0.5-30mm. Mikroskopski, atipični pneumociti pokazuju lepidički rast bez limfne, vaskularne, stromalne ili pleuralne invazije. Karakteristični smještaj je subpleuralno. Postoji mucinozni i nemucinozni podtip, mucinozni je ekstremno rijedak (1).

## 2.1.2 Adenokarcinomi

**Minimalno invazivni adenokarcinom pluća (MIA)** je tumor promjera do 30 mm s predominantno lepidičkim rastom i invazijom manjom od 5 mm. Uglavnom je nemucinozan, a rijetko može biti mucinozan i mješoviti. Imunohistokemijski, nemucinozan je pozitivan na pneumocitne markere TTF-1 i Napsin A, dok je, s druge strane, mucinozan na njih pozitivan u manje od 1/3 slučajeva, ali pokazuje pozitivitet na CK20 i HNF4A. Izlječenje se postiže resekcijom (1).

**Invazivni ne-mucinozni adenokarcinom pluća (INMA)** nesitnostanični je karcinom pluća. Obično pokazuju složenu mješavinu histoloških uzoraka rasta (lepidički, acinarni, papilarni, mikropapilarni i solidni) te se gradiraju prema prevladavajućem uzorku rasta. Predominantni način rasta adenokarcinoma pluća povezan je s prognozom, pri čemu predominantno lepidički rast ima najbolju prognozu, acinarni i papilarni rast imaju srednju, a solidni i mikropapilarni imaju najlošiju prognozu (2). Karakteristična lokalizacija adenokarcinoma je periferija pluća.

**Invazivni mucinozni adenokarcinom (IMA)** podtip je adenokarcinoma pluća koji ima tendenciju multicentričnog, multilobarnog i bilateralnog pojavljivanja. Karakteristična histološka slika uključuje prisutnost vrčastih ili cilindričnih tumorskih stanica s obilnim citoplazmatskim mucinom i jezgrama smještenim bazalno. Imunohistokemijski pokazuje ekspresiju CK7 i CK20, a razina ekspresije TTF-1 i Napsin A manja je nego kod invazivnog ne-mucinoznog karcinoma pluća. Identificirano je nekoliko onkogenih mutacija uključujući KRAS, BRAF, ERBB2 i PIK3CA, a, za razliku od invazivnog ne-mucinoznog karcinoma, mutacije EGFR su rijetke (3).

**Koloidni adenokarcinom pluća** rijedak je podtip adenokarcinoma karakteriziran obilnim ekstracelularnim nakupinama mukusa koje razaraju alveolarne stijenske. Histološki je vidljiv upalni infiltrat s histiocitima, a citološka atipija neoplastičnog epitela je minimalna. Imunohistokemijski, pokazuje ekspresiju CK7, CK20 i CDX2, a TTF-1, EMA, Napsin A su negativni ili žarišno pozitivni (4).

**Fetalni adenokarcinom pluća** sastoji se od žljezdanih, tubularnih elemenata s pseudostratificiranim cilindričnim stanicama koje su bogate glikogenom i prisutne su subnuklearne vakuole. Javlja se tipično u mlađoj dobi. Razlikuju se fetalni karcinom

visokog stupnja i fetalni karcinom niskog stupnja. Mutacije u beta-kateninu i aberacije u WNT signalnom putu ključne su za razvoj fetalnog adenokarcinoma niskog stupnja (2).

**Adenokarcinom pluća enteričkog tipa** rijedak je podtip adenokarcinoma pluća, nalikuje kolorektalnom adenokarcinomu, a dijagnoza se postavlja kad enterička komponenta čini više od 50% tumora. Kao i kolorektalni adenokarcinom, može imati žljezdane, papilarne ili kribriformne strukture s intraluminalnim staničnim debrisom, a kad je prisutna lepidička komponenta, ona ukazuje na primarno sjelo pluća. Od crijevnih biljega sadržavaju CDX2, CK20 i MUC2, a CK7 i TTF-1 također pomažu u razlikovanju od metastatskog kolorektalnog karcinoma (2).

### 2.1.3 Skvamozne prekursorske lezije

Skvamozna displazija i skvamozni karcinom in situ preinvazivne su lezije koje nastaju u bronhalnom epitelu i prekursori su za razvoj karcinoma pločastih stanica (5).

### 2.1.4 Skvamozni karcinomi

**Karcinom pločastih stanica pluća (SCC)** povezan je s pušenjem i, poslije adenokarcinoma, drugi je najčešći tip ne-sitnostaničnog karcinoma pluća (6). U većini slučajeva smješten je centralno u blizini glavnog bronha te dovodi do endobronhalne opstrukcije zbog čega su prisutni hemoptiza, kašalj i rekurentni pneumonitis. Histološki, sastavljen je od atipičnih epitelnih pločastih stanica i može se podijeliti u dvije grupe: s orožnjavanjem i bez orožnjavanja. U slučaju da orožnjavanja nema, za postavljenje dijagnoze potrebno je provesti imunohistokemijsku analizu na markere karakteristične za pločastu diferencijaciju, a to su P40, CK5/6, p63. U karcinomu pločastih stanica pluća često se nađu amplifikacije kromosoma 3q (SOX2, TP63), 8p (FGFR1, WHSC1L1), 7p (EGFR), 11q (CCDN1), 4q (KDR, KIT, PDGFRA) (7).

**Limfoepitelni karcinom pluća** rijedak je karcinom uglavnom smješten periferno i najčešće pogađa azijsku populaciju, nepušače. Histološki, karakteriziran je difuznim ili solidnim nakupinama sincicijskih tumorskih stanica s okruglom ili ovalnom vezikularnom jezgrom, prominentnim nukleolima i izraženom limfocitnom

proliferacijom. Ovi tumori dijele se na EBV pozitivne i EBV negativne.

Imunohistokemijski, pozitivni su na pancitokeratin, EMA, a pozitivni mogu biti i CK5/6, p63, p40, dok su negativni na TTF-1, CK7, sinaptofizin. Diferencijalno dijagnostički u obzir treba uzeti metastatski ne-keratinizirajući SCC nazofarinksa i ne-Hodgkinov limfom. Kako se većina slučajeva dijagnosticira u ranoj fazi, prvi terapijski pristup je resekcija (8).

### 2.1.5 Karcinom velikih stanica pluća

**Karcinom velikih stanica** (LCC) slabo je diferencirani nesitnostanični karcinom koji ni morfološki ni histokemijski ne pokazuje značajke žljezdane, pločaste ni neuroendokrine diferencijacije. Dijagnoza se, dakle, postavlja isključivanjem ostalih podtipova nesitnostaničnih karcinoma tj. dobivanjem negativnih imunohistokemijskih markera adeno, skvamozne i neuroendokrine diferencijacije (9).

### 2.1.6 Adenoskvamozni karcinom pluća

**Adenoskvamozni karcinom pluća** (ASC) rijedak je tumor koji sadrži komponente adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma, a svaki mora biti zastupljen minimalno 10%. Adenoskvamozni karcinom pluća uglavnom se javlja kod starijih muškaraca, pušača. Diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze karcinom pločastih stanica pluća, adenokarcinom, mukoepidermoidni karcinom visokog stupnja. Adenoskvamozni karcinom pluća ima agresivniji tijek i lošiju prognozu u usporedbi s adenokarcinomom i karcinomom pločastih stanica (10).

### 2.1.7 Sarkomatoidni karcinomi pluća

**Pleomorfni karcinom pluća** (PPC) rijedak je i slabo diferenciran nesitnostanični karcinom pluća koji sadrži najmanje 10% vretenastih i/ili divovskih stanica ili se sastoji samo od vretenastih i divovskih stanica. Obično je smješten periferno, a pušenje je glavni rizični čimbenik. Mogu se naći mutacije onkogeno KRAS i EGFR, a

pokazuje i PD-L1 ekspresiju. Pleomorfni karcinom pluća ima agresivan tijek, rano metastazira, rezistentan je na kemoterapiju i radioterapiju te je prognoza loša (11).

**Plućni blastom** rijedak je agresivni tumor bifazične histologije koji se sastoji od epitelne i mezenhimalne komponente. Prosječna dob u kojoj se dijagnosticira je 40 godina, češće u muškaraca, pušača. Smješten je periferno kao velika, dobro ograničena masa. Epitelna komponenta tubularne je građe, stanice su bogate glikogenom i nalikuju fetalnom adenokarcinomu, dok mezenhimalna komponenta sadržava ovalne i vretenaste stanice bez ekspresije citokeratina i plućnih markera. U diferencijalnoj dijagnozi treba razmišljati o karcinosarkomu i fetalnom adenokarcinomu visokog stupnja. Plućni blastom daje udaljene metastaze i često recidivira unatoč resekciji te je prognoza loša (12).

**Karcinosarkom pluća** rijedak je slabo diferenciran nesitnostanični karcinom koji sadrži sarkomatoidne elemente kao npr. rabdomiosarkom, hondrosarkom, osteosarkom, liposarkom ili angiosarkom. Javljaju se uglavnom u starijih muškaraca, pušača. Najčešće su smješteni centralno, ali mogu biti i periferno ili endobronhalno. Imunohistokemijskim metodama dokazuje se prisutnost karcinomatoznih i sarkomatoznih komponenti. Kirurška resekcije je način liječenja, ali unatoč tome prognoza je loša (13).

**SMARCA4-deficijentni nediferencirani tumor (SMARCA4-UT)** agresivna je neoplazma koja se prezentira nediferenciranim ili rabdoidnim morfološkim karakteristikama uz deficijenciju SMARCA4. Uglavnom pogađa mlađe muškarce, pušače i smješten je u medijastinumu, plućnom hilusu, plućima, pleuri ili stjenci prsnog koša. SMARCA4-UT sastoji se od difuznih nakupina diskohezivnih epiteloidnih tumorskih stanica s vezikularnim nukleolima, a česta je nekroza i brojne su mitoze. Dijagnoza se najčešće postavlja u uznapređovalom stadiju s prisutnim metastazama u limfnim čvorovima, kostima ili nadbubrežnim žlijezdama (14).

### 2.1.8 Tumori tipa žlijezda slinovnica

**Pleomorfni adenom pluća** benigni je tumor koji nastaje iz trahealnih i bronhalnih seromukoznih žlijezda. Može se naći u bilo kojoj dobi i spolu, iako češće u odraslih. Histološki pokazuje trabekule ili otoke epitelnih i mioepitelnih stanica u miksoidnom ili

hondroidnom matriksu. Imunohistokemijski, mioepitelne komponente su pozitivne na citokeratin, p63 i S100 protein, a epitelne na citokeratin, EMA. Diferencijalno dijagnostički u obzir dolazi metastatski tumor žlijezde slinovnice i adenoidni cistični karcinom pluća. Liječi se resekcijom (15).

**Adenoidni cistični karcinom** pluća rijedak je maligni tumor koji nastaje od malih žlijezda slinovnica unutar traheobronhalnog stabla. Javlja se u odrasloj dobi, nešto češće u žena i nema dokaza o povezanosti s pušenje. Prema obrascima rasta može se podijeliti na tubularni, kribriformni i solidni tumor. Histološki, prisutne su jednake stanice s oskudnom citoplazmom i malim hiperkromatskim jezgrama.

Imunohistokemijski, pozitivni su mioepitelni markeri (p63, S-100 i kalponin), vimentin, CK7, SMA, CK5/6 i CD117. U diferencijalnu dijagnozu ulaze karcinoidni tumori, bazaloidni karcinom pločastih stanica i karcinom malih stanica. Glavna terapijska opcija je resekcija (16).

**Epitelno-mioepitelni karcinom** pluća rijedak je tumor tipa žlijezda slinovnica niskog stupnja malignosti, uglavnom indolentnog tijeka. Najčešće su smješteni centralno pa su prisuti simptomi bronhalne opstrukcije, a mogu se naći i periferno i unutar parenhima. Karakterizira ga bifazična morfologija koja uključuje unutarnji sloj kubičnih epitelnih stanica te vanjski sloj mioepitelnih stanica pozitivnih na S-100 i SMA.

Razlikuju se i 3 histološka podtipa: jedan se prezentira tipičnom opisanom bifazičnom morfologijom, drugi ima solidnu komponentu sastavljenu od vretenastih i poligonalnih mioepitelnih stanica, a u trećem prevladavaju mioepitelne stanice s izraženom nuklearnom atipijom. Kako su ti tumori najčešće niskog stupnja malignosti, uglavnom nema recidiva nakon potpune resekcije (17).

**Mukoepidermoidni karcinom** pluća rijedak je tumor tipa žlijezda slinovnica koji se podjednako javlja kod žena i muškaraca, najčešće centralno. Sastoji se od stanica koje luče mucin, skvamoznih stanica i stanica prijelaznog tipa. Dijeli se na tumore niskog i visokog stupnja. Tumori niskog stupnja mogu imati cističnu i solidnu komponentu, a mitoze su rijetke. Ponekad se može naći stromalna kalcifikacija, osifikacija i granulomatozna reakcija na ekstravazirani mucin. Tumori visokog stupnja su rijetki, pretežno sačinjeni od atipičnih skvamoznih stanica i stanica prijelaznog tipa, s čestim mitozama i nekrozama. Imunohistokemijski, tumorske stanice pozitivne su na p63, p40, pancitokeratin, CK7, CK5/6. Terapijska opcija je kompletna resekcija (18).



**Hijalinizirajući karcinom svijetlih stanica** pluća vrlo je rijedak tumor tipa žlijezda slinovnica niskog stupnja, uglavnom se javlja u žena srednjih godina. Sastavljen je od tračaka, gnijezda, otočića i trabekula monomorfnih stanica bogatih glikogenom koje okružuje hijalinizirana i fibrocelularna stroma. Imunohistokemijski, pozitivni su na p40, CK5/6, CK7, p63, a negativne na sinaptofizin, kromogranin, CK20, S100. Nakon resekcije nisu zabilježeni recidivi (19).

**Mioepitelne neoplazme** rijetki su tumori pluća koji predominantno pokazuju mioepitelnu diferencijaciju, a imaju morfoloških i imunohistokemijskih sličnosti s drugim primarnim i metastatskim karcinomima pluća stoga ih je bitno razlikovati. Kriteriji za potvrdu dijagnoze mioepitelnih tumora uključuju odsutnost duktalne komponente, potvrdu mioepitelne diferencijacije pozitivnim S-100, a korisna je i potvrda mutacija u EWSR1 i FUS genu. Također, prisutnost nekroze i mitotičke aktivnosti  $\geq 5$  po  $2 \text{ mm}^2$  pokazatelji su lošijeg tijeka bolesti (20).

### 2.1.9 Neuroendokrine neoplazme pluća

**Neuroendokrini tumori pluća** / karcinoidi imaju dobro poznate morfološke karakteristike i slični su neuroendokrinim tumorima drugih sijela. Najčešće su smješteni centralno, ali mogu se naći i periferno. Razlikuju se tipični i atipični karcinoid. Tipični karcinoid ima uobičajene karakteristike neuroendokrinih tumora uključujući grubo zrnati kromatin, manjak prominentnih nukleola, a od arhitektonskih uzoraka vidljive su trabekule, gnijezda i rozete. Također, tipična je izražena vaskularnost, a za dijagnozu je dozvoljena maksimalno jedna mitozna na 10 vidnih polja velikog povećanja i izostanak nekroze. Atipični karcinoid, s druge strane, ima 2 do 10 mitozna na 10 vidnih polja velikog povećanja i punktiformne nekroze u središtu tumora. Terapijska opcija je kirurška resekcija, a mogu se koristiti i farmakoterapijski pripravci poput analoga stomatostatina ili standardni režim kemoterapije koji uključuje cisplatinu i etopozid (21).

#### **Neuroendokrini karcinomi pluća**

**Sitnostanični karcinom pluća** maligni je tumor pluća, uglavnom smješten centralno, vrlo agresivnog tijeka uz brz rast i rane udaljene metastaze. Najvažniji je čimbenik rizika pušenje duhanskih proizvoda, a za tumorogenezu je značajna inaktivacija gena

p53 i RB1 koji kodiraju tumorsupresorske proteine. Histopatološkom i/ili citološkom analizom postavlja se definitivna dijagnoza. Stanice su oskudne citoplazmom, pokazuju veliku mitotičku aktivnost i nekrozu, a jezgre su ovalne ili izdužene i hiperkromatske. Sitnostanični karcinomi pluća pozitivni su na neuroendokrine markere kao što su sinaptofizin, kromogranin, CD56 i INSM1. Pacijenti s ovim karcinom često razviju s vremenom paraneoplastični sindrom. Endokrinološki paraneoplastični sindrom nastaje zbog ektopičnog lučenja biološki aktivnih tvari, a uključuje neprimjereno lučenje antidiuretskog hormona, ektopični Cushingov sindrom. Neurološki paraneoplastični sindrom karakteriziran je protutijelima na tumorske antigene i podrazumijeva Lambert-Eatonov sindrom, mijasteniju gravis, encefalomijelitis, limbički encefalitis i subakutnu senzornu neuropatiju. Uzevši sve u obzir, prognoza sitnostaničog karcinoma je loša s petogodišnjim preživljenjem manjim od 7% (22).

**Velikostanični neuroendokrini karcinom** pluća rijedak je agresivni maligni tumor pluća koji se uglavnom javlja u starijih muškaraca, pušača. Klinički simptomi nisu specifični te su pacijenti često asimptomatski iako mogu se javiti bol u prsima, kašalj, hemoptiza. S obzirom na visoku malignost ovog tumora, često su prisutne udaljene metastaze pogotovo u jetri, kostima, mozgu i nadbubrežnim žlijezdama. Radiološki, najčešće se vidi centralno smješten tumor i uobičajeno povećani medijastinalni i hilarni limfni čvorovi. Patološki kriteriji zahtijevaju prisutnost neuroendokrine diferencijacije, koja se potvrđuje imunohistokemijski pozitivitetom na kromogranin A, sinaptofizin i CD 56, prisustvo nekroze i mitotski indeks  $>10$  mitoza/10 VPVP te veličina tumorske stanice mora biti promjera većeg od promjera 3 limfocita zajedno. Terapijska opcija je radikalna kirurška resekcija za stadije I, II i III uz primjenu adjuvantne kemoterapije (23).

## 3 MOLEKULARNE ALTERACIJE KOJE SE ANALIZIRAJU PREMA AKTUALNIM SMJERNICAMA

### 3.1 EGFR

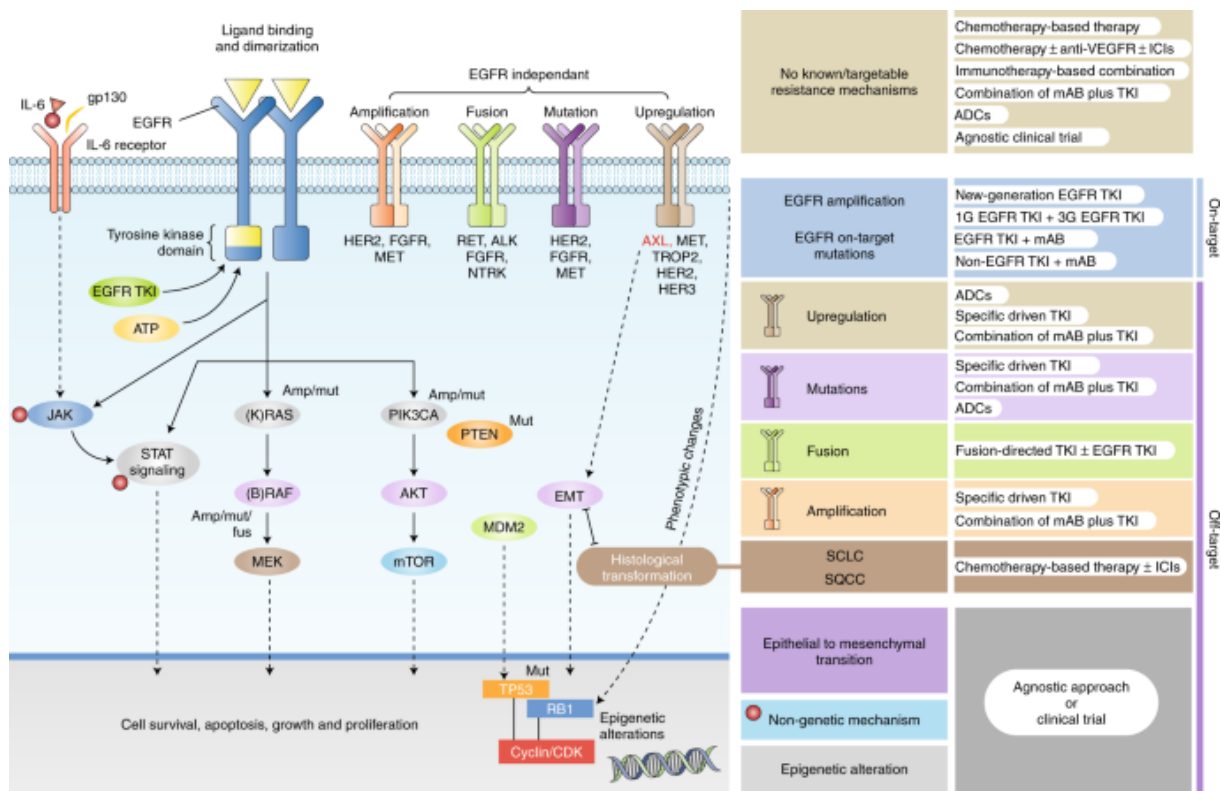
EGFR (Epidermal growth factor receptor) ili ErbB1/HER-1 (human epidermal growth factor receptor) transmembranski je protein koji pripada porodici tirozin kinaznih receptora. Sastoji se od ekstracelularne receptorske domene koja veže ligand, zatim transmembranske domene i intracelularne koja ima tirozin kinaznu aktivnost. Više je liganda koji mogu aktivirati EGFR, ali najvažniji su EGF (epidermal growth factor) i TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ). Vežanjem liganda za receptorsko mjesto, EGFR prelazi iz inaktivnog monomernog oblika u oblik aktivnog homodimera ili heterodimera, što dovodi do autofosforilacije intracitoplazmatske tirozin kinazne domene. Slijedi aktivacija nizvodnih signalnih putova uključujući fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K)-Akt i RAS-RAF-MAPK put. Ti signalni putovi značajni su za regulaciju ekspresije gena, staničnu proliferaciju, angiogenezu i inhibiciju apoptoze i sve to može doprinijeti razvoju maligniteta (24).

EGFR mutacije u 50% slučajeva javljaju se u pacijenata azijskog podrijetla s NSCLC adenokarcinomom, dok se u pacijenata zapadne populacije s NSCLC adenokarcinomom nađe u 15% slučajeva. Većina EGFR mutacija događa u egzonima 18-21 u domeni tirozin kinaze. Najčešće detektirane mutacije u pacijenata s NSCLC su delecija u egzonu 19 i točkasta mutacija u egzonu 21 gdje je došlo do zamjene leucina argininom na kodonu 858 (L858R). Obje mutacije rezultiraju aktivacijom tirozin kinazne domene, a tumori koji nose ove mutacije osjetljivi su na inhibitore tirozin kinaze (TKI) poput erlotiniba i gefitiniba. Manje učestale mutacije koju su također osjetljive na tirozin-kinazne inhibitore uključuju točkaste mutacije na egzonima 21 (L861Q) i 18 (G719X) (25).

S druge strane, T790M mutacija na egzonu 20 gdje je došlo do zamjene metionina treoninom, povezana je sa stečenom rezistencijom na tirozin-kinazne inhibitore prve i druge generacije i registrirana je u 50% pacijenata s progresijom bolesti, nakon inicijalnog poboljšanja uz terapiju s erlotinibom ili gefitinobom. U slučaju pozitivne

T790M mutacije, u liječenju tih pacijenata koriste se tirozin-kinazni inhibitori treće generacije npr. osimertinib (25,26).

Analiza EGFR mutacija može se provoditi kao pojedinačna analiza qPCR ili RT-PCR metodama ili kao multigeneska analiza sekvencioniranjem sljedeće generacije (NGS). Za otkrivanje T790M mutacija kao prvi korak preporučuje se analiza uzorka tekuće biopsije ctDNA, a droplet-digital PCR (ddPCR) ima visoku osjetljivost i specifičnost za detekciju T790M čak i kad su prisutne u vrlo malim količinama (27). U slučaju kliničke progresije te negativnog nalaza analize tekuće biopsije, analizu je potrebno ponoviti na tkivnom uzorku.



Slika 1: Molekularni mehanizmi i ciljana terapija u liječenju karcinoma pluća (28)

### 3.2 ALK

Kinaza anaplastičnog limfoma (ALK) je tirozin kinazni receptor koji pripada superobitelji inzulinskih receptora. Kao i drugi tirozin kinazni receptori, sastavljen je

od ekstracelularne domene koja veže ligand, transmembranske domene i intracelularne domene s tirozin kinaznom aktivnošću. ALK postaje aktivan nakon ligandom potaknute homodimerizacije koja uzrokuje autofosforilaciju, a zatim slijedi aktivacija višestrukih nizvodnih signalnih putova uključujući MAPK-ERK, PI3K-AKT, PLC $\gamma$ , JAK-STAT (29).

Aktivirajuće ALK promijene (mutacije, amplifikacije, fuzije/rearanžmani) nalaze se u raznim malignim oboljenjima uključujući anaplastični limfom velikih stanica (ALCL), nesitnostanični karcinom pluća (NSCLC), upalne miofibroblastične tumore (ITM), neuroblastome i upalne karcinome dojke. U NSCLC, promijene ALK gena djeluju kao onkogeni pokretači i javljaju se u 3-7% slučajeva (30). Većinom se nađu u adenokarcinomima, nepušača i mlađih žena. Za ALK translokacije u NSCLC smatra se da su međusobno isključive s genomskim aliteracijama u EGFR ili KRAS. Najčešća ALK mutacija u NSCLC posljedica je interkromosomalne inverzije na kratkom kraku kromosoma 2 koja rezultira fuzijom ALK i EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4). Ta fuzija aktivira tirozin kinaznu funkciju i inducira nizvodne signalne putove koji promoviraju proliferaciju i preživljenje stanice. Osim EML4, ALK može fuzionirati i s drugim genima poput SQSTM1 (sequestosome), DCTN1 (dynactin), HIP1 (huntington interacting protein 1) i KIF5B (kinesin family member 5 B).

Detekcija ALK fuzijskih proteina važna je u donošenju odluka o liječenju. Dvije glavne dijagnostičke metode korištene u svakodnevnoj praksi su imunohistokemija (IHC) i tehnike sekvenciranja nove generacije (NGS). Imunohistokemija je, zbog troškovne učinkovitosti i brzog vremena obrade, odličan izbor u otkrivanju ALK promjena, a odobrena je od strane FDA kao samostalni dijagnostički. Također, unatrag nekoliko godina osobito je korisna NGS tehnologija koja omogućava identifikaciju različitih fuzijskih partnera ALK gena i pruža detaljne informacije o promjenama unutar genoma koje mogu biti ključne u odabiru terapije. U slučaju pozitiviteta na ALK aliteracije, NSCLC bit će osjetljiv na terapiju ALK inhibitorima koji se vežu na receptor tirozin kinaze i inhibiraju nizvodne signalne puteve (30).

### 3.3 ROS1

ROS1 (ROS proto-oncogene 1) gen nalazi se na kromosomu 6 i kodira receptor tirozin kinaze koji je strukturno vrlo sličan ALK proteinu. Uzevši to u obzir, lijekovi koji učinkovito djeluju kod ALK pozitivnih pacijenata, primjenjuju se i u liječenju ROS1 pozitivnih pacijenata. ROS1 receptor transmembranski je protein koji se sastoji od velike ekstrastanične N-terminalne domene, transmembranske domene i unutarstanične C-terminalne domene s tirozin kinaznom aktivnošću. Specifični ligand koji se veže na ovaj receptor nije poznat. Fosforilacijom tirozin kinaze dolazi do aktivacije različitih nizvodnih signalnih putova kao što su PI3K-AKT-mTOR, RAS-RAF-MEK-ERK i JAK-STAT koji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa, stanične proliferacije i preživljavanja.

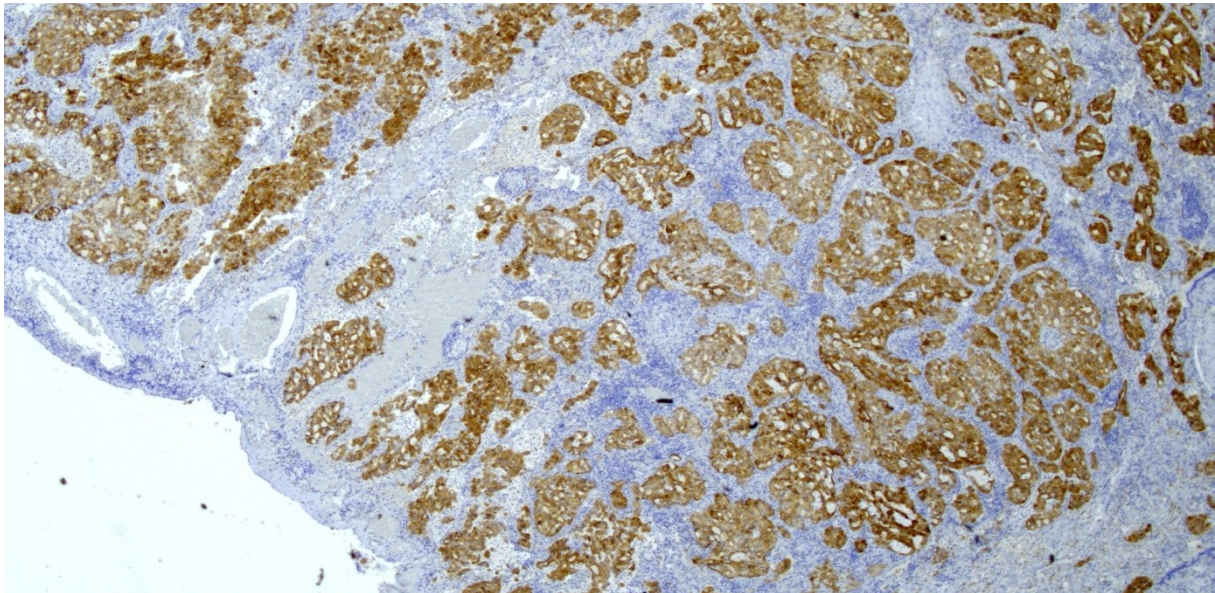
Genetske promijene u ROS1 nađene su kod raznih vrsta tumora uključujući glioblastom, nesitnostanični karcinom pluća, kolangiokarcinom, karcinom jajnika, kolorektalni karcinom, inflamatorni miofibroblastični tumor i angiosarkom.

Prevalencija promijenjenog ROS1 proteina iznosi 1-2% NSCLC adenokarcinoma. Češće su zahvaćene mlađe osobe, nepušači. Molekularne promjene ROS 1 gena odnose se na stvaranje fuzijskih proteina u kojima je tirozin kinazna komponenta pretjerano aktivna i potiče proliferaciju stanica (31).

Najčešći fuzijski partner ROS1 gena je CD74 (38%), zatim slijede EZR, SDC4 i SLC34A2. Mjesto prijeloma ROS1 gena koje uzrokuje stvaranje fuzijskih proteina uglavnom se nalazi u intronima 31, 32, 33 i 34, a za fuziju CD74-ROS1 predominantno mjesto prijeloma ROS1 je intron 33 (32). Trenutačno, odnos između fuzijskog partnera i prognoze bolesti nije poznat.

Detekcija ROS 1 molekularnih alteracija odvija se u dva koraka. Prvi korak je imunohistokemija, nakon koje, u slučaju pozitivnog nalaza, slijedi molekularna analiza RT-PCR-om ili NGS metodom. Detekcija ROS1 preporuča se kako bi se odredila indikacija za odabir odgovarajućeg ciljanog lijeka. U liječenju se koriste inhibitori tirozin kinaze te je FDA odobrila krizotinib i entrectinib kao prvi liniju liječenje. S vremenom se može razviti rezistencija na krizotinib za što je zaslužno više različitih mehanizama. Najčešći mehanizam rezistencije je mutacija strukturne domene ROS1 kinaze, od kojih je najčešća mutacija G2032R, zatim aktivacija drugih

signalnih putova nizvodno od ROS1, a može doći i do fenotipske transformacije stanica nakon razvoja rezistencije na ROS1-TKI. Kako bi se prevladale novonastale rezistencije razvijene tijekom liječenja inhibitorima ranijih generacija, pacijenti postaju kandidati za inhibitore treće generacije poput lorlatiniba (33).



Slika 2: Pozitivan imunohistokemijski nalaz ROS-1 u operativnom materijalu adenokarcinoma pluća

### 3.4 KRAS

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) jedan je od članova obitelji RAS i pripada grupi malih proteina koji vežu gvanozin trifosfat (GTP). KRAS, izmjenjujući aktivirane i neaktivirane konformacijske oblike, djeluje kao molekularni prekidač koji kontrolira važnu signalizaciju od aktiviranih membranskih receptora do unutarstaničnih molekula. U stanju mirovanja, KRAS, zbog svoje intrinzične GTPazne aktivnosti koje ima sposobnost hidrolize GTP-a u GDP, veže GDP u neaktivnom obliku. Kada stanice prime odgovarajući podražaj, a to podrazumijeva vezanje liganda za tirozin kinazni receptor, najčešće EGFR i PDGFR, GEF-ovi (guanine nucleotide exchange factors) i GAP-ovi (GTPase-activating proteins) stupaju u interakciju s KRAS proteinom i dovode do zamjene GDP-a s GTP-om. Vezanjem KRAS-a s GTP-om, dolazi do konformacijskih promjena KRAS-a i njegove aktivacije

što uzrokuje pokretanje više signalnih putova uključujući RAF-MEK-ERK i PI3K-AKT-mTOR puteve (34).

KRAS mutacija javlja se u oko 30% slučajeva adenokarcinoma pluća u zemljama zapadne civilizacije, dok je u azijskim zemljama prisutna u 5-12% slučajeva plućnog adenokarcinoma. Najučestalija točkasta KRAS mutacija događa se na kodonu 12 i uključuje transferzijsku mutaciju nukleotida u kojoj dolazi do zamjene gvanina timinom što rezultira specifičnim zamjenama aminokiselina poput zamjene glicina cisteinom (G12C, najučestalija, prisutna u oko 40% slučajeva adenokarcinoma s KRAS mutacijom) ili valinom (G12V). Također, tranzicijska mutacija gvanina adeninom rezultira zamjenom glicina asparaginskom kiselinom (G12D) (35). Zanimljivo je da izloženost karcinogenim policikličkim aromatskim ugljikovodima potiče G>T transferziju, a time i G12C mutaciju koja je zbog toga češća u pušača. S druge strane, G>A tranzicija i posljedična G12D mutacija češće su u nepušača (36). Identificirane su, iako s manjom učestalošću, i mutacije izvan kodona 12, na kodonu 13 (KRAS G13C) i kodonu 61 (KRAS Q61H).

Testiranje uzoraka pacijenata s uznapredovalim NSCLC provodi se s ciljem pronalaska mutacija na koje se može djelovati, što za sada podrazumijeva KRAS G12C. Testiranje se može provoditi kao dio multigeneske analize korištenjem NGS panela ili kao jednogenski testovi koji specifične biomarkere detektiraju pojedinačno raznim metodama poput Sangerovog sekvenciranja i RT-PCR-a. U većini slučajeva, prednost se daje NGS metodama, jer, za razliku od jednogenskih testova, omogućuju detekciju više mutacija odjednom, a pružaju i podatke o ko-mutacijama (35).

U liječenju KRAS G12C mutacija prisutnim u NSCLC koriste se G12C inhibitori, a trenutno odobreni lijekovi su adagrasib i sotorasib. Ti lijekovi, selektivnim, ireverzibilnim kovalentnim vezanjem za KRAS-GDP, inhibiraju daljnje nizvodno širenje signala i održavaju KRAS u inaktivnom obliku (37).



## 4 OSNOVNE MOLEKULARNE METODE

### 4.1 RT-PCR

Lančana reakcije polimeraze (PCR - polymerase chain reaction) laboratorijska je metoda koja se koristi za umnažanje kratkih i ciljanih segmenata DNA ili RNA u veliki broj identičnih kopija specifičnog genskog fragmenta. Ovu tehniku razvio je 1983. g. Kary Mullis, a zahvaljujući tome, 1993. g dobio je Nobelovu nagradu za kemiju. PCR danas ima široku primjenu tako da se koristi u dijagnostici nasljednih i stečenih bolesti, malignih bolesti, infektivnih bolesti, u prenatalnoj medicini, u donošenju odluka o uvođenju molekularno usmjerene terapije i praćenju odgovora na terapiju te u farmakogenetici i forenzici.

Esencijalne komponente PCR metode uključuju termocikler, termostabilnu DNA polimerazu (Taq polimerazu), uzorak DNA koji služi kao kalup za stvaranje komplementarnog DNA lanca, dvije oligonukleotidne početnice, reakcijski pufer u kojem najznačajniju ulogu ima  $MgCl_2$  jer je  $Mg^{2+}$  nužan za djelovanje polimeraze te nukleotide (adenin, timin, citozin i gvanidin). Termocikler je uređaj koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature tijekom ciklusa amplifikacije. Taj uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu u epruветama (0,2 ml) koje se nalaze u termocikleru i osim kontrole temperature, kontrolira i dužinu trajanja pojedinih dijelova ciklusa.

Lančana reakcije polimerazom sastoji se od tri ključna procesa: denaturacije, hibridizacije i elongacije. Za umnažanje željenog segmenta DNA, potrebno je poznavati slijed nukleotida koji ga okružuju kako bi se mogle stvoriti specifične početnice koji će inicirati sintezu DNA na određenim mjestima. Tijekom faze denaturacije, DNA se zagrijava na  $95^{\circ}C$  kako bi se razdvojile vodikove veze između komplementarnih parova baza dvostruke DNA uzvojnice. Nakon denaturacije, slijedi faza hibridizacije koja podrazumijeva hlađenje denaturirane DNA na temperaturu od  $55^{\circ}C$  što omogućava vezanje oligonukleotidnih početnica na komplementarne slijedove lanca DNA. Početnice su najčešće kemijski sintetizirane molekule DNA duljine od 20 do 25 nukleotida i one započinju sintezu u suprotnim smjerovima na dva komplementarna lanca. Sintezu nastavlja DNA polimeraza (Taq polimeraza). Taq

polimeraza termostabilni je enzim izoliran iz bakterija poput *Thermus aquaticus*. Optimalna temperatura za djelovanje Taq polimeraze je 72°C i to je temperatura na kojoj se provodi faza elongacije. Polimeraza ugrađuje nove komplementarne nukleotide sve dok ne stigne do druge početnice, a kako se sinteza odvija na oba lanca, u jednom ciklusu amplifikacije broj DNA molekula se udvostručuje. PCR se prosječno odvija u 30 ciklusa nakon čega dolazi do zasićenja i potrošnje reaktanata. Nakon amplifikacije, slijedi agarozna gel elektroforeza uz primjenu etidij bromida, fluorescentne boje koja se interkalira između baza dvolančane DNA i omogućuje vizualizaciju DNA pod ultraljubičastim svjetlom. Ovo je ključno za određivanje prisutnosti i veličine DNA fragmenata u uzorku gdje prisutnost svjetlećih traka ukazuje na prisutnost DNA fragmenata, dok odsutnost svjetlećih traka znači da DNA fragmenti nisu prisutni (38).

Na temelju PCR metode razvijeni su brojni postupci za prilagodbu specifičnim zahtjevima. **RT-PCR (reverse transcription PCR)** omogućuje korištenje RNA molekule kao uzorka, što je korisno jer daje ključne informacije o razini ekspresije gena, a ne samo o prisutnosti ili odsutnosti pojedinih genskih mutacija. Uz pomoć enzima reverzne transkriptaze, mRNA molekula prepíše se u komplementarnu DNA (cDNA) koja onda služi kao kalup za amplifikaciju uz pomoć DNA polimeraze i tako se generira dvostruka cDNA uzvojnica koja sadrži amplificirane segmente željene RNA. Mjerenje količine amplificiranog produkta u realnom vremenu omogućuje **kvantitativni PCR ili PCR u realnom vremenu (qPCR)**. Postoji više mogućih metoda za simultanu detekciju PCR produkta, a baziraju se na emisiji fluorescencije. Jedna od opcija je uporaba fluorescentne boje (SYBR Green) koja, prilikom ugradnje između nukleotida dvostruke DNA uzvojnice, emitira svjetlo. Također, mogu se koristiti početnice i specijalne probe koje sadrže specifične sekvence komplementarne segmentu ciljane DNA regije, a primjer je Taq proba. Djeluje na temelju FRET (Förster Resonance Energy Transfer) sustava u kojem razni spojevi preveniraju emisiju fluorescencije kada je proba intaktna. Detekcija qPCR u realnom vremenu prikazuje se krivuljom amplifikacije koja predstavlja temelj kvantifikacije. Krivulja se sastoji od faze inicijacije, eksponencijalne faze i faze platoa. U početku ciklusa, razina fluorescencije je niska te služi za postavljanje osnovne razine fluorescencije. Kako ciklus napreduje u eksponencijalnu fazu, razina fluorescencije značajno raste i prijeđe razinu praga koja se označava s Ct ili Cq vrijednosti. U eksponencijalnoj fazi, ciklus se odvija najefikasnije bez utjecaja ograničavajućih

faktora koji djeluju u fazi platoa. Još jedan važan čimbenik u kvantifikaciji je upotreba referentnog, endogenog gena prisutnog u svim uzorcima poput GAPDH ili  $\beta$ -aktin. Ima konstantnu koncentraciju i koristi se za normalizaciju razine ciljnih gena kako bi se umanjio učinak varijacije u količini uzorka ili uvjeta eksperimenta na promijene u ekspresiji ciljnih gena (39).

qPCR koristan je i za mjerenje razine mRNA u tumorskim stanicama osjetljivim i rezistentnim na lijekove te bi rana detekcija specifičnih obrazaca mRNA pomogla u odabiru učinkovitijih terapijskih opcija. Kako bi se osigurala preciznija kvantifikacija mRNA, razvijena je tehnika koja koristi sintetsku AW106 cRNA kao interni standard. AW106 cRNA sintetizirana je iz plazmida pAW106 pomoću T7 polimeraze. Sadrži uzvodne početnice za 12 ciljnih gena koje su povezane u nizu s komplementarnim sekvencama nizvodnih početnica. Iz svakog seta početnica nastaju PCR produkti koji sadržavaju oko 300 parova baza, ali važno je da se po veličini ne preklapaju s PCR produktima ciljane mRNA koja se amplificira u istoj epruveti. Upravo ta razlika u veličini između mRNA i AW106 cRNA PCR produkta omogućuje njihovo jednostavno razdvajanje uz pomoć gel elektroforeze. Kako se za amplifikaciju mRNA i AW106 cRNA koriste iste početnice, razlike u učinkovitosti početnica svedene su na minimum, a uzevši u obzir da interni standard sadrži sekvence početnica za više gena, može se koristiti za više različitih mRNA od interesa. Postoje brojni čimbenici koji utječu na efikasnost kvantifikacije. Ako postoji visoka koncentracija uzorka, koncentracija početnica, dostupnost Taq polimeraze i međusobna interakcija produkata amplifikacije mogu biti limitirajući čimbenici. Kako bi se pouzdano kvantificirala specifična mRNA koristeći interni standard, potrebno je odabrati raspon koncentracije uzorka i broj ciklusa amplifikacije tako da ostanu unutar eksponencijalne faze PCR-a. Stoga, potrebno je unaprijed titrirati specifičnu mRNA kako bi se pronašao raspon koncentracija za eksponencijalnu amplifikaciju tijekom definiranog broja ciklusa. U slučaju potrebe za evaluacijom kvantifikacije, uvjeti moraju biti strogo kontrolirani, a negativna kontrola nužna je za praćenje lažno pozitivnih rezultata i određivanje količine pozadinskih signala (40).

## 4.2 NGS

1977. godine predstavljene su dvije tehnologije sekvencioniranja DNA. Enzimatsku metodu sekvencioniranja DNA baziranu na metodi terminacije sinteze lanaca razvio je Frederick Sanger (Sangerovo sekvencioniranje), a drugu, temeljenu na kemijskoj modifikaciji DNA s posljedičnim cijepanjem molekule na specifičnim bazama i razdvajanjem fragmenata na gel elektroforezi, razvili su Allan Maxam i Walter Gilbert. Obje su metode u to vrijeme bile vrlo zahtjevne i koristile radioaktivne materijale. Sangerova je metoda, zahvaljujući visokoj učinkovitosti i mogućnosti automatizacije, tijekom godina doživjela brojna poboljšanja, uključujući zamjenu obilježavanja radioaktivnim izotopima fluorimetrijom i zamjenu elektroforeze na poliakrilamidnom gelu kapilarnom elektroforezom. Tako se 1987. godine pojavljuje prvi automatski sekvencer (AB370) koji, na temelju kapilarne elektroforeze, sekvencira DNA, što je uvelike ubrzalo i povećalo točnost sekvencioniranja. Sangerova metoda sekvencioniranja smatra se tehnologijom sekvencioniranja prve generacije, a tehnologije druge i treće generacije nazivaju se metodama nove generacije (41).

**Sekvenciranje nove generacije (NGS)** nova je tehnologija korištena za sekvenciranje DNA i RNA te detekciju mutacija. Ima brojne prednosti u usporedbi sa Sangerovom metodom uključujući niske troškove, veću brzinu zahvaljujući mogućnosti odvijanja više reakcija sekvenciranja istovremeno te izravnu detekciju izlaznog produkta bez uporabe elektroforeze. U sekvenciranju DNA, NGS uključuje nekoliko ključnih koraka: fragmentaciju DNA, pripremu „knjižnice“, masivno paralelno sekvenciranje, bioinformatičku analizu i interpretaciju podataka. Fragmentacija DNA podrazumijeva cijepanje ciljane DNA na kratke segmente mehaničkim, enzimatskim ili drugim metodama te izvlačenje segmenata DNA od interesa specifičnim komplementarnim probama. Kako bi se knjižnica pripremila, na DNA fragmente dodaju se sekvencijski adapteri koji omogućuju vezanje početnica na DNA segmente i njihovu replikaciju čime nastaje više kopija svakog fragmenta na podlozi koji formiraju mikroskopske skupine DNA. Svaka skupina sadrži mnoštvo identičnih kopija DNA fragmenta i tijekom masovnog paralelnog sekvenciranja, svaka se skupina sekvencira istovremeno i omogućava pojačavanje signala tijekom sekvenciranja i preciznost očitovanja. Sekvencer očitava nukleotide dodane u stvarnom vremenu i bilježi signale iz svake skupine kako bi odredio redoslijed baza u

fragmentu DNA. Podaci iz svake skupine analiziraju se kako bi se odredila sekvenca DNA, a zatim se uspoređuju s referentnom sekvencom radi identifikacije varijacija i mutacija. Različite NGS platforme koriste različite metode i tehnologije za provođenje ovih koraka (42).

Roche 454 prvi je komercijalni sustav sekvenciranja nove generacije i temeljen je na metodi pirosekvenciranja što znači da detektira pirofosfate oslobođene prilikom ugradnje nukleotida. Proces započinje denaturacijom knjižnične DNA s 454-specifičnim adapterima u jednolančane molekule, a zatim slijedi amplifikacija svakog pojedinog fragmenta. Nakon toga, jedan od nukleotida veže se za DNA uz pomoć DNA polimeraze i uzrokuje oslobađanje pirofosfata. Enzim ATP sulfurilaza koristi pirofosfat i adenozin 5'-fosfosulfat za stvaranje ATP-a koji potom služi kao supstrat enzimu luciferazi za reakciju pretvorbe luciferina u oksiluciferin i oslobađanje svjetlosti. Intenzitet svjetlosti proporcionalan je količini ugrađenog nukleotida, a detekcija svjetlosnog signala omogućuje određivanje redoslijeda nukleotida u rastućem lancu. Glavna je prednost Roche 454 sustava njegova brzina zahvaljujući kojoj postupak sekvenciranja traje samo 10 sati (43).

Sustav SOLiD (od eng. Sequencing by Oligo Ligation Detection) proizvela je kompanija Applied Biosystems 2006.godine. SOLiD se bazira na primjeni DNA ligaze i probe koja kodira za dvije baze. Svaka proba sastoji se od osam nukleotida i sadrži mjesto za ligaciju (prva baza), mjesto cijepanja (peta baza) te jednu od četiri fluorescentnih boja vezanu za posljednju bazu. Postupak počinje vezanjem početnice na adaptor, nakon čega dolazi i do hibridizacije probe na svoju komplementarnu sekvencu u blizini početnice. Tada se, pomoću DNA ligaze, proba spaja s početnicom te slijedi detekcija fluorescencije i određivanje baza. Fluorescentni signal nestat će uklanjanjem posljednje tri baze s ligirane probe što priprema produljenu početnicu na novi ciklus. Slijed fragmenta može se zaključiti nakon 5 ciklusa sekvenciranja (43,44).

Sustav Illumina, koji je predstavila tvrtka Solexa 2006. godine, temelji se na principu sekvenciranja sintezom. Knjižnica DNA fragmenata priprema se cijepanjem dugačke DNA ultrazvukom čime se dobiju fragmenti DNA tupih krajeva na koje se vežu adaptor. Slijedi denaturacija i vezanje jednolančanih fragmenata preko adaptera za oligonukleotidne početnice fiksirane na površini protočnih članaka. Fragmenti se podvrgavaju PCR amplifikaciji i nastaje veliki broj identičnih kopija koje čine klaster. Novonastali dvolančani produkti ponovo se denaturiraju i pri tom se izvorni fragmenti

ispiru, a novosintetizirani lanci ostaju vezani za površinu. Oni se zatim vežu na obližnju početnicu, formiraju most i ponovo se provodi amplifikacija postupkom koji se naziva premošćujući PCR. Ponovnom denaturacijom i ispiranjem komplementarnih lanaca na površini ostaju vezani umnoženi izvorni lanci. Slijedi dodavanje početnica i modificiranih nukleotida koji sadrže blokatore na 3' kraju što omogućava početnici dodavanje jednog nukleotida s obilježenog fluorescentnom bojom. Neugrađene se baze ispiru, a ugrađene emitiraju fluorescentni signal koji se detektira CDD (charge-coupled device) kamerom (43,44).

Ion PGM (Personal Genome Machine) sustav predstavio je Ion Torrent 2010. godine. Sustav se temelji na tehnologiji sekvenciranja poluvodiča. Prilikom ugradnje nukleotida u lanac DNA pomoću enzima polimeraze, oslobađa se proton. PGM, zahvaljujući mogućnosti detekcije promjene u pH, prepoznaje je li nukleotid ugrađen ili nije. Ovo je prvi sustav koji za sekvenciranje ne zahtjeva fluorescenciju i detekciju kamerom što rezultira većom brzinom, nižim troškovima i manjom veličinom stroja.

Daljnijim napretkom tehnologije sekvencioniranja dolaze i metode treće generacije. Neka nova obilježja treće generacije uključuju kraće vrijeme pripreme DNA za sekvenciranje s obzirom na to da prije sekvenciranja nije potreban PCR te mogućnost detekcije signala u realnom vremenu.

Jedna od metoda treće generacije je sekvenciranje pojedinačne molekule u realnom vremenu (SMRT - single molecule real time), metoda koju je razvila tvrtka Pacific Bioscience. SMRT stanica sadrži milijune valovoda (ZMW – zero-mode waveguide) na koje je vezana DNA polimeraza zajedno s jednom molekulom DNA koja služi kao kalup. Tijekom reakcije, polimeraza ugrađuje nukleotid u lanac. Svaki nukleotid na sebi ima vezanu jednu od četiri fluorescentne boje koje se, prilikom ugradnje nukleotida, odcijepi i kamera detektira signal u realnom vremenu (43).

Sekvenciranje nanoporama još je jedna metoda treće generacije koja se temelji na proučavanju prolaska DNA kroz umjetne nanopore. Ovaj instrument koristi  $\alpha$ -hemolizin poru koja služi kao mjesto vezanja nukleotida. DNA molekula prolaskom kroz poru modulira ionsku struju. Te promijene i blokade u toku ionske struje specifične su za svaki nukleotid i to omogućava određivanje DNA sekvence (41,43).

Kako je sekvenciranje DNA pomoću NGS tehnologije postalo sve dostupnije, tako se i znanje o raznim vrstama mutacija koje mogu biti klinički relevantne i liječene

ciljanom terapijom znatno proširilo (45). Najčešće korištena NGS metoda za pacijente s karcinomom je sekvenciranje ciljnim panelima, što obuhvaća desetke ili stotine ciljnih gena. Prvi korak kod kliničke primjene NGS testiranja je određivanje genetskih mutacije koje treba testirati tj. važno je provjeriti trenutne smjernice za određenu bolest kako bi se identificirale ciljane mutacije gena na koje se može terapijski djelovati. U slučaju nesitnostaničnog raka pluća, smjernice navode kako je klinički značajno testirati mutacije gena EGFR, KRAS, BRAF, MET, RET, Her2, NTRK, ALK, ROS1 i biomarkera inhibitora kontrolne točke PD-L1. NGS test dizajniran za takve mutacije naziva se NGS panel (42,46). Trenutno su dostupni različiti komercijalni genetski paneli pa tako postoji mogućnost uporabe uskih genetskih panela, koji pokrivaju 10 do 15 gena, zatim širokih i klinički relevantnih panela, koji pokrivaju do 50 gena, korisnih za uključivanje pacijenata u klinička ispitivanja, panela za cjelovito ispitivanje tumora, koji pokrivaju do 150 specifičnih gena za istraživačke svrhe i panela za cjelovito ispitivanje ljudskih karcinoma, koji pokrivaju do 400 relevantnih gena za tumore.

Tkivo se i dalje smatra najboljim početnim materijalom za molekularno profiliranje, uključujući NGS metodu. Međutim, kod pacijenata s ranim i teško dostupnim te uznapredovalim NSCLC-om, tkivo predstavlja izazov jer su uzorci često oskudni (mali histološki bioptički i/ili citološki uzorci). FFPE uzorci (histološki ili citološki blokovi) ne zahtijevaju dodatnu validaciju prije rutinske primjene za NGS analizu, za razliku od citoloških pripravaka (npr. direktni razmazi i uzorci tekuće citologije). Unatoč tome, i ne-FFPE uzorci postaju važni u dijagnostičkom pristupu pacijentima s uznapredovalim NSCLC-om jer pružaju visokokvalitetne nukleinske kiseline u usporedbi s FFPE uzorcima, koji mogu imati artefakte C > T zbog fiksacije formalinom, što pak može rezultirati netočnim molekularnim rezultatima. S druge strane, ne-FFPE uzorci mogu biti ograničeni količinom dostupnog materijala. S obzirom na izazov koji tkivo predstavlja za molekularnu analizu kod pacijenata s uznapredovalim NSCLC-om, postoji sve veći konsenzus o ulozi tekuće biopsije kao alternativa izvora tumorske nukleinske kiseline (ctDNA) kada tkivni uzorci nisu dostupni ili ako invazivni postupci predstavljaju rizik za pacijenta.

Potrebno je naglasiti važnost uzimanja u obzir nekoliko faktora kako bi se postigao najbolji rezultat u NGS analizi. Za početak, ključno je odabrati uzorak tkiva ili tekućine s visokom kvalitetom ili dovoljnom količinom DNA ili RNA potrebnih za analizu.

Nadalje, odabir odgovarajuće metode sekvenciranja nužan je za maksimiziranje kliničke osjetljivosti, jer, različite metode sekvenciranja mogu imati različite metode detekcije. I za kraj, potrebno je odrediti odgovarajući genetski panel za analizu, ovisno o kliničkom kontekstu (46).

Tablica 1: Komercijalno dostupni NGS paneli za tumore pluća

Name	Company	Type of Sequencing	Gene Targeted	Target Approach for Gene Fusion Analysis	Input Nucleic Acid (ng)	Type of Test
Archer fusion plex Comprehensive Thyroid and Lung	ArcherDX Inc, Illumina, San Diego, USA	RNA seq	gene fusions, SNV, indels, splicing and gene expression in 36 genes	AMP based	10 ng	Diagnosis
Archer fusion plex Lung kit	ArcherDX Inc, Illumina, San Diego, USA	DNA and RNA seq	EGFR vIII and MET exon 14 skipping events along with prominent ALK, BRAF, FGFR, NRG1, NTRK, RET, and ROS1 fusions and select point mutations in 14 key gene targets associated with lung cancer	AMP based	10 ng	Diagnosis
Lung Cancer-Targeted Gene Panel, Tumor	MAYO Clinic, Scottsdale, USA	DNA	EGFR, BRAF, KRAS, HRAS, NRAS, ALK, ERBB2, and MET	Amplicon based	NA	Diagnosis and management of lung cancer
Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Research Panel v2	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	DNA	KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, AKT1, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBXW7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2	Amplicon based	10	Diagnosis and treatment selection

Name	Company	Type of Sequencing	Gene Targeted	Target Approach for Gene Fusion Analysis	Input Nucleic Acid (ng)	Type of Test
AccuFusion	Paragon Genomics, Hayward, USA	RNA fusion	ALK, CIT, EML4, FGFR1, MBIP, MET, NRG1, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, RET, ROS1, TACC3.	Amplicon based	10	Diagnosis and treatment selection
OmniFusion	Paragon Genomics, Hayward, USA	RNA fusion	ALK, CIT, MBIP, MET, NRG1, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, RET, ROS1, TACC3	Amplicon based	25	Diagnosis and treatment selection
Ion AmpliSeq™ RNA Fusion Lung Cancer Panel	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	RNA fusion	ALK, RET, ROS1, and NTRK	Amplicon based	10	Diagnosis and treatment selection
QuantideX® NGS RNA Lung Cancer Kit	Asuragen, Austin, USA	RNA expression and fusion	ALK, ROS1, RET, FGFR3NTRK1, NTRK3, NRG1, FGFR1, FGFR2, MBIP, PDGFRA, MET, ABCB1, BRCA1, CD274, CDKN2A, CTLA4, ERCC1, ESR1, IFNGR, ISG15, MSLN, PDCD1, PDCD1LG2, PTEN, RRM1, TDP1, TERT, TLET3, TOP1, TUBB3, TYMS	Amplicon based	10	Treatment selection
TruSight RNA fusion panel	Illumina, San Diego, USA	RNA seq	507 fusion-associated genes	Hybrid capture based	10 total RNA20–100 FFPE RNA	Treatment selection



## 5 AKTUALNE SMJERNICE

Najšire prihvaćene smjernice su NCCN smjernice te ESMO smjernice koje prate nacionalne smjernice pojedinih država.

Navedene smjernice navode potrebu molekularnog profiliranja nesitnostaničnih karcinoma pluća - adenokarcinoma, nesitnostaničnih karcinoma - planocelularnih karcinoma u mlađih pacijenata i u nepušača te lakih pušača, nesitnostaničnih karcinoma - kad se dijagnoza adenokarcinoma ne može isključiti, dok je molekularno profiliranje ostalih karcinoma pluća, npr. karcinoma tipa žlijezda slinovnica proizvoljno. Od neuroendokrinih tumora, molekularno profiliranje namijenjeno karcinomima pluća navedenim u gornjem tekstu može se primijeniti i za velikostanični karcinom pluća dok se, prema aktualnim spoznajama, ne primjenjuje za ostale vrste neuroendokrinih neoplazmi.

### 5.1 AKTUALNE NCCN SMJERNICE

Nacionalni komprehenzivni centar za rak (NCCN) pruža skup preporuka i smjernica koje omogućuju strukturiran pristup dijagnostici, liječenju i praćenju pacijenata s rakom pluća. Trenutno aktualne NCCN smjernice su verzija 2.2024. i u njima se razlikuju smjernice za rane i lokalno uznapredovale nesitnostanične karcinome pluća koji podrazumijevaju stadije IB-IIIa, IIIB kao i smjernice za uznapredovale stadije, a preporučena strategija za molekularno profiliranje je NGS platforma.

Molekularno profiliranje potrebno je, prema aktualnim smjernicama, kod nesitnostaničnih karcinoma - adenokarcinoma, kod nesitnostaničnih karcinoma kada se ne može isključiti adenokarcinom, kod karcinoma velikih stanica, velikostaničnih neuroendokrinih karcinoma, karcinoma pločastih stanica u mlađoj dobi ili kod nepušača ili umjerenih pušača, dok je za ostale neoplazme pluća molekularno profiliranje proizvoljno.

Aktualne smjernice naglašavaju potrebu da se molekularno profiliranje tumora radi u akreditiranim laboratorijima, da je potrebno razumjeti metodologiju analize i njena ograničenja, kao i spektar molekularnih promjena koje se analiziraju. Patolog je osoba koja odabire optimalni uzorak tumorskog tkiva za molekularnu analizu, određuje postotak tumorske celularnosti te sukladno tome zajedno s molekularnim

biologom bira adekvatnu platformu analize. Isto tako, u slučaju potrebe, patolog mikrodisekcijom može mijenjati, odnosno povećavati tumorsku celularnost.

Naglašava se tkivo fiksirano u formalinu kao prvi odabir vrste uzorka za molekularnu analizu. Ako ne postoji adekvatni tkivni uzorak tumora, potiče se analiza citobloka, iako testiranje na citoblokovima nije odobreno od Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) za molekularno profiliranje tumora.

I periferna se krv navodi kao surogat uzorak, osobito u pacijenta u stadiju IV, uz svjesnost ograničenja analize ovog tipa uzorka. Testiranje cirkulirajuće tumorske DNA (ctDNA) koristi se za analizu DNA fragmenata koji potječu od tumorskih stanica i cirkuliraju krvlju. U stadiju IV, ova tehnika može biti korisna za identifikaciju genetskih promjena u tumoru, praćenje tijeka bolesti i učinka terapije. No, postoje i brojna ograničenja učinkovitosti ove tehnike kao npr. „low signal-to-noise ratio“ što znači da je količina ciljanih tumorskih DNA fragmenata u uzorku mala u usporedbi s količinom ne-tumorske DNA, a to može dovesti do lažno negativnih rezultata, a mogući su i lažno pozitivni rezultati. Kratak životni vijek ctDNA i nedostatak specifične standardizacije testiranja još su neki od ograničavajućih čimbenika.

Preporučena platforma analize je NGS, s panelom gena većim do 50, te analiza ne samo DNA, nego i RNA, kako bi se maksimalno detektirala fuzija gena ako je ona prisutna u uzorku. Detekcija specifičnih genetskih promjena treba obuhvaćati gene EGFR, ALK, ROS1, KRAS G12C, HER2, BRAF v600 E, RET mutacije i fuziju NTRK gena.

U tablici 2. navedene su molekularne alteracije koje je potrebno detektirati, osim EGFR mutacija, kao i metodologija njihove analize

Tablica 2: Molekularne aliteracije koje je potrebno testirati uz EGFR mutacije i metode testiranja prema NCCN smjernicama 2.2024.

Testing methodology	
ALK (anaplastic lymphoma kinase) Gene Rearrangements	FDA-approved IHC can be utilized as a stand-alone test, not requiring confirmation by FISH. Numerous NGS methodologies can detect ALK fusions.
ROS1 (ROS proto-oncogene 1) Gene Rearrangements	IHC approaches can be deployed; however, IHC for ROS1 fusions has low specificity, and follow-up confirmatory testing is a necessary component of utilizing ROS1 IHC as a screening modality. Numerous NGS methodologies can detect ROS1 fusions, although DNA-based NGS may under-detect ROS1 fusions
BRAF (B-Raf proto-oncogene) Point Mutations	Real-time PCR, Sanger sequencing (ideally paired with tumor enrichment), and NGS are the most commonly deployed methodologies for examining BRAF mutation status. While an anti-BRAF p.V600E-specific monoclonal antibody is commercially available
KRAS (KRAS proto-oncogene) point mutations	NGS, real-time PCR, and Sanger sequencing (ideally paired with tumor enrichment) are the most commonly deployed methodologies for examining KRAS mutation status.
MET (mesenchymal-epithelial transition) exon 14 (METex14) skipping variants	RNA-based NGS
RET (rearranged during transfection) Gene Rearrangements	Targeted real-time reverse-transcriptase PCR assays are utilized in some settings, although they are unlikely to detect fusions with novel partners NGS-based methodology has a high specificity, and RNA-based NGS is preferable to DNA-based NGS for fusion detection
ERBB2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2)/HER2 Gene Mutations	While Sanger sequencing and targeted PCR techniques can be utilized to examine ERBB2 mutations, the diversity and spectrum of mutations are best surveyed using NGS-based approaches.
NTRK1/2/3 (neurotrophic tyrosine receptor kinase) gene fusions	Various methodologies can be used to detect NTRK1/2/3 gene fusions, including: FISH, IHC, PCR, and NGS; false negatives may occur. IHC methods are complicated by baseline expression in some tissues. FISH testing may require at least 3 probe sets for full analysis. NGS testing can detect a broad range of alterations. DNA-based NGS may under-detect NTRK1 and NTRK3 fusions

Molekularno testiranje EGFR mutacija potrebno je provesti kod pacijenata u ranim fazama i lokalno uznapredovalim stadijima, kao i u uznapredovalim stadijima maligne bolesti. Potrebno je analizirati genetske mutacije u egzonima 18-21. EGFR p.T790M je mutacija koju je potrebno analizirati kod pojave kliničke progresije, odnosno rezistencije na terapiju trenutnim tirozin-kinaznim inhibitorima. Najviše zastupljene EGFRex20 alteracije različita su grupa „in-frame“ duplikacija ili insercijskih mutacija.

ALK rearanžiranja mogu se detektirati imunohistokemijski ili NGS metodologijom.

ROS-1 fuzijske promjene detektiraju se ili u dva koraka, prvo imunohistokemijski, a zatim na molekularnom nivou metodom RT-PCR, ili u jedno koraku NGS metodologijom.

BRAF točkasta mutacija može se detektirati Real-time PCR-om, Sanger sekvencioniranjem ili NGS metodologijom. Moguća je detekcija i imunohistokemijski, budući da postoji anti-BRAF p.V600E-specifično monoklonalno protutijelo.

KRAS točkasta mutacija može se detektirati RT-PCR-om, Sanger sekvencioniranjem ili NGS platformom, a prisutnost KRAS p.G12C povezana je s mogućnošću primjene ciljanog lijeka KRAS G12C inhibitora.

ERBB2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2)/HER2 gen mutacija detektira se PCR tehnikom, Sanger sekvencioniranjem ili NGS-om.

Fuzijske točkaste mutacije u genima NTRK1/2/3 (neurotrophic tyrosine receptor kinase) mogu dati lažno negativne rezultate primjenom različitih metoda analize. Imunohistokemija je otežana činjenicom da postoji bazična ekspresija navedene promjene u nekim tkivima, a za izdavanje rezultata FISH analizom potreban je set od barem tri analize. Za NGS platformu nužna je analiza RNA. Smjernice iz 2023.godine navode potrebu da se pozitivan nalaz na molekularnom nivou potvrdi i na nivou proteinskog produkta, odnosno imunohistokemijom. U smjernicama iz 2024. godine to se više ne spominje.

Preporučeno je i imunohistokemijsko testiranje PD-L1(programmed death ligand 1) ekspresije, što pomaže u odabiru imunoterapije kao terapijske opcije, zasebno ili u kombinaciji s kemoterapijom.

PD-L1 transmembranski je protein često prisutan u tumorskim stanicama. Kada se PD-L1 veže za svoj receptor PD-1 na stanicama imunološkog sustava (najčešće T-stanicama), inhibira aktivaciju tih stanica, a time i njihovu sposobnost uništavanja tumorskih stanica. Stoga je važno prepoznati PD-L1 ekspresiju jer se, korištenjem imunoterapije koja inhibira tu interakciju između PD-L1 i PD-1 omogućuje imunološkom sustavu da sudjeluje u detekciji i uništavanju tumorskih stanica. Ekspresija PD-L1 određuje se pomoću TPS-a (tumor proportion score) koji je definiran kao postotak tumorskih stanica koje pokazuju djelomično ili potpuno obojenje membrane bilo kojeg intenziteta. TPS se često koristi kao biomarker za predviđanje odgovora na imunoterapiju, što znači da će pacijenti s visokim TPS-om imati veću vjerojatnost uspješnog odgovora na terapiju inhibitorima PD-1 ili PD-L1, nego pacijenti s niskim TPS-om.

Još jedan prediktivni biomarker vezan za učinak imunoterapije je **tumorsko mutacijsko opterećenje (TMB)** koji kvantificira broj mutacija prisutnih u DNA

tumorskih stanica, a izražava se kao broj mutacija po megabazi sekvencirane DNA. Visoki TMB povezan je s boljim odgovorom na imunoterapiju.

U nekim kliničkim slučajevima mogu se koristiti ili pojedinačni testovi ili kombinacija nekoliko testova koji omogućuju dobivanje što boljih rezultata. To ovisi o specifičnim karakteristikama bolesti i pacijenta, npr. udruženim komorbiditetima ili drugim primarnim neoplazmama, dostupnim uzorcima za analizu i ciljevima testiranja.

## 5.2 AKTUALNE ESMO SMJERNICE

ESMO (Europsko društvo za medicinsku onkologiju) smjernice pružaju vrijedne smjernice za kliničku praksu, uzimajući u obzir najnovija istraživanja i mišljenje vodećih stručnjaka iz područja onkologije. ESMO smjernice također razlikuju smjernice za rano i lokalno uznapredovali nesitnostanični karcinom pluća (aktualne smjernice su iz 2021.godine), te smjernice za uznapredovali nesitnostanični karcinom pluća (aktualne smjernice iz 2022.godine).

Postavljanje definitivne patohistološke dijagnoze prije početka liječenja je poželjno, ali ponekad izazovno, osobito kod perifernih i malih lezija koje nisu dostupne bronhoskopijom. Rizik malignosti može se odrediti algoritmima koji u obzir uzimaju relevantnu medicinsku povijest, pušačke navike i radiološke karakteristike plućnog čvorića kako bi odlučili jesu li indicirani dodatni dijagnostički ili terapijski postupci. Međutim, treba imati na umu da svi takvi algoritmi imaju svoja ograničenja povezana s populacijom iz koje su izvedeni. Novije studije o procjeni probira LDCT-om za otkrivanje raka pluća pokazale su da uključivanje vremena udvostručenja volumena čvorića (VDT) i/ili unosa fluorodeoksiglukoze–pozitronske emisijske tomografije (FDG–PET) također može smanjiti postupanja s benignim lezijama kao da su maligne. Međutim, mjerenja VDT-a nisu rutinski provedena izvan kliničkih studija. Stoga, preporučuje se da takve indeterminirane solitarne plućne čvoriće procijene stručni multidisciplinarni timovi za tumore koji će u obzir uzeti sve relevantne faktore vezane za pacijenta, epidemiologiju i procedure te primijeniti postojeće smjernice za procjenu plućnih čvorića.

Za centralno smještene tumore, bronhoskopija je preporučena metoda dobivanja tkivnih i citoloških uzoraka s ciljem postavljanja patohistološke dijagnoze.

Dijagnostički pristup prema nekalcificiranim plućnim čvorićima treba se temeljiti na postojećim standardiziranim smjernicama. Metode izračuna vjerojatnosti malignosti korištene u studijima probira CT-om ne smiju se koristiti u kliničkoj procjeni plućnih čvorića.

Iako je preporučeno prije početka liječenja definirati patohistološku dijagnozu, kod nekih pacijenata s kliničkim stadijem I/II to nije izvedivo pa kod njih visoka razina malignosti temeljena na procjeni kliničkih i slikovnih nalaza u iskusnoj multidisciplinarnoj skupini može biti dovoljna.

Za sve pacijente s kliničkim stadijem III NSCLC-a preporučuje se dijagnostički postupak koji uključuje CT visoke rezolucije praćen PET-om ili kombiniran PET-CT, idealno proveden unutar 4 tjedna prije početka liječenja. Ovime je omogućeno isključenje detektabilnih intratorakalnih intrakranijskih metastaza i procjena potencijalne zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova. Pojedinačne udaljene PET pozitivne lezije trebaju patološku potvrdu prije nego što se proglašeni klinički stadij IV. Nadalje, patološka potvrda sumnjivih limfnih čvorova provodi se endoskopskim ultrazvukom (EUS), endobronhalnim ultrazvukom (EBUS), video-asistiranom torakoskopijom (VATS), video-asistiranom medijastinoskopijom (VAMS) ili video-asistiranom medijastinalnom limfadenektomijom.

PET-pozitivni medijastinalni nalaz zahtijeva patološku obradu, prvenstveno minimalno invazivnim metodama koje uključuju transbronhalnu aspiraciju iglom vođenu endoskopskim ili endobronhalnim ultrazvukom. Također, PET-negativni medijastinalni nalazi kod kojih postoji sumnja na zahvaćenost tumorom isto tako predstavljaju indikaciju za provedbu minimalno invazivnih metoda. Ukoliko su i endoskopski nalazi negativni, a postoji visoka sumnja na zahvaćenost medijastinalnih limfnih čvorova, indiciran je kirurški staging, preferabilno VAMS za gornje medijastinalne limfne čvorove i VATS za aortopulmonalne limfne čvorove.

Kod svih pacijenata koji su kandidati za kurativno liječenje preporučeno je provesti radiološko snimanje mozga jer, u slučaju lokalno invazivnog T4 tumora i N2 ili N3 medijastinalnih limfnih čvorova, postoji visoki rizik od moždanih metastaza. MRI uz uporabu kontrastnog sredstva je metoda izbora, ali ako postoje kontraindikacije, alternativa može biti CT s kontrastnim sredstvom (47).

Patohistološka dijagnoza nužna je za sve pacijente prije stereotaktičke ablativne radioterapije (SABR), osim ako multidisciplinarni odbor za tumore ne smatra da je omjer rizika i koristi postupka neprihvatljiv.

U slučaju kada je uzimanje uzorka tkiva prije SABR-a smatrano prevelikim rizikom, treba postojati barem 85% šanse za zloćudnost, na temelju kliničkih kriterija (48). Nakon postavljanja patohistološke dijagnoze, ove smjernice, od strane radne skupine za tumore pluća, kao obligatorno navode molekularnu analizu EGFR gena, dok je analiza ALK gena proizvoljna, kao i analiza PD-L1 statusa.

Radna skupina za preciznu medicinu pak navodi potrebu da se i u ovim stadijima tumor molekularno profilira koristeći NGS metodologiju i to panelom s većim brojem gena.

U uznapredovalim stadijima ESMO smjernice identične su NCCN smjernicama verzija 5.2023. koje navode iste preporučene molekularne aliteracije kao i NCCN smjernice 2.2024.

Tablica 3: Molekularne aliteracije koje je potrebno testirati i metode testiranja prema aktualnim ESMO smjernicama

Biomarker	ESMO-recommended testing methods
EGFR mutations	qPCR, ddPCR
EGFR exon20 ins	NGS
ALK rearrangements	FISH, RT-PCR IHC NGS
ROS1 rearrangements	FISH, RT-PCR IHC NGS
BRAF V600E	qPCR NGS
PD-L1 (PD-L1 >50%)	IHC
NTRK gene fusions	IHC NGS
KRAS G12C mutation	qPCR, ddPCR NGS
RET rearrangements	FISH NGS
MET exon 14 skipping and MET amplifications	FISH IHC NGS
ERBB2 mutations	NGS
NRG1 gene fusions	FISH NGS
TMB, STK11, KEAP1...	NGS

## 5.3 NACIONALNE SMJERNICE U REPUBLICI HRVATSKOJ

Nacionalne smjernice patološke dijagnostičke obrade nesitnostaničnih karcinoma pluća kreirane su od strane radne skupine za torakalnu patologiju Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu te prihvaćene od strane cijelog društva na Kongresu patologije i sudske medicine u Dubrovniku u studenom 2023. godine. Sukladno protokolu prihvaćene su i od strane još dva srodna stručna društva; Društva za torakalnu kirurgiju te Društva za respiratornu medicinu početkom 2024. godine. Naše nacionalne smjernice strukturom su najbližnje njemačkim nacionalnim smjernicama, a opsegom španjolskim nacionalnim smjernicama i prate aktualne ESMO i NCCN smjernice s ciljem da se tijekom 2024. godine metodologija NGS-a integrira u svakodnevnu praksu.



## 6 DIJAGNOSTIČKI ALGORITAM U PRAKSI

Dijagnostički algoritmi različiti su ovisno o kojoj se državi radi, jer resursi, novčani, oni vezani uz opremu te vezani uz ljudski faktor, nisu jednaki. U Sjevernoj Americi te dijelu država zapadne Europe ovise o zdravstvenom osiguranju pacijenta. U SAD-u molekularno profiliranje tumora, uključujući i nesitnostanični karcinom pluća nisu uključeni niti u police zdravstvenog osiguranja srednjeg sloja stanovništva.

U Republici Hrvatskoj svi pacijenti imaju jednaku mogućnost dijagnostičkog algoritma uključujući i molekularnog profiliranja jer su svi osiguranici istog zdravstvenog osiguranja ( HZZO-a), a s obzirom da je kod nas usvojen stav refleksnog i automatskog molekularnog profiliranja, tumorski biološki uzorci pacijenata neovisno o stadiju bolesti podliježu istom dijagnostičkom algoritmu, isključivo ovisno o kvaliteti bioloških uzoraka. S donošenjem nacionalnih smjernica i s ciljem provođenja istih, potrebno je razlikovati dijagnostički algoritam ovisno o stadiju bolesti te novi, ujedinjujući pristup različitim vrstama bioloških uzoraka. Molekularno profiliranje dostupno je u svim kliničkim bolničkim centrima u Hrvatskoj.

## 7 ZAKLJUČAK

Najnovija klasifikacija neoplazmi pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine, dijeli neoplazme pluća u četiri glavne kategorije: epitelne neoplazme, mezenhimalne neoplazme, hematolimfoidne tumore i tumore ektopičnog tkiva.

Aktualne smjernice naglašavaju potrebu molekularnog profiliranja nesitnostaničnih karcinoma pluća: adenokarcinoma, kad se adenokarcinom ne može isključiti, planocelularnih karcinoma u mlađih pacijenata i nepušača ili lakih pušača, dok je molekularno profiliranje ostalih tipova karcinoma pluća proizvoljno.

NCCN i ESMO smjernice za NSCLC naglašavaju važnost primjene NGS tehnologija za otkrivanje specifičnih genetskih promjena EGFR, ALK, ROS1, KRAS G12C, HER2, BRAF v600 E, RET mutacije i fuziju NTRK gena, omogućujući ciljani pristup liječenju. Testiranje PD-L1 ekspresije i tumorsko mutacijsko opterećenje (TMB) doprinose selekciji pacijenata za imunoterapiju. Aktualne smjernice preporučuju testiranje FFPE uzoraka koji su standardizirani, a potiču i analizu non-FFPE uzoraka ukoliko je tkivni uzorak tumorskog materijala ograničen ili neadekvatan. Mogućnosti za precizno otkrivanje genetskih promjena i praćenje terapijskog odgovora, unatoč određenim ograničenjima, proširene su zahvaljujući RNA-based NGS tehnologiji i analizi ctDNA.

Mutacije u genima EGFR, ALK, ROS1 i KRAS ključni su biomarkeri koji određuju osjetljivost na specifične ciljane terapije. U slučaju EGFR mutacija, koje su česte kod pacijenata s nesitnostaničnim karcinomom pluća, posebno u azijskoj populaciji, tirozin-kinazni inhibitori (TKI) prve, druge i treće generacije učinkoviti su u liječenju. Slično tome, fuzije ALK i ROS1 također upućuju na primjenu specifičnih inhibitora tirozin kinaze, dok kod mutacija KRAS, poput G12C, novi selektivni inhibitori poput adagrasiba i sotorasiba predstavljaju perspektivne terapijske opcije. Napredne dijagnostičke metode, kao što su lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu, lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom, fluorescentna in situ hibridizacija, imunohistokemija i sekvenciranje nove generacije, omogućuju preciznu identifikaciju ovih genetskih promjena i pružaju temelj za optimalan terapijski pristup.

Uz napredak u tehnologiji i sve veću dostupnost molekularnih analiza, ove metode imaju ključnu ulogu u personaliziranoj medicini i poboljšanju ishoda liječenja pacijenata s karcinomima.

## 8 ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. prim. Lovorki Batelji Vuletić na pomoći, strpljenju i ljubaznosti koji su mi pruženi za vrijeme pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama na stalnoj podršci, savjetima i smijehu, koji su mi uljepšali i upotpunili ove studentske dane.

Na kraju, posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, mami Dubravki, tati Goranu i bratu Martinu. Vaša neizmjerne ljubav, podrška i vjera u mene bili su ključni za moj uspjeh.

## 9 LITERATURA

1. Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 23;19(4):1259.
2. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2011 Feb;6(2):244–85.
3. Xu L, Li C, Lu H. Invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Transl Cancer Res.* 2019 Dec;8(8):2924–32.
4. Zenali MJ, Weissferdt A, Solis LM, Ali S, Tang X, Mehran RJ, et al. An update on clinicopathological, immunohistochemical, and molecular profiles of colloid carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2015 Jun 1;46(6):836–42.
5. Gupta A, Harris K, Dhillon SS. Role of bronchoscopy in management of central squamous cell lung carcinoma in situ. *Ann Transl Med.* 2019 Aug;7(15):354.
6. Santos ES, Rodriguez E. Treatment Considerations for Patients With Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clin Lung Cancer.* 2022 Sep 1;23(6):457–66.
7. Niu Z, Jin R, Zhang Y, Li H. Signaling pathways and targeted therapies in lung squamous cell carcinoma: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Oct 5;7:353.
8. Sathirareuangchai S, Hirata K. Pulmonary Lymphoepithelioma-like Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2019 Jan 23;143(8):1027–30.
9. Chan AW, Chau SL, Tong JH, Chow C, Kwan JSH, Chung LY, et al. The Landscape of Actionable Molecular Alterations in Immunomarker-Defined Large-Cell Carcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol.* 2019 Jul;14(7):1213–22.
10. Li C, Lu H. Adenosquamous carcinoma of the lung. *OncoTargets Ther.* 2018 Aug 14;11:4829–35.
11. Jeong JH, Seo HJ, Yoon SH, Hong R. Pulmonary pleomorphic carcinoma presenting as undifferentiated non-small cell carcinoma with giant cells: A case report and review of literature. *Respir Med Case Rep.* 2020 Sep 14;31:101225.
12. Smyth RJ, Fabre A, Dodd JD, Bartosik W, Gallagher CG, McKone EF. Pulmonary blastoma: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes.* 2014 May 13;7:294.

13. Sökücü SN, Kocatürk C, Ürer N, Sönmezoğlu Y, Dalar L, Karasulu L, et al. Evaluation of Six Patients with Pulmonary Carcinosarcoma with a Literature Review. *Sci World J.* 2012 Apr 24;2012:167317.
14. Kwon HJ, Jang MH. SMARCA4-deficient undifferentiated thoracic tumor: A case report. *World J Clin Cases.* 2023 Apr 16;11(11):2521–7.
15. Park KS, Sung WJ. Pleomorphic Adenoma of the Trachea: A Case Report. *Korean J Pathol.* 2013 Aug;47(4):399–401.
16. Chen Z, Jiang J, Fan Y, Lu H. Pulmonary adenoid cystic carcinoma: molecular characteristics and literature review. *Diagn Pathol.* 2023 May 17;18:65.
17. Nakashima Y, Morita R, Ui A, Iihara K, Yazawa T. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the lung: a case report. *Surg Case Rep.* 2018 Jul 9;4:74.
18. Limaiem F, Lekkala MR, Sharma S. Mucoepidermoid Lung Tumor. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 May 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537277/>*
19. Shahi M, Dolan M, Murugan P. Hyalinizing Clear Cell Carcinoma of the Bronchus. *Head Neck Pathol.* 2017 Dec;11(4):575.
20. Leduc C, Zhang L, Öz B, Luo J, Fukuoka J, Antonescu CR, et al. Thoracic myoepithelial tumors: a pathologic and molecular study of 8 cases with review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2016 Feb;40(2):212–23.
21. Rekhtman N. Neuroendocrine Tumors of the Lung: An Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Nov 1;134(11):1628–38.
22. Megyesfalvi Z, Gay CM, Popper H, Pirker R, Ostoros G, Heeke S, et al. Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(6):620–52.
23. Yang L, Fan Y, Lu H. Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2022 Oct 11;28:1610730.
24. Suda K, Onozato R, Yatabe Y, Mitsudomi T. EGFR T790M Mutation: A Double Role in Lung Cancer Cell Survival? *J Thorac Oncol.* 2009 Jan;4(1):1–4.
25. Vyse S, Huang PH. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2019 Mar 8;4:5.
26. Guo L, Zhou G, Huang M, Tang K, Xu J, Chen J. The impact of EGFR T790M mutation status following the development of Osimertinib resistance on the efficacy of Osimertinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Clin Respir J.* 2024 Apr 7;18(4):e13748.
27. Dalurzo ML, Avilés-Salas A, Soares FA, Hou Y, Li Y, Stroganova A, et al. Testing for EGFR Mutations and ALK Rearrangements in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer:

- Considerations for Countries in Emerging Markets. *OncoTargets Ther.* 2021 Sep 1;14:4671–92.
28. Passaro A, Jänne PA, Mok T, Peters S. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nat Cancer.* 2021 Apr;2(4):377–91.
  29. Della Corte CM, Viscardi G, Di Liello R, Fasano M, Martinelli E, Troiani T, et al. Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Mol Cancer.* 2018 Feb 19;17(1):30.
  30. Shreenivas A, Janku F, Gouda MA, Chen HZ, George B, Kato S, et al. ALK fusions in the pan-cancer setting: another tumor-agnostic target? *NPJ Precis Oncol.* 2023 Sep 29;7:101.
  31. Davies KD, Doebele RC. Molecular Pathways - ROS1 Fusion Proteins in Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013 Aug 1;19(15):4040–5.
  32. Cui M, Han Y, Li P, Zhang J, Ou Q, Tong X, et al. Molecular and clinicopathological characteristics of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancers identified by next-generation sequencing. *Mol Oncol.* 2020 Nov;14(11):2787–95.
  33. Yang X, Tang Z, Li J, Jiang J, Liu Y. Progress of non-small-cell lung cancer with ROS1 rearrangement. *Front Mol Biosci.* 2023 Dec 22;10:1238093.
  34. Kim HJ, Lee HN, Jeong MS, Jang SB. Oncogenic KRAS: Signaling and Drug Resistance. *Cancers.* 2021 Nov 9;13(22):5599.
  35. Lim TKH, Skoulidis F, Kerr KM, Ahn MJ, Kapp JR, Soares FA, et al. KRAS G12C in advanced NSCLC: Prevalence, co-mutations, and testing. *Lung Cancer.* 2023 Oct;184:107293.
  36. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and Distinctive Spectrum of *KRAS* Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Sep 15;14(18):5731–4.
  37. Rekowski AK, Rola P, Kwiatkowska A, Wójcik-Superczyńska M, Gil M, Krawczyk P, et al. Abnormalities in the *KRAS* Gene and Treatment Options for NSCLC Patients with the G12C Mutation in This Gene—A Literature Review and Single-Center Experience. *Biomedicines.* 2024 Jan 31;12(2):325.
  38. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 May 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
  39. Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist.* 2020 Jun 23;42(3):48–53.
  40. Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press; 1990.

41. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet.* 2011;52(4):413–35.
42. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med.* 2019 Feb;16(1):4–10.
43. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol [Internet].* 2012 [cited 2024 Jun 4];2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398667/>
44. Martinković F. Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija.
45. J. Saller J, Boyle TA. *Molecular Pathology of Lung Cancer.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2022 Mar;12(3):a037812.
46. De Maglio G, Pasello G, Dono M, Fiorentino M, Follador A, Sciortino M, et al. The storm of NGS in NSCLC diagnostic-therapeutic pathway: How to sun the real clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2022 Jan 1;169:103561.
47. Eberhardt WEE, Ruyscher DD, Weder W, Péchoux CL, Leyn PD, Hoffmann H, et al. 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015 Aug 1;26(8):1573–88.
48. Vansteenkiste J, Crinò L, Doooms C, Douillard JY, Faivre-Finn C, Lim E, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014 Aug 1;25(8):1462–74.



## 10 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26.11.1999. godine u Zagrebu. Tamo sam pohađala Osnovnu školu Josipa Račića i istovremeno Osnovnu glazbenu školu Rudolfa Matza, smjer klavir. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u Gimnaziji Tituša Brezovačkog, nakon čega sam 2018. godine upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Tijekom studija, 2021. godine sudjelovala sam u mentorskom sustavu za bruceše, a u akademskim godinama 2022./2023. i 2023./2024. volontirala sam kao demonstrator na kolegiju Temelji neuroznanosti. Također, od 2022. godina članica sam Studentske sekcije za hitnu medicinu. Aktivno se služim engleskim jezikom. U slobodno vrijeme bavim se plesom.