

# Uloga sveobuhvatnog genskog profiliranja u onkoloških bolesnika u KBC-u Split

---

Vuko, Arijana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University Department of Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:301166>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-18**

SVEUČILIŠTE  
U  
SPLITU



SVEUČILIŠNI  
ODJEL ZA  
FORENZIČNE  
ZNANOSTI

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI**  
**FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA**

**DIPLOMSKI RAD**  
**ULOGA SVEOBUHVAATNOG GENSKOG PROFILIRANJA U**  
**ONKOLOŠKIH BOLESNIKA U KBC-u SPLIT**

**Arijana Vuko**

**Split, rujan 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI**  
**FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA**

**DIPLOMSKI RAD**  
**ULOGA SVEOBUHVAATNOG GENSKOG PROFILIRANJA U**  
**ONKOLOŠKIH BOLESNIKA U KBC-u SPLIT**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Snježana Tomić, dr. med.**

**Arijana Vuko**

**504/2019**

**Split, rujan 2021.**

Diplomski rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC-a Split, te na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti u Splitu, pod nadzorom mentorice prof. dr. sc. Snježane Tomić, dr. med. u vremenskom razdoblju od travnja do kolovoza 2021. godine.

**Datum predaje diplomskog rada: 01. rujan 2021.**

**Datum prihvatanja diplomskog rada: 08. rujan 2021.**

**Datum usmenog polaganja: 20. rujan 2021.**

**Povjerenstvo: 1. prof. dr. sc. Šimun Anđelinović, dr.med.**

**2. izv. prof. dr.sc. Željana Bašić**

**3. prof. dr. sc. Snježana Tomić, dr. med.**

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Sveobuhvatno gensko profiliranje.....	1
1.2. Genomske promjene u metastatskom nemalostaničnom adenokarcinomu pluća -NSCLC prema ESCAT klasifikaciji.....	4
1.3. Genetske promjene u metastatskom karcinomu dojke prema ESCAT klasifikaciji .....	5
1.4. Genetske promjene u metastatskom karcinomu debelog crijeva prema ESCAT klasifikaciji .	6
1.5. Genetske promjene u metastatskom karcinomu prostate prema ESCAT klasifikaciji .....	6
1.6. Genetske promjene u metastatskom karcinomu želuca prema ESCAT klasifikaciji.....	7
1.7. Genetske promjene u metastatskom duktalnom adenokarcinomu gušterače prema ESCAT klasifikaciji .....	7
1.8. Genetske promjene u metastatskom hepatocelularnom karcinomu prema ESCAT klasifikaciji .....	8
1.9. Genetske promjene u metastatskom kolangiokarcinomu prema ESCAT klasifikaciji .....	8
1.10. Ostale vrste malignih tumora.....	8
1.11. FoundationOne CDx testiranje .....	9
1.12. FoundationOne CDx izvještaj.....	11
1.13. Uzorci za <i>FoundationOne</i> testiranje .....	12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
2.1. Hipoteza.....	15
3. ISPITANICI I METODE .....	16
3.1. Ispitanici .....	16
3.2. Organizacija studije .....	16
3.3. Mjesto provođenja studije .....	16
3.4. Metode prikupljanja i obrade podataka.....	16
3.5. Opis istraživanja.....	16
3.6. Etička načela .....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1. Zbirni prikaz rezultata.....	18
4.2. Bolesnici s karcinomom bubrega .....	21
4.3. Bolesnici s karcinomom debelog crijeva .....	21
4.4. Bolesnici s adenokarcinomom pluća nemalih stanica, NSCLC.....	22
4.5. Bolesnice s karcinomom maternice .....	22
4.6. Bolesnice s karcinomom jajnika .....	23
4.7. Bolesnice s karcinomom dojke .....	23
4.8. Bolesnici s karcinomom želuca.....	24

4.9.	Bolesnici s glioblastomom .....	24
4.10.	Bolesnici s melanomom.....	25
4.11.	Bolesnici s karcinomom gušterače .....	25
4.12.	Bolesnik s medularnim karcinomom štitnjače .....	25
4.13.	Bolesnik s karcinomom intrahepatičnih žučnih vodova.....	26
4.14.	Bolesnik s adneksalnim karcinomom kože.....	26
4.15.	Bolesnica s karcinomom mokraćnog mjehura .....	26
4.16.	Bolesnik s nepoznatim primarnim karcinomom.....	27
4.17.	Bolesnik s mezoteliomom pleure .....	27
4.18.	Bolesnik s karcinomom papile Vateri .....	27
4.19.	Bolesnica s karcinomom žlijezda slinovnica .....	28
4.20.	Bolesnik s nediferenciranim pleomorfnim sarkomom .....	28
4.21.	Bolesnica s karcinomom timusa .....	28
5.	RASPRAVA.....	29
6.	ZAKLJUČCI.....	32
7.	LITERATURA .....	33
8.	SAŽETAK.....	39
9.	SUMMARY .....	41
10.	ŽIVOTOPIS.....	43
11.	IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI .....	45

# 1. UVOD

## 1.1. Sveobuhvatno gensko profiliranje

Razvoj novih molekularnih tehnika, kao što je masivno paralelno sekvencioniranje primjenom sekvencera nove generacije-NGS (*engl. new generation sequencing*) omogućio je automatiziranu detekciju različitih genskih promjena. Takva mogućnost donijela je novu dijagnostičku, kliničku i terapijsku primjenu u liječenju onkoloških bolesnika. Većina kliničkih i dijagnostičkih laboratorija provodi monogenska testiranja, primjenom lančane reakcije polimeraze-PCR (*engl. polimerasa chain reaction*) i NGS metode, dok sveobuhvatno gensko profiliranje nudi, u jednom testiranju, analizu promjena nekoliko stotina ciljanih gena uključenih u nastanak i progresiju tumora, tzv. *driver mutacija* (1, 2, 3).

Sveobuhvatno gensko profiliranje-CGP (*engl. comprehensive genomic profiling*) metoda je analize malignih tumora koja koristi NGS metodologiju za detekciju četiri glavne skupine promjena gena, za koje je poznato da utječu na rast malignih tumora (1):

- ✓ supstitucije baza
- ✓ insercije i delecije
- ✓ promjene broja kopija (CNA)
- ✓ preraspodjele i fuzije

Sveobuhvatno gensko profiliranje identificira biomarkere koji imaju prediktivno značenje i time utječe na izbor i predviđanje odgovora na liječenje onkoloških bolesnika i to najčešće ciljanom terapijom i imunoterapijom (4, 5, 6). Testiranje se može provesti na više vrsta uzoraka, uključujući: tkivo uklopljeno u parafin, perifernu krv, aspirat koštane srži ili uzorke dobivene citološkom punkcijom i uklopljene u stanične blokove (7).

Ovakav pristup širokog genskog profiliranja svakog pojedinog onkološkog bolesnika donosi višestruke pozitivne učinke i mogućnosti kao što su (6, 8, 9):

- individualizirani pristup u liječenju karcinoma.
- primjena ciljane imunoterapije lijekovima odobrenim od FDA prema tipu bolesnikova tumora ili za druge tipove tumora.
- otkrivanje novih genskih promjena neovisno o tipu tumora.
- razvoj novih ciljanih lijekova.

- mogućnosti uključivanja bolesnika u različite kliničke studije i eksperimentalna liječenja.
- procjenu uspješnosti djelovanja i razjašnjavanja mehanizama rezistencije na ciljanu terapiju.
- novi pristup u dijagnostici i klasifikaciji malignih oboljenja.
- određivanje mikrosatelitnog statusa (MSI).
- određivanje gubitka heterozigotnosti (LOH).
- određivanje mutacijskog opterećenja tumora (TMB).

Precizna, personalizirana medicina, nameće se kao standard u liječenju onkoloških bolesnika. NGS tehnologija je u širokoj primjeni, posebno u znanstveno istraživačkim ustanovama, a u tijeku su studije kojima se nastoje definirati preporuke za rutinsko uvođenje NGS metodologije u kliničke medicinske centre u svrhu liječenja onkoloških bolesnika (10). Europsko društvo kliničkih onkologa (ESMO) *engl. European society of medical oncologists*, je predložilo tri razine smjernica za rutinsku primjenu NGS-a: javno zdravstveni interes, znanstveno istraživački interes i interes pojedinog onkološkog bolesnika, uključujući i testiranje na vlastiti zahtjev (11). NGS se, u kliničkim centrima primjenjuje za sekvencioniranje velikih i složenih gena ili za sekvencioniranje većeg broja gena primjenom genskih panela ukoliko postoji zahtjev onkologa za detekciju ciljanih biomarkera u svrhu provođenja preciznog liječenja odobrenim ciljanim lijekovima (6, 8, 9, 10).

ESMO radna grupa sastavljena od stručnjaka u području kliničke genomike malignih tumora identificirala je, koje su genske promjene značajne kod osam najčešćih malignih tumora, i definirala ESCAT razine (*engl. ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets*). ESCAT klasifikacija svrstava i povezuje gensku promjenu s primjenom specifičnog ciljanog lijeka. ESCAT obuhvaća četiri razine povezanosti genske promjene mutacije i ciljanog lijeka (11).

- Prva ESCAT razina: detektirana promjena povezana je s specifičnom ciljanom terapijom koja je validirana kroz kliničke studije i odobrena u kliničkoj praksi od nadležne zdravstvene organizacije (11).
- Druga ESCAT razina: detektirana je promjena povezana s mogućim pozitivnim odgovorom na liječenje ciljanim lijekom u I/II fazi kliničkog ispitivanja ili postoji mogućnost liječenja kroz retrospektivno ili randomizirano kliničko istraživanje (11).



- Treća ESCAT razina: promjene koje su detektirane u pacijentovom tumoru nemaju odobrenu ciljanu terapiju za taj tip tumora, ali su imaju odobrene ciljane lijekove u drugim tipovima tumora (11).
- Četvrta ESCAT razina: promjene koje bi mogle biti meta ciljane terapije temeljeno na rezultatima predkliničkih istraživanja (11).

Prva ESCAT razina ima izravni utjecaj na liječenje onkoloških bolesnika, dok ostali nivoi upućuju na znanstvenu i istraživačku važnost primjene sveobuhvatnog genetskog profiliranja (11).

## **1.2. Genomske promjene u metastatskom nemalostaničnom adenokarcinomu pluća -NSCLC prema ESCAT klasifikaciji**

Mutacija gena za receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR) predstavlja prvu genetsku promjenu detektiranu u uznapredovalom karcinomu pluća nemalih stanica (NSCLC) (11, 12). Najčešće genetske promjene u EGFR genu su delecije u egzonu 19 i točkaste mutacije u egzonu 21 (L858R), te mutacija koja dovodi do stečene rezistencije na tirozin kinazne inhibitore (TKI) u egzonu 20 (T790M). Nekoliko randomiziranih studija faze III pokazuju da ciljani EGFR inhibitori tirozin kinaze (TKI) poboljšavaju ishod liječenja kod bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica, koji imaju mutaciju u EGFR genu (11, 13). Upravo zbog toga EGFR mutacije zauzimaju visoko mjesto na ESCAT razini.

Drugi prediktivni biomarker koji zauzima visoku razinu u ESCAT klasifikaciji je nalaz fuzijskog ALK gena. Ciljani ALK inhibitori (anaplastični limfom kinazni inhibitor) pokazuju bolji ishod liječenja kod bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica, koji imaju detektiranu fuziju ALK gena (14). Otkrivene su i druge genske alteracije: preskakanje MET 14 egzona, BRAF V600E mutacija i ROS1 fuzije (18). Studije faze I/II pokazuju kliničku dobit za pacijente s NSCLC koji imaju detektirano preskakanje MET 14 egzona i liječeni su ciljanim MET inhibitorima tirozin kinaze (TKI), kao što su krizotinib, kapmatinib ili tepotinib. Kliničko značenje ima i mutacija BRAF V600 i ciljano liječenje s dabrafenibom-vemurafenibom, te ROS1 fuzije i ciljano liječenje s krizotinibom, certinibom ili entrektinibom (15, 16, 17). Kod NSCLC-a se mogu naći i fuzije NTRK (neurotrofni tirozin kinaza receptor) i RET gena ali s niskim postotkom prevalencije. Inhibitori kinaznih receptora kao što su larotrektnib i entrektinib pokazali su klinički značajan učinak liječenja kod bolesnika s detektiranim NTRK i RET fuzijama (18). Zbog sveg navedenog, FDA (*engl. The Food and Drug Administration*) i EMA (*engl. European Medical Agency*) su odobrile primjenu ciljanih lijekova za liječenje bolesnika s metastatskim NSCLC s navedenim genskim promjenama. Identificirane su i genetske mutacije u KRAS, ERBB2 i PIK3CA genima koje imaju terapijski potencijal i pripadaju ESCAT 2. i 3. razini (19).

### **1.3. Genetske promjene u metastatskom karcinomu dojke prema ESCAT klasifikaciji**

Testiranje ERBB2 statusa ima prediktivni i prognostički značaj u primjeni ciljane anti-HER2 terapije koja pridonosi većoj stopi preživljenja do progresije bolesti i ukupnog preživljenja bolesnica koji imaju amplifikaciju ERBB2 gena, dok je liječenje neratinibom (nepovratni pan-HER TKI) klinički značajno i kod bolesnica kojima su detektirane mutacije ERBB2 gena (20).

Kod pacijentica s zametnom mutacijom BRCA1 i BRCA2 gena bilježi se pozitivan klinički odgovor i duže vrijeme do progresije bolesti kod ciljanog liječenja PARP (poli adenil ribozin polimeraze) inhibitorima (11, 21).

Primjena alpelisiba, ciljanog PI3K (fosfatidilinozitol 3 kinaza) inhibitora pokazuje bolji ishod liječenja i veću stopu preživljenja u pacijentica koje HER2 negativan metastatski tumor dojke i specifične PIK3CA točkaste mutacije (22).

Za rijetke genetske promjene detektirane u različitim solidnim tumorima, kao što su, visoka mikrosatelitska nestabilnost (MSI-H) i NTRK fuzije, odobrene su ciljane terapije za sve vrste tumora, uključujući i metastatski tumor dojke (18, 23).

Ostale mutacije kao što su mutacije PTEN, ESR1, AKT1, NF1 i MDM2 gena, pripadaju 2. i 3. razini ESCAT klasifikacije (11). Obzirom na veliki broj genetskih promjena, važno je uključiti bolesnice s metastatskim karcinomom dojke u programe molekularnog probira kako bi ih se usmjerilo u klinička istraživanja ciljanih lijekova koji odgovaraju genetskom profilu njihovih karcinoma (11).

#### **1.4. Genetske promjene u metastatskom karcinomu debelog crijeva prema ESCAT klasifikaciji**

Točkaste RAS (KRAS i NRAS) mutacije su prediktivni biomarkeri rezistencije na liječenje EGFR monoklonskim protutijelima (24). Prema III fazi istraživanja, dodatak enkorafeniba (BRAF inhibitor), cetuksimabu (EGFR inhibitor) pokazuje veću stopu preživljenja kod bolesnika kojima je detektirana BRAF V600 mutacija (25). Nalaz promjene u proteinima za popravak pogrešno sparenih baza DNA (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) imunohistokemijskom metodom i detekcija MSI-H molekularnim metodama imaju značajan klinički učinak predviđanja učinkovitosti imunoterapije pembrolizumabom i nivolumabom (26). Kao što je već spomenuto u većini solidnih tumora, pa tako i u metastatskom karcinomu debelog crijeva koji imaju NTRK fuziju, TRK inhibitori su se pokazali kao učinkovita ciljana terapija (18, 23).

Ostale mutacije kao što su ERBB2 amplifikacija, PIK3CA, ATK1, MET gena spadaju u 2. i 3. razinu ESCAT klasifikacije, stoga je potrebno bolesnike s metastatskim karcinomom debelog crijeva uključiti u programe molekularnog probira kako bi ih se usmjerilo u klinička istraživanja i ciljanih lijekova koji odgovaraju genetskom profilu njihovih karcinoma (11).

#### **1.5. Genetske promjene u metastatskom karcinomu prostate prema ESCAT klasifikaciji**

Pacijenti koji imaju somatske mutacije u BRCA1 ili BRCA 2 genu, pokazuju dobar klinički odgovor na liječenje PARP inhibitorima (27). Mutacije gena koji sudjeluju u popravku DNA, i gubitak MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 proteina, dovode do visoke mikrosatelitske nestabilnosti tumora (MSI-H) i kao takve imaju prediktivni značaj za odgovor na liječenje imuno terapijom (26).

Mutacijske promjene u PTEN genu su učestale kod metastatskog karcinoma prostate, a ciljana terapija AKT inhibitorima u kombinaciji s abirateronom pokazuje anti tumorsko djelovanje u preliminarnoj, II fazi randomiziranih istraživanja kod bolesnika s PTEN mutacijom (28). PTEN, ATM i PALB2 mutacije pripadaju 2. ESCAT razini (11). Mutacije PIK3CA i ATK1 gena koje pripadaju prvoj i drugoj razini ESCAT klasifikacije u drugim karcinomskim sijelima detektiraju se i u metastatskom karcinomu prostate, ali nisu terapijski validirane (11).

## **1.6. Genetske promjene u metastatskom karcinomu želuca prema ESCAT klasifikaciji**

Amplifikacija ERBB2 gena u karcinomu želuca se pojavljuje sa učestalošću od 15 % (11). Bolesnici s ovom genetskom promjenom su kandidati za ciljanu terapiju trastuzumabom, koja značajno pridonosi dužem preživljenju bolesnika s metastatskim karcinomom želuca (11, 29). Nalaz visoke mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-H) kandidira bolesnike za liječenje imuno terapijom, a detekcija NTRK fuzija za liječenje TRK inhibitorima (18, 26). Detektirane amplifikacije EGFR i MET gena pripadaju 2. razini ESCAT klasifikacije, te primjena ciljane terapije cetuksimabom i krizotinibom pokazuje ograničen odgovor i zahtijeva daljnja istraživanja (11).

Kod karcinoma želuca detektirane su i mutacije u PIK3CA, FGFR2, ATM, BRCA 1 i 2, ERBB3 genima, koje pripadaju prvoj i drugoj razini ESCAT klasifikacije u drugim malignim tumorima, ali nisu klinički i terapijski validirane u bolesnika s metastatskim karcinomom želuca (11).

## **1.7. Genetske promjene u metastatskom duktalnom adenokarcinomu gušterače prema ESCAT klasifikaciji**

Pacijenti koji imaju zametnu mutaciju BRCA1/2 gena pokazuju dobar klinički odgovor i duže vrijeme do progresije bolesti kod primjene PARP inhibitora olapariba (30), dok vrijednost detekcije somatskih BRCA1/2 mutacija nije klinički potvrđena (11). Kao i kod ostalih tumora, pacijenti koji imaju MSI-H status i detektiranu NTRK fuziju pokazuju klinički značajan odgovor u ciljanom liječenju imunoterapijom i TRK inhibitorima (18). Kod bolesnika sa adenokarcinomom gušterače detektirane genetske promjene u KRAS, PIK3CA, BRAF, MDM2, ERBB2 genima, nalaze se na visokoj razini ESCAT klasifikacije za druge maligne bolesti, dok u adenokarcinomu gušterače nemaju dokazano kliničko značenje (11).

## **1.8. Genetske promjene u metastatskom hepatocelularnom karcinomu prema ESCAT klasifikaciji**

Detektirane su brojne genetske promjene kod pacijenata sa metastatskim hepatocelularnim karcinomom, ali bez utjecaja na odabir ciljane terapije, od kojih je većina klinički značajna u drugim malignim tumorima. Kao i kod većine malignih tumora, ukoliko bolesnik ima MSI-H status i NTRK fuziju, kandidat je za liječenje odobrenom imunoterapijom i TRK inhibitorima (11).

## **1.9. Genetske promjene u metastatskom kolangiokarcinomu prema ESCAT klasifikaciji**

IDH1 mutacije se nalaze na prvoj razini ESCAT klasifikacije, kao i nalaz fuzije FGFR gena i pokazuju duže ukupno preživljenje i preživljenje do progresije bolesti nakon primjene pemigatiniba, selektivnog inhibitora receptora faktora rasta fibroblasta (11).

Kao i kod većine malignih tumora, ukoliko bolesnik ima MSI-H status i NTRK fuziju, kandidat je za liječenje odobrenom imuno terapijom i TRK inhibitorima (18, 31). Bolesnici s BRAF V600 mutacijom pokazuju klinički značajno produženje preživljenja nakon primjene TKI i za sada su u drugoj razini ESCAT klasifikacije (11).

Mutacije u PIK3CA, MET i RAS genima koje pripadaju prvoj i drugoj razini ESCAT klasifikacije u drugim tumorskim sijelima detektiraju se i u metastatskom kolangiocelularnom karcinomu, ali za sada nisu klinički validirane (11).

## **1.10. Ostale vrste malignih tumora**

Sustavno klasificiranje genetskih promjena prema ESCAT klasifikaciji rađeno je za osam najčešćih malignih tumora, ali je procijenjena i učestalost genetskih promjena koje pripadaju ESCAT razini jedan i kod ostalih vrsta tumora. Kod karcinoma jajnika, detekcija somatskih BRCA1/2 mutacija povezana je sa klinički potvrđenom i odobrenom terapijom PARP inhibitorima (11).

Studija KN158 je procijenila učinkovitost primjene pemrolizumaba prema statusu mutacijskog opterećenja tumora (TMB) u deset malignih tumora. Obzirom da je studija ograničena na određene tipove tumora, potrebne su dodatne studije prije uvođenja određivanja TMB-statusa za sve maligne tumore za procjenu liječenja imuno terapijom. TMB status je kvalificiran kao razina 2, prema ESCAT-u i za sada ima klinički značaj kod karcinoma vrata maternice, karcinoma slinovnica, karcinoma vulve, karcinoma štitnjače i NET-a (11).

Pokazalo se da su TRK inhibitori učinkoviti u širokom spektru karcinoma, ali se učestalost NTRK fuzija detektira u manje od 1 % malignih tumora (11, 18). Visoka incidencija NTRK fuzija se javlja kod sekretornog karcinoma dojke i nekih tumora dječje dobi, a intermedijarna kod Spitzoidnog melanoma i papilarnog karcinoma štitnjače (11).

### **1.11. FoundationOne CDx testiranje**

*Foundation Medicine* je molekularna informacijska kompanija čiji je cilj poboljšati pristup bolesnicima s malignim oboljenjima (32, 33). *FoundationOne CDx* test je prvi FDA odobren genetski test koji se može primijeniti u svim malignim tumorima (33). Odluka o liječenju bolesnika se zasniva na razumijevanju molekularnih promjena koje su dovele do nastanka i razvoja bolesti.

Informacije dobivene molekularnom analizom rezultiraju razvojem kliničkog pristupa i boljim razumijevanjem biologije bolesti.

*Foundation Medicine* kroz svoje proizvode koristi metodu NGS-a za identifikaciju 324 tumor vezanih gena s poznatim mutacijama u solidnim tumorima (*FoundationOne CDx* test), za analizu DNA i RNA slijeda u 405 gena i 265 genskih preslagivanja u hematološkim zloćudnim bolestima (*Foundation Heme* test), te online portal u kojemu onkolozi interaktivno procjenjuju informacije dobivene sekvencioniranjem za svakog pojedinog bolesnika (10, 11, 32, 33).

Dobiveni rezultati pomažu u donošenju odluka onkolozima o načinu liječenja za svakog pojedinog onkološkog bolesnika, omogućava im pristup liječenju kroz klinička istraživanja i pomaže farmaceutskoj industriji da identificira i razvije nove ciljane lijekove (11, 32, 33).

Osim analiza mutacija u genima uključenim u nastanak i progresiju tumora, primjenom ovih testova dobivaju se i informacije o mutacijskom opterećenju tumora, mikrosatelitnom statusu i statusu gubitka heterozigotnosti.

- **TMB**

Mutacijsko opterećenje tumora je prediktivni biomarker za primjenu imunoterapije kod različitih uznapredovalih malignih tumora. (34). TMB predstavlja ukupan broj nesinonimnih mutacija po kodirajućem dijelu karcinomskog genoma. Visoko mutacijsko opterećenje tumora rezultira većim brojem tumorskih neoantigena koje imunološke stanice mogu prepoznati. TMB status za veliki broj malignih tumora pripada 2. ESCAT razini (11, 32, 34).

- **MSI**

Mikrosatelitna nestabilnost je posljedica poremećaja u popravku pogrešno sparenih baza DNA (dMMR). Popravak DNA je neophodan za održavanje genetske stabilnosti. Nedavna istraživanja su otkrila da mikrosatelitski nestabilni tumori (MSI-H) s defektom popravka krivo sparenih baza (dMMR), bez obzira na njihovo primarno sijelo, pokazuju odličan terapijski odgovor na inhibitore imunoloških kontrolnih točaka, što je rezultiralo odobrenjem liječenja pemrolizumabom, monoklonskim protutijelom usmjerenim na protein programirane stanične smrti, PD-1 kod svih metastatskih tumora, neovisno o sijelu primarnog tumora (31).

- **LOH**

Poremećaj popravka dvolančanih lomova DNA mehanizmom homologne rekombinacije (HRD) ima veliki značaj u nastanku tumora. Uz mutacije BRCA1 i BRCA2 gena, mutacije čitavog niza drugih gena, i epigenetske promjene dovode do poremećaja popravka DNA mehanizmom homologne rekombinacije. Gubitak heterozigotnosti (LOH) koristi se za procjenu postojanja defekta homologne rekombinacije čime se omogućuje primjena liječenja PARP inhibitorima i u bolesnika koji imaju HRD uzrokovan nekim drugim genetskim promjenama osim mutacija BRCA1 i BRCA2 gena (32, 35). Uslijed HRD-a aktiviraju se rezervni mehanizmi koji su odgovorni za popravak oštećenja DNA, kao što su PARP proteini koji se vežu za jednolančana mjesta prekida gdje započinju popravak. Blokada PARP inhibitora, rezervnih mehanizama za popravak DNA, dovodi do sintetske letalnosti, odnosno smrti tumorskih stanica s defektom homologne rekombinacije. Bolesnici s HRD-om, kod kojih je detektirana BRCA mutacija ili gubitak heterozigotnosti, kandidati su za liječenje PARP inhibitorima u karcinomu jajnika, dojke, prostate i gušterače (32, 35, 36).



## 1.12. FoundationOne CDx izvještaj

### FoundationOne izvještaj sadržava:

- Informacije o bolesniku, naziv ustanove iz koje se uzorak šalje, ime liječnika koji je naručio test, ime patologa koji je odabrao materijal, datum prijema, lokaciju primarnog tumora i vrstu uzorka koji se koristi za testiranje (33).
- Pregled rezultata, nalaz genetskih promjena, uz navedene ciljane lijekove odobrene za liječenje u bolesnikovom tipu tumora, u drugim tipovima tumora, genetske nalaze na temelju kojih se može procijeniti da određeni ciljani lijek neće djelovati, kao i popis kliničkih studija u koje se bolesnik na temelju tipa tumora i genetskih promjena može uključiti (33).
- Opće informacije o FoundationOne<sup>®</sup> testu.

### Dodatne informacije u izvještaju:

- Informacije važne za testirani uzorak, npr. *reducirana osjetljivost NGS metode zbog loše kvalitete uzorka* (33).
- Kada se ažuriraju potencijalni podaci o lijekovima ili kliničkim studijama udruženim s identificiranim genomskim promjenama izdaje se izmijenjeno i dopunjeno izvješće za bolesnika (33).
- Lijekovi vezani s nedostatkom odgovora na liječenje kod bolesnika sa specifičnom genetskom promjenom se označavaju crvenom bojom, uz objašnjenje “*bolesnici mogu biti rezistentni na liječenje*” (33).

### Odjeljak o identificiranim genetskim promjenama sadrži detaljno objašnjenje koje se odnosi na:

- Svaki pojedini gen i njegovu promjenu (33).
- Učestalost promjene nađene u bolesnika sa istim ili sličnim tipom tumora (33).
- Prognostičko i biološko značenje svake detektirane promjene (33).
- Potencijalno prediktivno značenje u odabiru strategije liječenja za nađenu promjenu (33).

### **Odjeljak koji se odnosi na moguće načine liječenja pruža dodatne detalje o:**

- Odobrenim lijekovima na koje bolesnik sa specifičnim tipom tumora može biti osjetljiv ili rezistentan ovisno o genomskom profilu (33).
- Odobrenim lijekovima s kliničkim benefitom u bolesnika sa sličnim genetskim promjenama u drugim vrstama tumora, informacijama o odobrenim indikacijama i dodatnim objašnjenjima (33).

### **Odjeljak o kliničkim studijama omogućava:**

- Obrazloženje potencijalnih kliničkih studija (33).
- Ključne riječi koje se koriste za web pretraživanje *clinical trials*, relevantnih kliničkih studija (33).
- Detalje o trenutno dostupnim kliničkim istraživanjima u kojima bi bolesnik bio prihvatljiv kandidat na osnovu genomskog profila tumora (33).

### **Dodatak izvještaja sadrži:**

- Identificirane genske varijante nepoznatog značenja koje nisu spomenute na prvoj stranici izvješća (33).
- Cjeloviti popis gena analiziranih *FoundationOne*<sup>®</sup> testom, kako bi se prikazali svi geni u kojima nije bilo promjena (33).
- Detalje provođenja testa (33).
- Reference korištene za formiranje izvještaja (33).

## **1.13. Uzorci za *FoundationOne* testiranje**

Kao i za druga laboratorijska testiranja, prilikom pripreme i obrade uzoraka tkiva treba se voditi načelima i smjernicama dobre laboratorijske prakse, uz specifične zahtjeve sveobuhvatnog genskog testiranja. Kako bi NGS analiza bila uspješna potrebno je poštivati propisane smjernice i naputke referentnog laboratorija (5, 7, 9, 32, 33):

- Potrebno je izabrati parafinski blok s najvećim tumorskim fokusom i najvećim postotkom tumorskih stanica.
- Prihvatljivi su uzorci primarnog tumora, metastaza i recidiva.

- Preporuča se za analizu izabrati uzorak recidiva ili metastaze tumora iako je prihvatljiv i uzorak primarnog tumora, osim u situacijama kada je bolesnik primao ciljanu terapiju. U takvom se slučaju inzistira na uzorku metastaze ili recidiva, kako bi se, između ostaloga detektirali i potencijalni molekularni mehanizmi rezistencije na specifični lijek.
- Preporučena potrebna količina DNA je 50 ng, a uspješnost ekstrakcije ovisi i o udjelu tumorske strome.
- Optimalna veličina tkiva: 25 mm<sup>2</sup> (5 x 5mm, 3 x 8 mm, 25 x 1 mm).
- Minimalna prihvatljiva veličina tkiva je 5 mm<sup>2</sup> ukoliko se šalje 10 neobojenih stakalaca s histološkim rezom tumora, te 3 mm<sup>2</sup> ukoliko se šalju dodatna neobojena stakalca s histološkim rezom ili parafinski blok s tumorskim tkivom.
- Potrebno je imati više od 20 % tumorskih stanica u uzorku (udio nukleiranih tumorskih stanica u odnosu na ukupan broj nukleiranih stanica u uzorku), a optimalno je, više od 30 % tumorskih stanica. Veći udio tumora je iznimno važan u detekciji niske razine promjena broja kopija i detekcije određenih genetskih promjena, posebno genskih amplifikacija i definiranja MSI, TMB i LOH.
- Uz parafinski blok, potrebno je poslati i stakalce tumora obojeno standardnom hemalaun-eozin metodom.
- Fiksativ izbora je 10 % puferirani formalin. Potrebno je voditi računa o optimalnoj fiksaciji uzoraka jer je ona preduvjet za uspješnu analizu.
- Umjesto parafinskog bloka, za analizu se može poslati 10 neobojenih histoloških rezova, na pozitivno nabijenim stakalcima, debljine 5 mikrona.

Kako bi se omogućile dodatne molekularne analize tumorskog tkiva potrebno je educirati radiologe i kliničare koji uzimaju endoskopske biopsije da je potrebno uzeti veći broj iglenih i endoskopskih biopsija, a gdje god je to moguće, od citoloških uzoraka napraviti tkivne blokove. Nužna je kvalitetna suradnja kliničara, patologa, onkologa i laboratorijskih tehnologa i analitičara. Kvalitetan i dostatan uzorak jamči uspješnost provođenja genetskog profiliranja.

Svaki materijal zaprimljen u patohistološki laboratorij će se možda koristiti za genomsko testiranje, stoga je potreban standardiziran pristup uzorcima (7, 8, 32, 33):

- Primijeniti protokol očuvanja tkiva, reducirati broj rezova koji se boje metodom H&E i imunohistokemijskim metodama. Koristiti minimalnu količinu uzorka za postavljanje dijagnoze, minimizirati uporabu dijagnostičke imunohistokemije, osim za nužne biomarkere.
- Unaprijed narezati stakalca za eventualne dijagnostičke metode a ukoliko je zatražena i molekularna analiza i za molekularne studije. Kako bismo osigurali dostatnu količinu tkiva, blokove ne bi trebalo rezati u više od dva navrata od početka do završetka dijagnostike.
- Svi tkivni blokovi namijenjeni potencijalnom genomskom testiranju trebaju biti posebno označeni, npr. smješteni u kazetice odgovarajuće boje. Takvi se uzorci ne režu u više razina, niti se na njima rade rezovi za imunohistokemijsku analizu.
- Patolozi i laboratorijski djelatnici u radu s uzorcima moraju voditi računa da sačuvaju i optimalno obrade materijale koji će se koristiti za potencijalno genomsko profiliranje, primjenjujući posebne tehnike preuzimanja (uzorkovanja) i obrade tkiva kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija materijalom koji pripada drugom bolesniku.
- Ukoliko je došlo do kontaminacija bloka materijalom koji pripada drugom bolesniku, kontaminirane fragmente treba odstraniti iz bloka, odvojiti ili ih označiti na stakalcu prije slanja u referentni laboratorij na genomsko testiranje.
- Odvojeno fiksirati male količine mekšeg tkiva koje se razdvoji od tvrđe kosti, odvojeno pohraniti i označiti “za potencijalno genomsko testiranje” prije nego što se koštani ostatak materijala podvrgne procesu dekalcinacije.
- Nikada ne koristiti jake kiseline u procesu dekalcinacije ukoliko je riječ o metastazi u kost.
- Ako imamo dijagnozu litičke koštane metastaze i poznato nam je sjelo primarnog tumora, treba pokušati uzorak obraditi na klasičan način i rezati bez da je uzorak prošao proces dekalcinaciju.
- Ako je dekalcinacija neophodna, koristiti EDTA.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Prikazati rezultate sveobuhvatnog genskog testiranja za 76 pacijenata iz KBC-a Split u 2020. godini.
- Ukazati na značaj sveobuhvatnog genskog profiliranja u liječenju onkoloških bolesnika.
- Prikazati prednosti i nedostatke sveobuhvatnog genskog testiranja nad standardnim monogenskim testiranjima.
- Ukazati na značaj i utjecaj predanalitičke obrade uzoraka tkiva uklopljenog u parafin, na uspješnost sveobuhvatnog genskog testiranja.

### 2.1. Hipoteza

- Očekujemo da će se sveobuhvatnim genskim profiliranjem primjenom FoundationOne CDx testa izdvojiti veći broj bolesnika koji su kandidati za primjenu ciljanog liječenja odobrenog u specifičnom tipu tumora u odnosu na monogenska testiranja koja se provode u Laboratoriju za molekularnu patologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.
- Očekujemo da će se sveobuhvatnim genskim profiliranjem identificirati bolesnici koji će na temelju genetskih i genomskih promjena biti kandidati za uključivanje u kliničke studije i nove, eksperimentalne metode liječenja.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

U svrhu ovog istraživanja pregledani su nalazi za 76 pacijenata s različitim sijelima tumora čiji su uzorci tkiva tijekom 2020. godine poslani na sveobuhvatno gensko profiliranje primjenom FoundationOne CDx testa, kako bi se procijenio daljnji način liječenja bolesnika na temelju genskih osobitosti tumora.

#### **3.2. Organizacija studije**

Riječ je o retrospektivnoj presječnoj studiji. Istraživanje je prema ustroju kvalitativno, a prema obradi podataka i intervenciji opisnog tipa.

#### **3.3. Mjesto provođenja studije**

Istraživanje se provodilo u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

#### **3.4. Metode prikupljanja i obrade podataka**

Podaci su prikupljeni pregledom nalaza iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Svi prikupljeni podaci uneseni su u računalni program Microsoft Excel u svrhu obrade podataka.

#### **3.5. Opis istraživanja**

U ovom jednogodišnjem retrospektivnom istraživanju izvor podataka su nalazi sveobuhvatnog genskog profiliranja uzoraka tkiva bolesnika s metastatskim tumorima različitih sijela.

Svakom pacijentu uključenom u istraživanje analizirani su sljedeći parametri: dob, spol, lokacija primarnog tumora, genske promjene koje imaju odobrenu ciljanu terapiju u

bolesnikovu tipu tumora, genske promjene koje imaju odobrenu ciljanu terapiju u drugom tipu tumora, genske promjene koje nemaju odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovu tipu tumora ni u drugom tipu tumora, genske promjene koje predviđaju slabiji odgovor na ciljanu terapiju, mikrosatelitni status, status mutacijskog opterećenja tumora, a u bolesnica s karcinomom jajnika i gubitak heterozigotnosti (LOH).

Za potrebe statističke obrade dobiveni su nalazi svrstani u sljedeće kategorije:

**Odobreni lijek u bolesnikovom tipu tumora:** uključuje bolesnike koji imaju genske promjene s odobrenom ciljanom terapijom u bolesnikovu tipu tumora. Uz te mutacije mogu imati i genske promjene koje imaju odobrenu ciljanu terapiju u drugom tipu tumora.

**Odobreni lijek u drugom tipu tumora:** uključuje bolesnike koji imaju genske promjene s odobrenom ciljanom terapijom u drugom tipu tumora.

**Bez odobrenog lijeka:** uključuje bolesnike s genskim promjenama koje nemaju odobrenu ciljanu terapiju niti u bolesnikovu tipu tumora niti u drugom tipu tumora, kao i bolesnike koji nemaju detektiranu niti jednu mutaciju.

**Mutacijsko opterećenje tumora:** visoko mutacijsko opterećenje tumora, nisko mutacijsko opterećenje tumora, mutacijsko opterećenje tumora se nije moglo odrediti.

**Mikrosatelitska nestabilnost:** mikrosatelitski stabilni tumori, mikrosatelitski nestabilni tumori, mikrosatelitski status se nije mogao odrediti.

**Gubitak heterozigotnosti (LOH):** nalaz LOH bez BRCA mutacije, nalaz LOH-a s BRCA mutacijama, ne nalazi se LOH, LOH se nije mogao odrediti.

### **3.6. Etička načela**

Tijekom i nakon istraživanja zaštićena su prava i osobni podaci ispitanika u skladu sa Zakonom o zaštiti prava bolesnika (NN169/04, 37/08) i Zakonom o zaštiti osobnih podataka (NN 103/03-106/12), a istraživanje je usklađeno s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN 55/08, 139/15) te pravilima Helsinške deklaracije (1964.-2013.).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Zbirni prikaz rezultata

- Analizirani su nalazi dobiveni primjenom FoundationOne CDx testa u razdoblju od 1. 3. 2020. do 31. 12. 2020. godine za 76 bolesnika, 21 (27,63 %) muškarca i 55 (72,37 %) žena, u dobi od 28 do 79 godina. Srednja dob bolesnika je 58 godina.
- Od ukupnog broja analiziranih tumora, 19 (25 %) je tumora jajnika, 13 (17 %) tumora maternice, 11 (14,47 %) tumora dojke, 6 (7,89 %) tumora debelog crijeva, četiri (5,26 %) tumora pluća, četiri tumora bubrega, tri (3,95 %) melanoma, dva (2,63 %) tumora želudca, dva (2,63 %) tumora gušterače, dva (2,63 %) glioblastoma, te 10 (13,16 %) rijetkih tumora koji pripadaju ostalim sijelima.
- Od 76 testiranih bolesnika, 27 pacijenata (35,53 %), su temeljem detektiranog genetskog statusa kandidati za odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora. Kod 25 pacijenata (32,89 %) detektiran je genetski status za kojeg je odobren lijek u drugom tipu tumora, dok su 24 pacijenta (31,58 %), na osnovu genetskog profila, bez odobrenog lijeka.
- Od 76 testiranih bolesnika, 49 (64,47 %) ih je bez ciljane odobrene terapije u bolesnikovom tipu tumora.
- Od 27 pacijenata koji su temeljem genetskog profila kandidati za ciljanu odobrenu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, 9 (33,33 %) ih je s tumorom jajnika, 8 (29,63 %) s tumorom dojke, troje (11,11 %) s tumorom pluća, dva (7,41 %) s tumorom debelog crijeva, dva (7,41 %) s melanomom, jedan (3,70 %) s tumorom bubrega, jedan (3,70 %) s tumorom gušterače i jedan (3,70 %) s medularnim karcinomom štitnjače.
- Od 24 pacijenta koji su temeljem genetskog profila bez odobrene terapije u bolesnikovom tipu tumora kao i u drugom tipu tumora, 12 pacijenata (50 %) ima detektirane mutacije za koje se provode klinička istraživanja u bolesnikovom tipu tumora i u drugim tumorima. Kod 4 bolesnika (16,67 %) detektirane su promjene koje



su vezane za slabiji odgovor i rezistenciju na terapiju, dok kod 8 bolesnika (33,33 %) nije detektirana niti jedna genska promjena koja bi rezultirala ciljanom terapijom, eksperimentalnim liječenjem ili kliničkom studijom.

- Od 76 testiranih pacijenata 8 (10,52 %) ih je bez ijedne genske promjene, i to jedan pacijent s kolangiokarcinomom, jedan s tumorom želuca, jedna pacijentica s tumorom uterusa, jedna s tumorom dojke, dvije s tumorom jajnika, te dva pacijenta s tumorom bubrega.
- Od 25 pacijenata koji temeljem genetskog profila imaju odobrenu terapiju u drugom tipu tumora, 10 (40 %) ih je s tumorom maternice, četiri (16%) s tumorom jajnika, 2 (8%) s glioblastomom, 1 (4 %) sa sarkomom, 1 (4 %) s tumorom timusa, 1 (4 %) s tumorom gušterače, te 1 (4 %) s mezoteliomom, 1 (4 %) s tumorom bubrega, 1 (4 %) s tumorom pluća, 1 (4 %) s tumorom mokraćnog mjehura, 1 (4 %) s adneksalnim tumorom kože, te 1 (4 %) s tumorom nepoznatog sijela.
- Od 24 pacijenta koji su temeljem genetskog profila bez odobrene terapije u bolesnikovom tipu tumora kao i u drugom tipu tumora, šest (25 %) ih je s tumorom jajnika, 4 (16,67 %) s tumorom debelog crijeva, 3 (11,54 %) s tumorom maternice, 3 (11,54 %) s tumorom dojke, 2 (8,33 %) s tumorom želuca, 2 (8,33 %) s tumorom bubrega, 1 (4,17 %) s melanomom, 1 (4,17 %) s tumorom slinovnica, 1 (4,17 %) s tumorom papille Vateri, te 1 (4,17 %) s kolangiokarcinomom.
- Od 76 testiranih bolesnika, 64 (84,21 %) imaju mikrosatelitski stabilne tumore, dok su u četiri (5,26 %) bolesnika nađeni tumori s visokom mikrosatelitskom nestabilnošću. Kod 8 (10,53 %), pacijenata radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće detektirati mikrosatelitni status.
- Od 76 testiranih bolesnika, 59 pacijenata (77,63 %) ima tumore u kojima je detektirano nisko mutacijsko opterećenje tumora, dok 10 pacijenata (13,16 %) imaju tumore u kojima je detektirano visoko mutacijsko opterećenje tumora. Kod 7 pacijenata (9,21 %), radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće detektirati TMB status.

- Od 76 testiranih tumora, 59 (77,63 %) ih pokazuje mikrosatelitnu stabilnost s niskim mutacijskim opterećenjem tumora. Kod 7 (9,21 %) tumora, radi neadekvatnog uzorka nije bila moguća detekcija statusa. Četiri (5,26 %) pacijenta imaju tumore koji pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost s visokim mutacijskim opterećenjem tumora, pet (6,58 %) ih ima tumore kojima je detektirana mikrosatelitna stabilnost s visokim mutacijskim opterećenjem tumora, dok kod jednog (1,32 %) pacijenta, radi neadekvatnog uzorka nije bila moguća detekcija mikrosatelitnog statusa, ali je detektirano visoko mutacijsko opterećenje tumora.
- Od 27 pacijenata koji imaju odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, 10 bolesnika (37,04 %) ima genetske promjene koje se rutinski testiraju u Laboratoriju za molekularnu patologiju KBC-a Split, dok je mutacijski profil za 17 pacijenata (62,96 %) detektiran metodom sveobuhvatnog genskog profiliranja i to za tumore bubrega, pluća, jajnika, dojke, melanoma, gušterače i štitnjače.
- Od 76 testiranih bolesnika, kod 62 (81,58 %) su uspješno detektirane genetske mutacije kao i MS i TMB status, dok kod 14 (18,42 %), zbog neadekvatne kvalitete testiranih uzoraka nije bilo moguće odrediti potpuni molekularni profil i to: MS, TMB i LOH status kao i amplifikaciju nekih gena.

## **4.2. Bolesnici s karcinomom bubrega**

Testirana su četiri bolesnika, dva muškarca i dvije žene. Dob bolesnika je od 28 do 77 godina.

Od četiri testirana bolesnika, jedan (25 %) je temeljem detektiranog genetskog statusa kandidat za odobrenu, ciljanu terapiju. Kod jednog (25 %) je detektiran genetski status koji ima odobreni lijek u drugom tipu tumora. Kod dvojice (50 %) nije detektirana niti jedna genska promjena koja je povezana s mogućnošću ciljane terapije, eksperimentalnog liječenja ili kliničkih studija.

Kod sva četiri bolesnika tumori su bili mikrosatelitski stabilni s niskim mutacijskim opterećenjem tumora.

## **4.3. Bolesnici s karcinomom debelog crijeva**

Testirano je šest bolesnika, pet muškaraca i jedna žena. Dob bolesnika je od 33 do 63 godine.

Od 6 testiranih bolesnika, dvoje (33,33 %) imaju detektirane mutacije koje pripadaju ESCAT-1. razini i generiraju odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora. Detektirane genske promjene pripadaju standardnim monogenskim testiranjima koja se provode u Laboratoriju za molekularnu patologiju KBC-a Split.

Četiri bolesnika (66,67 %) su bez odobrene terapije, a uz mutacije koje predviđaju rezistenciju na ciljanu terapiju imaju detektirane mutacije koje pripadaju ESCAT 2.-3. razini i predstavljaju mogućnost liječenja kroz kliničke studije i eksperimentalna liječenja.

Kod jednog bolesnika (16,67 %), koji je na osnovi genetskog statusa, kandidat za odobrenu ciljanu terapiju, detektirana je visoka mikrosatelitna nestabilnost (MSI-H) i visoko mutacijsko opterećenje tumora.

Kod pet bolesnika (83,33 %) tumori su bili mikrosatelitski stabilni uz nisko mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.4. Bolesnici s adenokarcinomom pluća nemalih stanica, NSCLC**

Testirana su četiri bolesnika, tri muškaraca i jedna žena. Dob bolesnika je od 65 do 72 godine.

Od četiri testirana bolesnika, tri (75 %) su temeljem genskog statusa kandidati za odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora. Kod sva tri pacijenta su detektirane genske promjene za koje se ne provodi testiranje u KBC Split. Kod jednog pacijenta (25 %) detektirana je genska promjena za koju je odobren lijek u drugom tipu tumora.

Kod sva 4 bolesnika detektirana je mikrosatelitna stabilnost. Kod jednog bolesnika (25 %) detektirano je visoko mutacijsko opterećenje tumora, dok je za tri (75 %) bolesnika detektirano nisko mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.5. Bolesnice s karcinomom maternice**

Testirano je 13 bolesnica. Dob bolesnica je od 41 do 72 godine.

Od 13 testiranih bolesnica, 10 (76,92 %) ima detektirane genetske promjene za koje postoji odobreni lijek u drugom tipu tumora. Kod tri (23,08 %) su detektirane genetske promjene za koje nema odobrene terapije.

Tri bolesnice (23,08 %) imaju tumore kojima je određena mikrosatelitna nestabilnost (MSI-H), kod 10 pacijentica (76,92 %) tumori su mikrosatelitski stabilni.

Kod pet bolesnica (38,46 %), detektirano je visoko mutacijsko opterećenje tumora. Tri bolesnice koje imaju visoko mutacijsko opterećenje tumora, pokazuju i visoku mikrosatelitnu nestabilnost.

8 bolesnica (61,54 %) imaju tumore s niskim mutacijskim opterećenjem tumora.

#### **4.6. Bolesnice s karcinomom jajnika**

Testirano je 19 bolesnica. Dob bolesnica je od 47 do 79 godina.

Od 19 testiranih bolesnica, 9 (47,37 %) su temeljem detektiranih genskih promjena kandidatkinje za odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora. Kod četiri pacijentice (21,05 %) detektiran je genetski status za kojeg je odobren lijek u drugom tipu tumora, dok je 6 pacijentica (31,58 %), na osnovu genetskog profila, bez odobrenog lijeka.

Od 9 bolesnica koje imaju detektirane mutacije za koje postoji ciljana terapija u bolesnikovom tumoru, 6 ima mutacije koje se, za sada ne testiraju u KBC-u Split u okviru ciljanih monogenskih testova.

Kod 18 bolesnica tumori su bili mikrosatelitski stabilni s niskim mutacijskim opterećenjem tumora, dok jednoj, radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitni status, kao ni status mutacijskog opterećenja tumora.

Kod tri bolesnice (16,67 %), detektiran je gubitak heterozigotnosti, bez BRCA mutacija. dok je kod druge tri (16,67 %), uz gubitak heterozigotnosti detektirana i BRCA mutacija. Za tri bolesnice (16,67 %), radi neadekvatnog uzorka, nije bilo moguće utvrditi LOH status. Kod 9 bolesnica (50 %), nije detektiran klinički značajan gubitak heterozigotnosti.

#### **4.7. Bolesnice s karcinomom dojke**

Testirano je 11 bolesnica. Dob bolesnica je od 35 do 70 godina.

Od 11 testiranih bolesnica, njih 8 (72,73 %) su temeljem detektiranih genskih promjena kandidatkinje za odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, dok su tri pacijentice (27,27 %), na osnovu genetskog profila, bez odobrenog lijeka.

Od osam bolesnica koje imaju detektirane mutacije za koje postoji ciljana terapija u bolesnikovom tumoru, tri pacijentice imaju mutacije koje se, za sada ne testiraju u kliničkim laboratorijima u okviru ciljanih monogenskih testova.

Kod svih 11 bolesnika tumori su mikrosatelitski stabilni.

Kod dvije bolesnice (18,18 %) detektirano je visoko mutacijsko opterećenje tumora, dok je u preostalih 9 (81,82 %) mutacijsko opterećenje tumora nisko.

#### **4.8. Bolesnici s karcinomom želuca**

Testirana su dva bolesnika u dobi od 44 i 65 godina.

Kod ovih bolesnika nisu nađene genske promjene koje imaju odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovu tipu tumora kao ni u drugom tipu tumora.

Kod jednog bolesnika tumor je bio mikrosatelitski stabilan uz nisko mutacijsko opterećenje tumora, dok kod drugog, radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status, kao ni mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.9. Bolesnici s glioblastomom**

Testirana su 2 bolesnika u dobi od 52 i 57 godina.

Bolesnici imaju detektirane mutacije koje pripadaju ESCAT 2. i 3. razini za koje postoje odobrene terapije u drugom tipu tumora i predstavljaju mogućnost liječenja kroz kliničke studije i eksperimentalna liječenja.

Kod jednog bolesnika tumor je bio mikrosatelitski stabilan uz nisko mutacijsko opterećenje tumora, dok kod drugog, radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status, kao ni mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.10. Bolesnici s melanomom**

Testirana su tri bolesnika, dva muškarca i jedna žena u dobi od 38 do 70 godina.

Od tri testirana bolesnika, 2 su (66,67 %) temeljem detektiranih genetskih promjena kandidati za odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, dok je jedan (33,33 %), na osnovu genskog profila, bez odobrenog lijeka.

Kod dva bolesnika tumori su bili mikrosatelitski stabilni uz nisko mutacijsko opterećenje tumora, a kod jednog, radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status, kao ni mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.11. Bolesnici s karcinomom gušterače**

Testirana su dva bolesnika, jedan muškarac i jedna žena u dobi od 37 i 45 godina.

Od dva testirana bolesnika, kod jednog (50 %) je detektirana mutacija koja pripada ESCAT 1. razini, za koju postoji odobrena ciljana terapija u bolesnikovom tipu tumoru.

Kod drugog bolesnika (50 %) detektirane mutacije pripadaju ESCAT 2. i 3. razini i predstavljaju mogućnost liječenja kroz kliničke studije i eksperimentalna liječenja.

Kod oba bolesnika detektirana je mikrosatelitska stabilnost i nisko mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.12. Bolesnik s medularnim karcinomom štitnjače**

Testiran je jedan bolesnik u dobi od 52 godine.

Kod testiranog pacijenta je detektirana genska promjena koja pripada ESCAT 1. razini, za koju postoji odobrena ciljana terapija u bolesnikovom tipu tumoru.

Detektirana je mikrosatelitska stabilnost i nisko mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.13. Bolesnik s karcinomom intrahepatičnih žučnih vodova**

Testirana je jedna bolesnica u dobi od 64 godine.

Testirana bolesnica nema detektiranu niti jednu gensku promjenu koja bi rezultirala ciljanom terapijom, eksperimentalnim liječenjem ili kliničkom studijom.

Tumor je bio mikrosatelitski stabilan s niskim mutacijskim opterećenjem tumora.

#### **4.14. Bolesnik s adneksalnim karcinomom kože**

Testiran je jedan bolesnik u dobi od 74 godine.

Bolesniku su detektirane mutacije koje imaju odobrenu terapiju u drugom tipu tumora.

Radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status, kao ni status mutacijskog opterećenja tumora.

#### **4.15. Bolesnica s karcinomom mokraćnog mjehura**

Testirana je jedna bolesnica u dobi od 63 godine

Bolesnici su detektirane mutacije koje imaju odobrenu terapiju u drugom tipu tumora.

Detektirana je mikrosatelitska stabilnost i nisko mutacijsko opterećenje tumora.



#### **4.16. Bolesnik s nepoznatim primarnim karcinomom**

Testiran je jedan bolesnik u dobi od 52 godine.

Bolesniku su detektirane mutacije koje imaju odobrenu terapiju u drugom tipu tumora.

Radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status.

Detektirano je visoko mutacijsko opterećenje tumora, navedeni status kod drugog tipa tumora ima odobrenu imuno terapiju.

#### **4.17. Bolesnik s mezoteliomom pleure**

Testiran je jedan bolesnik u dobi od 52 godine.

Bolesniku je detektirana mutacija za koju postoji odobrena terapija u drugom tipu tumora.

Radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status, kao ni status mutacijskog opterećenja tumora.

#### **4.18. Bolesnik s karcinomom papile Vateri**

Testiran je jedan bolesnik u dobi od 55 godina.

Bolesniku su detektirane mutacije koje nemaju odobrenu terapiju u bolesnikovom tipu tumora niti u drugom tipu tumora.

Radi neadekvatnog uzorka nije bilo moguće utvrditi mikrosatelitski status, kao ni status mutacijskog opterećenja tumora.

#### **4.19. Bolesnica s karcinomom žlijezda slinovnica**

Testirana je jedna bolesnica u dobi od 51 godine.

Bolesnici su detektirane mutacije koje nemaju odobrenu terapiju u bolesnikovom tipu tumora niti u drugom tipu tumora.

Detektirana je mikrosatelitska stabilnost i nisko mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.20. Bolesnik s nediferenciranim pleomorfim sarkomom**

Testiran je jedan bolesnik u dobi od 74 godine.

Bolesnik ima detektiranu mutaciju za koju postoji terapija u drugom tipu tumora.

Detektirana je mikrosatelitska stabilnost i nisko mutacijsko opterećenje tumora.

#### **4.21. Bolesnica s karcinomom timusa**

Testirana je jedna bolesnica u dobi od 39 godina.

Bolesnici su detektirane mutacije koje pripadaju ESCAT 2. i 3. razini i predstavljaju mogućnost liječenja terapijom odobrenom za drugi tip tumora i eksperimentalnom terapijom.

Detektirana je mikrosatelitska stabilnost i nisko mutacijsko opterećenje tumora.

## 5. RASPRAVA

Ovo istraživanje prvo je istraživanje uloge sveobuhvatnog genskog profiliranja primjenom FoundationOne CDx testa u bolesnika s metastatskim tumorima različitih sijela u KBC-u Split kojim se željelo istražiti i prikazati kolika je vrijednost ovog testiranja u detekciji genetskih i genomskih promjena koje mogu izdvojiti veći broj bolesnika sa specifičnim genskim profilom koji su kandidati za ciljanu terapiju ili uključenje u kliničke sudije i eksperimentalne metode liječenja.

Rezultati istraživanja potvrđuju naše hipoteze i pokazuju da je, kao i u do sada objavljenim studijama, upravo u najčešćim sijelima malignih tumora kao što su: karcinomi jajnika, dojke, debelog crijeva i pluća, detektiran veći udio bolesnika s odobrenom terapijom u bolesnikovom tipu tumora, što nije neobično jer su baš u ovim tumorima najbolje istražene molekularne promjene koje su u proteklom desetljeću dovele do razvoja ciljanih lijekova. (11, 32).

Kod karcinoma maternice, glioblastoma, timusa i drugih manje učestalih malignih tumora nismo pronašli mutacije s odobrenom terapijom u bolesnikovom tipu tumora, ali upravo zahvaljujući ovakvim testiranjima otkriveni su novi, potencijalni biomarkeri koji mogu biti meta za razvoj ciljane terapije specifične za taj tip tumora.

Kod četiri bolesnika (5,26 %) detektirane su promjene koje su vezane za slabiji odgovor i rezistenciju na terapiju, u prvom redu u karcinomu debelog crijeva, jednom od prvih malignih tumora kod koji se započelo s liječenjem metastatskih tumora ciljanim anti EGFR lijekovima (28), dok kod samo 8 bolesnika (10,52 %) nije detektirana niti jedna genska promjena koja bi rezultirala ciljanom terapijom, eksperimentalnim liječenjem ili kliničkom studijom. I ovakav rezultat testiranja nam još jednom potvrđuje različitosti genskih profila tumora, te predstavlja skupinu bolesnika čiji će rezultati možda biti predmet budućih istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja i otkrivanja novih puteva nastanka i liječenja malignih tumora.

Uz imunohistokemijsko određivanje liganda programirane stanične smrti i receptora za ligand programirane stanične smrti, pojavila su se i dva nova prediktivna biomarkera: mikrosatelitska nestabilnost i mutacijsko opterećenje tumora (11, 32, 34, 37).

Mikrosatelitska nestabilnost, koju osim primjenom sveobuhvatnog genskog profiliranja možemo s visokom razinom pouzdanosti detektirati i manje zahtjevnim metodama, kao što je imunohistokemijka analiza i PCR, odobrena je kao prvi pantumorski marker. Bolesnici s nalazom visoke mikrosatelitske nestabilnosti, neovisno o lokaciji tumora, kandidati su za liječenje inhibitorom kontrolnih točaka, pembrolizumabom (23, 37).

I iako je imunohistokemijsko određivanje PD-L1, status mikrosatelitske nestabilnosti i visoko mutacijsko opterećenje tumora prediktor dobrog odgovora na imunoterapiju njihovo preklapanje nije potpuno (11, 31, 34), što dodatno upućuje na važnost testiranja ovih biomarkera.

U našem istraživanju, četiri (5,26 %) pacijenta imaju tumore koji pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost s visokim mutacijskim opterećenjem tumora, pet (6,58 %) ih ima tumore kojima je detektirana mikrosatelitna stabilnost s visokim mutacijskim opterećenjem tumora, dok kod jednog (1,32 %) pacijenta, radi neadekvatnog uzorka nije bila moguća detekcija mikrosatelitnog statusa, ali je detektirano visoko mutacijsko opterećenje tumora, što je u skladu s rezultatima do sada objavljenih studija (11, 32).

Od 27 pacijenata koji imaju odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, 10 bolesnika (37,04 %) ima genetske promjene koje se rutinski testiraju u Laboratoriju za molekularnu patologiju KBC-a Split, dok je mutacijski profil za 17 pacijenata (62,96 %) detektiran metodom sveobuhvatnog genskog profiliranja i to za: tumore bubrega, pluća, jajnika, dojke, melanoma, gušterače i štitnjače, što upućuje na vrijednost sveobuhvatnog genskog profiliranja u bolesnika kojima primjenom monogenskih analiza u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku KBC-a Split i drugim molekularnim laboratorijima u RH, nismo u mogućnosti odrediti promjene gena koje rezultiraju mogućnošću liječenja ciljanim lijekovima. Zahvaljujući sveobuhvatnom genskom testiranju 17 bolesnika je dobilo priliku ciljanog liječenja.

U bolesnica sa seroznim karcinomima jajnika visokog gradusa, novost u liječenju bolesnica s mutacijama BRCA gena i onih koji imaju neku drugu genetsku promjenu koja dovodi do poremećaja popravka dvolančanih lomova DNA mehanizmom homologne rekombinacije (HRD) koju dokazujemo određivanjem gubitka heterozigotnosti (LOH) na raspolaganju je liječenje PARP inhibitorom Olaparibom (35, 36, 38), koji je odobren kao lijek izbora u prvoj liniji za bolesnice s ovim tipom tumora.

U molekularnim laboratorijima u RH može se detektirati postojanje mutacije BRCA1 i/ili BRCA2 gena, ali je za dijagnosticiranje poremećaja homologne rekombinacije koja se može naći u dodatnih 25 % bolesnica s ovim tipom tumora potrebna analiza koja uključuje veliki broj gena. Primjenom metode sveobuhvatnog genskog profiliranja dodatne 3 bolesnice imaju mogućnost liječenja PARP inhibitorima, kao što smo pokazali u rezultatima naše studije.

Od 76 testiranih bolesnika, kod 62 (81,58 %) su uspješno detektirane genetske mutacije kao i MS i TMB status, dok kod 14 (18,42 %), zbog neadekvatne kvalitete testiranih uzoraka nije

bilo moguće odrediti potpuni molekularni profil i to: MS, TMB i LOH status kao i amplifikaciju nekih gena. Iako je udio adekvatnih uzoraka za analizu u našoj studiji visok, ovi rezultati upućuju na važnost uzimanja dovoljnog broja uzoraka, pravilne obrade tkiva pridržavajući se pravila dobre laboratorijske prakse i odabira najboljeg uzorka koji će biti upućen na analizu, vodeći računa o veličini uzorka i udjelu tumora. Kvalitetan i dostatan uzorak jamči uspješnost provođenja genetskog profiliranja (5, 7, 9, 32).

Rezultati sveobuhvatnog genetskog testiranja za 76 bolesnika iz KBC-a Split, pokazuju podudarnost s istraživanjima koja se bave istom tematikom. Zamijećeno je da većina detektiranih genskih profila pripada ESCAT razini 2. i 3., što pruža nove mogućnosti liječenja kroz različita klinička istraživanja i eksperimentalne terapije. Bez ovakvog genetskog testiranja bilo bi nemoguće otkriti nove biomarkere, koji su osnova za razvoj specifičnih ciljanih lijekova (11, 32). Gensko je profiliranje neophodno i za razvoj novih dijagnostičkih laboratorijskih testova kojima će se koristeći monogensko testiranje ili manje genske panele moći detektirati specifične genske promjene koje rezultiraju odobrenim terapijskim lijekom.

Rezultati sveobuhvatnog genetskog profiliranja primjenom FoundationOne testa u našoj studiji pokazali su da svaki pojedini bolesnik ima jedinstven genetski profil, što još jednom potvrđuje potrebu za personaliziranim pristupom u liječenju i preciznoj dijagnostici karcinoma.

Obzirom na cijenu, složenost metodologije i dobivene rezultate, neosporna je znanstveno istraživačka opravdanost sveobuhvatnog genetskog profiliranja (11).

Za kliničku primjenu potrebno je osigurati pristup ovakvim testiranjima za bolesnike s metastatskim tumorima koji su rijetki i o čijim se specifičnim genetskim promjenama koji bi bili osnova za specifično liječenje zna malo, kao za bolesnike čiji rezultati rutinskih monogenetskih testiranja koja se provode u kliničkim laboratorijima ne daju terapijski odabir.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju upućuju na vrijednost sveobuhvatnog genskog testiranja u bolesnika kojima primjenom monogenskih analiza u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku KBC-a Split i drugim molekularnim laboratorijima u RH, nismo u mogućnosti odrediti promjene gena koje rezultiraju mogućnošću liječenja ciljanim lijekovima.

2. Kao nužnost se nameće pravovremeno uvođenje novih dijagnostičkih testova kojima bi se biomarkeri koji mogu generirati ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora mogli detektirati u kliničkim laboratorijima, posebno za učestale maligne tumore.

3. Svaki pojedini bolesnik ima jedinstveni genetski profil, što još jednom potvrđuje potrebu za personaliziranim pristupom u liječenju i preciznoj dijagnostici karcinoma.

4. Sveobuhvatnim genskim testiranjem mogu se detektirati i bolesnici s metastatskim tumorima čiji genski profil pripada ESCAT razini 2. i 3., što pruža nove mogućnosti liječenja kroz različita klinička istraživanja i eksperimentalne terapije.

5. Rezultati ovog testiranja upućuju na važnost uzimanja dovoljnog broja uzoraka, pravilne obrade tkiva pridržavajući se pravila dobre laboratorijske prakse i odabira najboljeg uzorka koji će biti upućen na analizu, vodeći računa o veličini uzorka i udjelu tumora. O navedenim parametrima ovisi sama uspješnost testiranja.

6. Sveobuhvatno gensko profiliranje ima veliku znanstveno-istraživačku vrijednost.

7. Za kliničku primjenu potrebno je osigurati pristup ovakvim testiranjima za bolesnike s metastatskim tumorima koji su rijetki i o čijim se specifičnim genetskim promjenama koje bi bile osnova za specifično liječenje zna malo, kao i za bolesnike čiji rezultati rutinskih monogenskih testiranja koja se provode u kliničkim laboratorijima ne daju terapijski odabir.

## 7. LITERATURA

1. SABOUR, Leila; SABOUR, Maryam; GHORBAN, Saeid. Clinical applications of next-generation sequencing in cancer diagnosis. *Pathology & Oncology Research*, 2017, 23.2: 225-234.
2. Morjaria S. Driver mutations in oncogenesis. *Int J Mol Immuno Oncol* 2021;6(2):100-2.
3. Zhang X, Sjöblom T. Targeting Loss of Heterozygosity: A Novel Paradigm for Cancer Therapy. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Jan 13;14(1):57. doi: 10.3390/ph14010057. PMID: 33450833; PMCID: PMC7828287.
4. SHEN, Tony, et al. Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. *Frontiers in genetics*, 2015, 6: 215.
5. CRONIN, Maureen; ROSS, Jeffrey S. Comprehensive next-generation cancer genome sequencing in the era of targeted therapy and personalized oncology. *Biomarkers in medicine*, 2011, 5.3: 293-305.
6. PAOLILLO, Carmela; LONDIN, Eric; FORTINA, Paolo. Next generation sequencing in cancer: opportunities and challenges for precision cancer medicine. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2016, 76.sup245: S84-S91.
7. CREE, Ian A., et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *Journal of clinical pathology*, 2014, 67.11: 923-931.
8. BAILEY, Ann M., et al. Implementation of biomarker-driven cancer therapy: existing tools and remaining gaps. *Discovery medicine*, 2014, 17.92: 101.
9. CHANG, Fengqi; LI, Marilyn M. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. *Cancer genetics*, 2013, 206.12: 413-419.
10. COLOMER, Ramon, et al. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer?. *EClinicalMedicine*, 2020, 25: 100487.
11. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, Normanno N, Scarpa A, Robson M, Meric-Bernstam F, Wagle N, Stenzinger A, Bonastre J, Bayle A, Michiels S, Bièche I, Rouleau E, Jezdic S, Douillard JY, Reis-Filho JS, Dienstmann R, André F. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020

Nov;31(11):1491-1505. doi: 10.1016/j.annonc.2020.07.014. Epub 2020 Aug 24. PMID: 32853681.

12. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*. 2015 Aug 15;5(9):2892-911. PMID: 26609494; PMCID: PMC4633915.

13. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, Lee M, Linke R, Rosell R, Corral J, Migliorino MR, Pluzanski A, Sbar EI, Wang T, White JL, Wu YL. Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol*. 2018 Aug 1;36(22):2244-2250. doi: 10.1200/JCO.2018.78.7994. Epub 2018 Jun 4. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2020 Nov 1;38(31):3725. PMID: 29864379.

14. Solomon BJ, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Tang Y, Wilner KD, Blackhall F, Mok TS. Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Aug 1;36(22):2251-2258. doi: 10.1200/JCO.2017.77.4794. Epub 2018 May 16. PMID: 29768118.

15. Drilon A, Clark JW, Weiss J, Ou SI, Camidge DR, Solomon BJ, Otterson GA, Villaruz LC, Riely GJ, Heist RS, Awad MM, Shapiro GI, Satouchi M, Hida T, Hayashi H, Murphy DA, Wang SC, Li S, Usari T, Wilner KD, Paik PK. Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. *Nat Med*. 2020 Jan;26(1):47-51. doi: 10.1038/s41591-019-0716-8. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31932802.

16. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, Giannone V, D'Amelio AM Jr, Zhang P, Mookerjee B, Johnson BE. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF<sup>V600E</sup>-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct;18(10):1307-1316. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4. Epub 2017 Sep 11. PMID: 28919011.

17. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate AJ. Crizotinib in ROS1-rearranged



non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014 Nov 20;371(21):1963-71. doi: 10.1056/NEJMoa1406766. Epub 2014 Sep 27. PMID: 25264305; PMCID: PMC4264527.

18. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, Blakely CM, Seto T, Cho BC, Tosi D, Besse B, Chawla SP, Bazhenova L, Krauss JC, Chae YK, Barve M, Garrido-Laguna I, Liu SV, Conkling P, John T, Fakih M, Sigal D, Loong HH, Buchschacher GL Jr, Garrido P, Nieva J, Steuer C, Overbeck TR, Bowles DW, Fox E, Riehl T, Chow-Maneval E, Simmons B, Cui N, Johnson A, Eng S, Wilson TR, Demetri GD; trial investigators. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020 Feb;21(2):271-282. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30691-6. Epub 2019 Dec 11. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2020 Feb;21(2):e70. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2020 Jul;21(7):e341. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2020 Aug;21(8):e372. PMID: 31838007; PMCID: PMC7461630.

19. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, Debievre D, Mosser J, Lena H, Ouafik L, Besse B, Rouquette I, Westeel V, Escande F, Monnet I, Lemoine A, Veillon R, Blons H, Audigier-Valette C, Bringuier PP, Lamy R, Beau-Faller M, Pujol JL, Sabourin JC, Penault-Llorca F, Denis MG, Lantuejoul S, Morin F, Tran Q, Missy P, Langlais A, Milleron B, Cadranel J, Soria JC, Zalcman G; Biomarkers France contributors. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet.* 2016 Apr 2;387(10026):1415-1426. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00004-0. Epub 2016 Jan 15. PMID: 26777916.

20. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, Rodon J, Saura C, Shapiro GI, Juric D, Quinn DI, Moreno V, Doger B, Mayer IA, Boni V, Calvo E, Loi S, Lockhart AC, Erinjeri JP, Scaltriti M, Ulaner GA, Patel J, Tang J, Beer H, Selcuklu SD, Hanrahan AJ, Bouvier N, Melcer M, Murali R, Schram AM, Smyth LM, Jhaveri K, Li BT, Drilon A, Harding JJ, Iyer G, Taylor BS, Berger MF, Cutler RE Jr, Xu F, Butturini A, Eli LD, Mann G, Farrell C, Lalani AS, Bryce RP, Arteaga CL, Meric-Bernstam F, Baselga J, Solit DB. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature.* 2018 Feb 8;554(7691):189-194. doi: 10.1038/nature25475. Epub 2018 Jan 31. Erratum in: *Nature.* 2019 Feb;566(7745):E11-E12. PMID: 29420467; PMCID: PMC5808581.

21. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2017 Oct 26;377(17):1700. doi: 10.1056/NEJMc170012. Epub 2017 Aug 9. Erratum for: *N Engl J Med.* 2017 Aug 10;377(6):523-533. PMID: 28792849.

22. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu YS, Inoue K, Takahashi M, Pápai Z, Longin AS, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D; SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for *PIK3CA*-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 May 16;380(20):1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904. PMID: 31091374.
23. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul 1;25(13):3753-3758. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4070. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30787022.
24. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, Beier F, Stroh C, Rougier P, van Krieken JH, Ciardiello F. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 1;33(7):692-700. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4812. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25605843.
25. Prasad V. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Feb 27;382(9):876. doi: 10.1056/NEJMc1915676. PMID: 32101676.
26. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, Goldberg MV, Cao ZA, Ledezine JM, Maglinte GA, Kopetz S, André T. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):1182-1191. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30422-9. Epub 2017 Jul 19. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):e510. PMID: 28734759; PMCID: PMC6207072.
27. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, Chi KN, Sartor O, Agarwal N, Olmos D, Thiery-Vuillemin A, Twardowski P, Mehra N, Goessl C, Kang J, Burgents J, Wu W, Kohlmann A, Adelman CA, Hussain M. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2020 May 28;382(22):2091-2102. doi: 10.1056/NEJMoa1911440. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32343890.
28. Abida W, Cyrta J, Heller G, Prandi D, Armenia J, Coleman I, Cieslik M, Benelli M, Robinson D, Van Allen EM, Sboner A, Fedrizzi T, Mosquera JM, Robinson BD, De Sarkar N, Kunju LP, Tomlins S, Wu YM, Nava Rodrigues D, Loda M, Gopalan A, Reuter VE, Pritchard

CC, Mateo J, Bianchini D, Miranda S, Carreira S, Rescigno P, Filipenko J, Vinson J, Montgomery RB, Beltran H, Heath EI, Scher HI, Kantoff PW, Taplin ME, Schultz N, deBono JS, Demichelis F, Nelson PS, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Sawyers CL. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jun 4;116(23):11428-11436. doi: 10.1073/pnas.1902651116. Epub 2019 May 6. PMID: 31061129; PMCID: PMC6561293.

29. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, Xu JM, Lee KW, Jiao SC, Chong JL, López-Sánchez RI, Price T, Gladkov O, Stoss O, Hill J, Ng V, Lehle M, Thomas M, Kiermaier A, Rüschoff J. HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer*. 2015 Jul;18(3):476-84. doi: 10.1007/s10120-014-0402-y. Epub 2014 Jul 20. PMID: 25038874; PMCID: PMC4511072.

30. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, Park JO, Hochhauser D, Arnold D, Oh DY, Reinacher-Schick A, Tortora G, Algül H, O'Reilly EM, McGuinness D, Cui KY, Schlienger K, Locker GY, Kindler HL. Maintenance Olaparib for Germline *BRCA*-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Jul 25;381(4):317-327. doi: 10.1056/NEJMoa1903387. Epub 2019 Jun 2. PMID: 31157963; PMCID: PMC6810605.

31. Eso Y, Shimizu T, Takeda H, Takai A, Marusawa H. Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *J Gastroenterol*. 2020 Jan;55(1):15-26. doi: 10.1007/s00535-019-01620-7. Epub 2019 Sep 7. PMID: 31494725; PMCID: PMC6942585.

32. TAKEDA, Masayuki, et al. Clinical Application of the FoundationOne CDx Assay to Therapeutic Decision-Making for Patients with Advanced Solid Tumors. *The oncologist*, 2021, 26.4: e588-e596.

33. <https://www.foundationmedicine.de/en/our-services/cdx.html>

34. Meléndez B, Van Campenhout C, Rorive S, Rummelink M, Salmon I, D'Haene N. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Dec;7(6):661-667. doi: 10.21037/tlcr.2018.08.02. PMID: 30505710; PMCID: PMC6249625.

35. da Cunha Colombo Bonadio RR, Fogace RN, Miranda VC, Diz MDPE. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management.

Clinics (Sao Paulo). 2018 Aug 20;73(suppl 1):e450s. doi: 10.6061/clinics/2018/e450s. PMID: 30133561; PMCID: PMC6096977.

36. CHAN, Chung Ying; TAN, Kel Vin; CORNELISSEN, Bart. PARP inhibitors in cancer diagnosis and therapy. *Clinical Cancer Research*, 2021, 27.6: 1585-1594.

37. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Comprehensive analysis of cancers of unknown primary for the biomarkers of response to immune checkpoint blockade therapy. *Eur J Cancer*. 2018 May;94:179-186. doi: 10.1016/j.ejca.2018.02.021. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29571084

38. ROSE, Maddison, et al. PARP inhibitors: clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8.

## 8. SAŽETAK

### ULOGA SVEOBUHVAATNOG GENSKOG PROFILIRANJA U ONKOLOŠKIH BOLESNIKA U KBC-u SPLIT

Razvoj novih molekularnih tehnika, između ostalog i sveobuhvatnog genskog profiliranja primjenom sekvencionera nove generacije unaprijedio je dijagnostiku i liječenje onkoloških bolesnika. ESMO radna grupa za kliničku tumorsku genomiku identificirala je genske promjene značajne kod 8 najčešćih malignih tumora a s najvišom stopom smrtnosti u svijetu, svrstavajući nađene promjene u četiri ESCAT kategorije kojima se definira povezanost nađenih genetskih promjena i primjene lijeka.

U ovom su istraživanju obrađeni rezultati testiranja promjenom FoundationOne testa u 76 pacijenata iz KBC-a Split s malignim tumorima različitih sijela, čiji su uzorci tkiva fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafin i tijekom 2020. godine poslani na analizu u *Foundation Medicine*, kako bi se procijenio daljnji način liječenja bolesnika na temelju genetskih promjena nađenih u tumorima.

Temeljem detektiranog genetskog statusa 27 pacijenata ( 35,53 %), su kandidati za odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, kod 25 pacijenata (32,89 %) detektiran je genetski status za kojeg je odobren lijek u drugom tipu tumora, dok su 24 pacijenta (31,58 %), na osnovu genetskog profila, bez odobrenog lijeka.

Kod 4 bolesnika (5,26 %) detektirane su promjene koje su vezane za slabiji odgovor i rezistenciju na odobrenu ciljanu terapiju.

Četiri (5,26 %) pacijenta imaju tumore koji pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost s visokim mutacijskim opterećenjem tumora, pet (6,58 %) ih ima tumore kojima je detektirana mikrosatelitna stabilnost s visokim mutacijskim opterećenjem tumora, dok kod jednog (1,32 %) pacijenta, radi neadekvatnog uzorka nije bila moguća detekcija mikrosatelitnog statusa.

Od 76 testiranih bolesnika, kod 62 (81,58 %) su uspješno detektirane genetske mutacije kao i MS i TMB status, dok kod 14 (18,42 %), zbog neadekvatne kvalitete testiranih uzoraka nije bilo moguće odrediti potpuni molekularni profil i to MS, TMB i LOH status kao i amplifikaciju nekih gena, što upućuje na važnost pravilnog uzimanja uzoraka, kao i obrade i odabira najboljeg uzorka za analizu.

Od 27 pacijenata koji imaju odobrenu ciljanu terapiju u bolesnikovom tipu tumora, 10 bolesnika (37,04 %) ima genetske promjene koje se rutinski testiraju u Laboratoriju za molekularnu

patologiju KBC-a Split, dok je mutacijski profil za 17 pacijenata (62,96 %) detektiran metodom sveobuhvatnog genskog profiliranja.

Sveobuhvatno gensko profiliranje ima veliku znanstveno-istraživačku vrijednost, ali je za rutinsku kliničku primjenu potrebno osigurati pristup ovakvim testiranjima za bolesnike s metastatskim ili lokalno uznapredovalim tumorima, tumorima koji su rijetki i o čijim se specifičnim genetskim promjenama koje bi bile osnova za specifično liječenje zna malo, kao za bolesnike čiji rezultati rutinskih monogenskih testiranja, koja se provode u kliničkim laboratorijima ne daju terapijski odabir.

**Ključne riječi:** sveobuhvatno gensko testiranje, onkološki bolesnici, KBC Split, solidni tumori, FoundationOne CDx test, ciljana terapija.

## 9. SUMMARY

### ROLE OF COMPREHENSIVE GENOMIC PROFILING IN ONCOLOGIC PATIENTS IN CLINICAL HOSPITAL SPLIT

The development of new molecular techniques, among other comprehensive genomic profiling using new generation sequencing, has improved the diagnosis and treatment of oncological patients. The ESMO working group for clinical tumor genomes identified genetic changes significant in the 8 most common malignancies with the highest mortality rate in the world, classifying molecular changes into four ESCAT categories which defines the association of genetic changes and drug administration.

In this study, I analysed resultates of FoundationOne Medicine testing in 76 patients from University Hospital Center Split with malignant tumors of different sites, and whose tissue samples were fixed in formalin and paraffin-embedded and during 2020 sent for analysis to FoundationOne Medicine, to evaluate further treatment of patients based on genetic changes found in tumors.

Based on the detection of the genetic status of 27 patients (35,53 %) are candidates for approved targeted therapy for the patient's tumor type, in 25 patients (32,89 %) genetic status was detected for which the drug was approved in another tumor type, while 24 patients (31,58 %), based on genetic profile, had no approved drug.

Changes related to poor response and resistance to approved targeted therapy were found in 4 patients (5,26 %).

Four (5,26 %) patients have tumors that show microsatellite instability with high tumor mutation load, five (6,58 %) have tumors that have detected microsatellite stability with high tumor mutation load, while one (1,32 %) patient, due to an inadequate sample, microsatellite status could not be detected.

Out of 76 tested patients, in 62 (81,58 %) genetic mutations as well as MS and TMB status were successfully detected, while in 14 (18,42 %), due to inadequate quality of tested samples, it was not possible to determine the complete molecular profile, like MS , TMB and LOH status as well as amplification of some genes, which indicates the importance of proper sampling, as well as processing and selection of the best sample for analysis.

Of the 27 patients who have approved targeted therapy in the patient's tumor type, 10 patients (37,04 %) have genetic changes that are routinely tested in the Laboratory for Molecular Pathology of KBC Split, while the mutation profile for 17 patients (62,96 %) detected by the method of comprehensive gene profiling.

Comprehensive genomic profiling has important scientific and research value, but for routine clinical use it is necessary to provide access to such testing for patients with metastatic or locally advanced tumors, rare tumors, tumors whose specific genetic changes, that would be the basis for specific treatment, are little known, and for patients whose results of routine monogenic testing, conducted in clinical laboratories, do not provide a therapeutic choice.

**Key words:** comprehensive genomic profiling, oncological patients, Clinical hospital Split, solid tumors, FoundationOne CDx test, targeted therapy.



## 10. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

Ime i prezime: Arijana Vuko

Datum rođenja: 29. veljače 1976.

### **Školovanje:**

1990.-1994. Srednja zdravstvena škola Split, laboratorijski tehničar

2011.-2014. Preddiplomski sveučilišni studij, Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Sveučilišta u Splitu, univ.bacc.med.lab.diag.

2019.-2021. Diplomski sveučilišni studij, Forenzična kemija i molekularna biologija, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilišta u Splitu.

### **Nagrade:**

**2015.** Dobitnica Rektorove nagrade za izvrsnost.

### **Radno iskustvo:**

1998.-1999. Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, pripravnički staž.

Od 2001. Zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

Od 2014. Glavni inženjer Odjela za patologiju KBC-a Split.

Od 2018. Glavni inženjer Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

### **Stručna edukacija i kongresi:**

**2010.** Certifikat za rad na UltraBenchMark aparatu za imunohistokemijske i molekularne metode.

**2011.** Certifikat za položen "upgrade training" za rad na UltraBenchMark aparatu za imunohistokemijske i molekularne metode, Burgess Hill/United Kingdom, 13.-16. 11. 2011.

**2011.** Certifikat kvalitete za optimalne rezultate HER-2 imunohistokemijske i in situ evaluacije-NordIQC.

**2011.** Moderator interaktivne diskusije o predanalitičkim i analitičkim varijacijama na 1. Adriatic region HER-2 testing in Breast Cancer Meeting, Split, 20.-21. 5. 2011.

**2011.** 7. ISABS Conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo clinic lectures in translational medicine, Bol, 20.-24. 6. 2011.

**2013.** 8. ISABS Conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo clinic lectures in translational medicine, Split, 24.-28. 6. 2013. (poklon Sveučilišnog odjela zdravstvenih studija odličnim studentima).

**2014.** 2. Kongres HKZR-Strukovnog razreda za medicinsko laboratorijsku djelatnost, Zagreb, 29. 5.-1. 6. 2014.

**2015.** Predavač i moderator diskusije na temu *Smjernice u standardizaciji laboratorijskih procesa*, Odjel za patologiju, Split.

**2020.** Stručno usavršavanje na tečaju III. kategorije na temu *Komunikacijske i pedagoške vještine za kliničke mentore* u organizaciji Sveučilišnog odjela zdravstvenih studija.

**2020.** Izabrana za predsjednicu 4. područnog vijeća Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovni razred za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku.

## 11. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

### Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, ARIJANA VUKO, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom

### **ULOGA SVEOBUHVAATNOG GENSKOG PROFILIRANJA U ONKOLOŠKIH BOLESNIKA U KBC-u SPLIT**

rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, \_\_\_\_\_

Potpis studenta/studentice: \_\_\_\_\_