

Detekcija virusa u stanicama karcinoma pluća

Šefčić, Hajdi

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:460470>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Hajdi Šefčić
Detekcija virusa u stanicama karcinoma pluća
Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Petri Korać na pomoći prilikom odabira teme, te na svim stručnim savjetima, trudu i strpljenju koje mi je ukazala tijekom izrade eksperimentalnog i pisanog dijela rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

DETEKCIJA VIRUSA U STANICAMA KARCINOMA PLUĆA

Hajdi Šefčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Karcinom pluća je među najučestalijim malignim bolestima u svijetu s oko 1,7 milijuna novih smrtnih slučajeva u 2018. godini. Osim dima cigarete, kao najznačajnijeg faktora, karcinom pluća se razvija jednim dijelom i kod nepušača te se kao uzrok istražuju i infektivni agensi. Virusi se već dugo vremena opisuju kao etiološki faktor u tumorogenezi, a onkološki potencijal citomegalovirusa (CMV, od eng. – *cytomegalovirus*), ljudskog papiloma virusa (HPV, od eng. – *human papillomavirus*) i virusa Epstein-Barr (EBV, od eng. – *Epstein-Barr virus*) je već istraživao u različitim karcinomima. Ulazak virusa u stanicu je određen interakcijom između virusa i receptora na staničnoj površini domaćina, a kao jedan od značajnih receptora opisan je receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR, eng.– *epidermal growth factor receptor*). Oko 12% adenokarcinoma pluća ima jednu od mutacija EGFR-a. S obzirom na povezanost mutacija EGFR-a i virusne etiologije malignih tumora epitelnih stanica cilj ovog istraživanja je bio utvrditi učestalost infekcije CMV-om, HPV-om i EBV-om kod pacijenata s karcinomom pluća koji imaju mutaciju EGFR-a. Metodom lančane reakcije polimerazom detektirana je DNA virusa CMV-a, EBV-a i HPV-a u stanicama adenokarcinoma s mutacijom EGFR-a i u stanicama adenokarcinoma kod kojih nije dokazana mutacija EGFR-a. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) u prisutnosti DNA sva tri virusa u stanicama adenokarcinoma s mutacijom EGFR-a u odnosu na stanice adenokarcinoma bez mutacije EGFR-a.

(37 stranica, 9 slika, 19 tablica, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mutacije EGFR-a, citomegalovirus, virus Epstein-Barr, ljudski papiloma virus

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

VIRUS DETECTION IN LUNG CARCINOMA CELLS

Hajdi Šefčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lung cancer is one of the most common malignant disease in the world with estimated 1,7 million new death cases in 2018. Even though cigarette smoking is considered by far the single most important risk factor in lung carcinogenesis, smaller percentage of non-smokers also develop lung cancer and one of the other risk factors considered are infectious agents. Oncogenic viruses have been proposed as etiological factor in carcinogenesis with the focus on oncological potential of cytomegalovirus (CMV), human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in different carcinomas. Virus entry in the host cell usually starts with virus interaction with host cell surface receptors and epidermal growth factor receptor (EGFR) has been described as one of the most important. About 12% of lung adenocarcinomas carries one of the known EGFR mutations. Considering observed relationship between EGFR mutations and virus etiology of epithelial cell malignant tumors, the aim of this research was to establish frequency of infections with CMV, HPV and EBV in lung cancer patients who have one of EGFR mutations. Polymerase chain reaction was used to detect CMV, HPV and EBV DNA in adenocarcinoma cells with EGFR mutation, as well as in adenocarcinoma cells without EGFR mutation. Results have shown statistically significant difference ($p < 0.001$) in presence of viruses in adenocarcinoma cells with EGFR mutation in comparison with adenocarcinoma cells without EGFR mutation.

(37 pages, 9 figures, 19 tables, 36 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: EGFR mutations, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human papillomavirus

Supervisor: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Reviewers:

Thesis accepted:

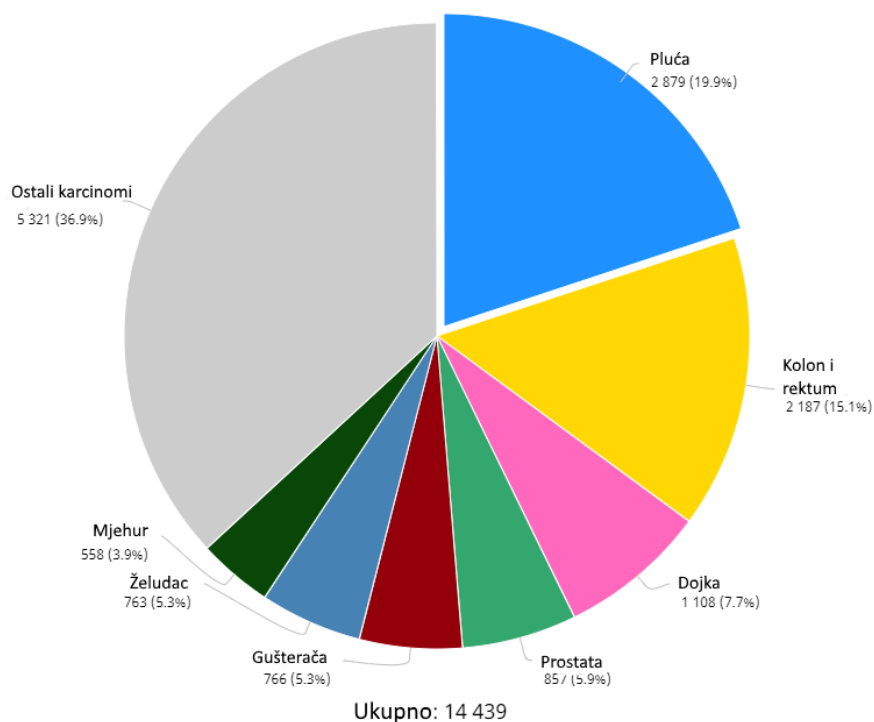
Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Karcinom pluća.....	1
1.2. Mutacije epidermnog faktora rasta u karcinomu pluća	3
1.3. Virusi u tumorigenezi	6
2. Hipoteza i ciljevi istraživanja.....	9
3. Materijali i metode	10
3.1. Ispitanici.....	10
3.2 Metode	12
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom.....	12
3.2.2 Statistička analiza	14
4. Rezultati.....	15
4.1. Optimizacija testova za detekciju virusa	15
4.2. Detekcija HPV-a u stanicama karcinoma pluća.....	15
4.3. Detekcija CMV-a u stanicama karcinoma pluća	20
4.4. Detekcija EBV-a u stanicama karcinoma pluća	24
4.5. Učestalost infekcije virusima kod skupine adenokarcinoma s mutacijom EGFR-a i kod skupine kod koje nije dokazana mutacija EGFR-a.....	26
5. Rasprava	27
6. Zaključci	30
7. Literatura	31
8. Životopis	37

1. Uvod

1.1. Karcinom pluća

Karcinom pluća je među najučestalijim malignim bolestima u svijetu s više od 2 milijuna novih prijavljenih slučajeva u 2018. godini te oko 1,7 milijuna novih smrtnih slučajeva (WHO, 2018). U Hrvatskoj od karcinoma umire svaki četvrti stanovnik, što ga čini drugim najznačajnijim uzrokom smrti, a od ukupnog broja karcinoma 18 % su slučajevi karcinoma traheja, bronha i pluća kod muškaraca te 8 % kod žena. Po broju smrtnih slučajeva karcinom pluća je prvi i on je uzrok 19 % smrti od karcinoma (Slika 1). I stope učestalosti i stope smrtnosti od karcinoma više su u muškaraca, nego u žena, a prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo posljednjih su godina te stope u porastu (HZJZ, 2018).

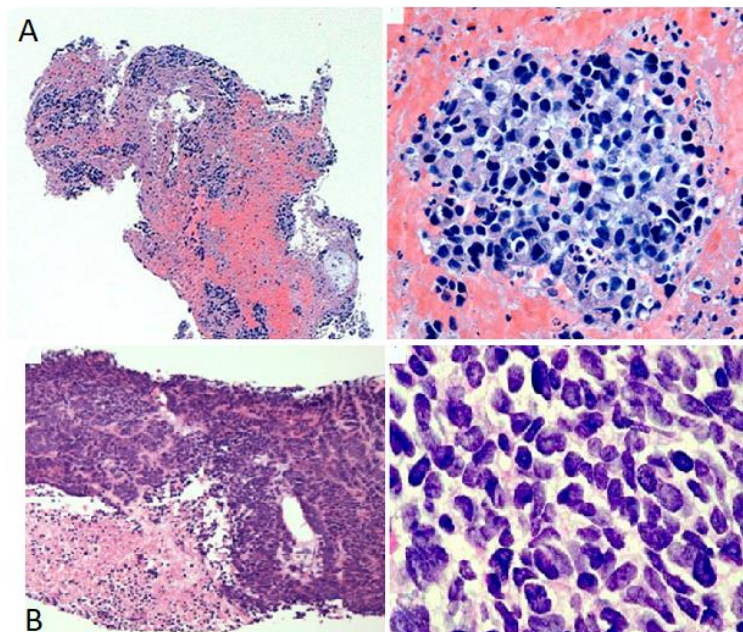


Slika 1. Procijenjen broj smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomom za Hrvatsku u 2018. godini kod oba spola i svih životnih dobi (preuzeto i prilagođeno iz: WHO 2018)

Iako se većina karcinoma pluća povezuje s pušenjem kao glavnim uzrokom, procjenjuje se da oko 15 % slučajeva karcinoma pluća kod muškaraca i oko 53% slučajeva kod žena nije povezano s pušenjem (Nakamura i Saji 2014). Karcinom pluća se razvije kod jednog od 9 pušača. Rizik je veći 10 do čak 30 puta kod dugoročnih pušača nego kod nepušača. Rizik je

također proporcionalan s količinom popušanih cigareta jer se povećava izloženost rizičnim faktorima u duhanskom dimu. Procijenjeno je da bi se moglo spriječiti do 20% smrti povezanih s karcinomima kada bi se eliminiralo pušenje cigareta. Važna je i individualna podložnost štetnim tvarima iz dima, jer, iako se više od 80% karcinoma pluća pojavljuje kod pušača, manje od 20 % pušača razvije karcinom pluća (Alberg i sur. 2016). Osim dima cigarete drugi rizični faktori uključuju pasivno pušenje, izloženost azbestu, izloženost zračenju i genetsku predispoziciju. U posljednje vrijeme se sve više istražuje i virusna etiologija kod karcinoma pluća te se povezuje s najpoznatijim onkogenim virusima za koje se zna da sudjeluju u tumorigenezi drugih tumora (Dela Cruz i sur. 2011).

Karcinom pluća zbog razlika u kliničkoj prezentaciji, prognozi i terapijskom pristupu možemo podijeliti u dvije skupine: karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC, od eng. – *non-small cell lung cancer*) i karcinom pluća malih stanica (SCLC, od eng. – *small cell lung cancer*) (Slika 2). Oko 85% slučajeva je NSCLC koji se dijeli u tri podskupine: adenokarcinom (40 – 45 %), karcinom pločastih stanica (30 %) i karcinom velikih stanica (10 – 15 %). SCLC čini oko 15 % svih karcinoma pluća (Molina i sur. 2008).



Slika 2. Stanice karcinoma iz biopsije pluća. a) Karcinom pluća nemalih stanica. b) Karcinom pluća malih stanica (preuzeto i prilagođeno prema: Davidson i sur. 2013)

Dva tipa karcinoma, SCLC i NSCLC, rastu i šire se drugačije. Stadij karcinoma pluća označava koliko se karcinom proširio u tijelu. Koristeći klasifikaciju TNM (TNM, od eng. – *Classification of Malignant Tumours*) može se odrediti koji je stadij karcinoma pluća što može pomoći u procjeni dijagnoze te u pristupu terapiji (Rami-Porta i sur. 2009).

U posljednjih nekoliko desetljeća incidencija karcinoma pluća raste u većini zemalja svijeta te je adenokarcinom u posljednjih 30 godina zamijenio karcinom pločastih stanica kao najučestaliji tip karcinoma pluća. Danas je adenokarcinom najčešći tip karcinoma pluća u SAD-u, Europi i Istočnoj Aziji, uključujući i Japan (Alberg i sur. 2016). Većinom nastaje u perifernim dijelovima pluća, a manji dio nastaje unutar dušnika. Mikroskopski, tumor se sastoji od žlijezda obloženih nepravilnim cilindričnim epitelnim stanicama. Rizični faktor za razvoj adenokarcinoma pluća je pušenje kao i u ostalim tipovima karcinoma pluća, iako je ovaj tip najčešći karcinom pluća kod nepušača. Adenokarcinom pluća često metastazira u pleuru, limfne čvorove, mozak, kosti i nadbubrežne žlijezde (Nakamura i Saji 2014).

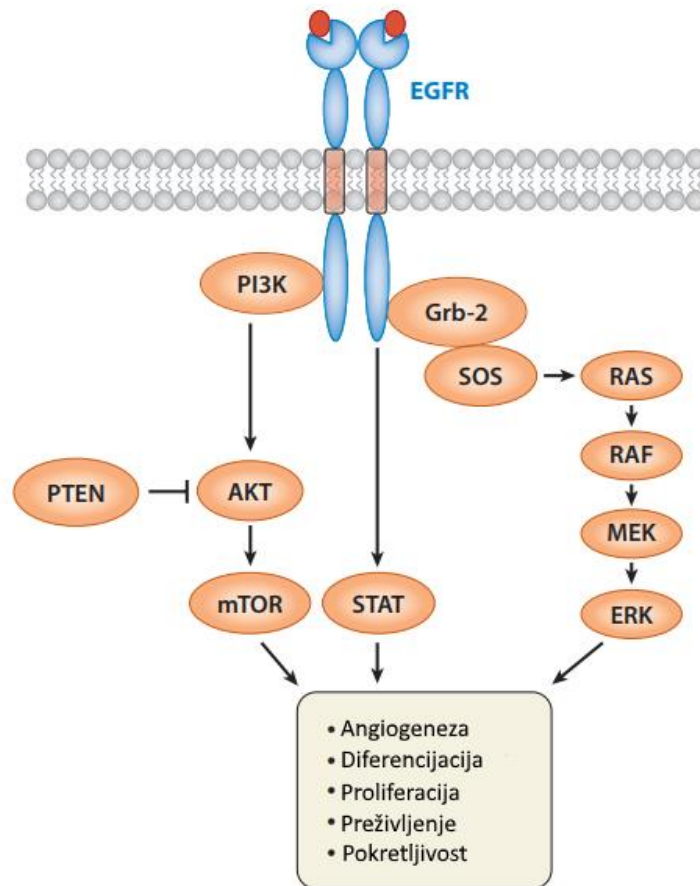
1.2. Mutacije epidermnog faktora rasta u karcinomu pluća

Karcinom pluća nastaje kao rezultat niza mutacija koje mogu biti ili stečene tijekom života zbog izlaganja rizičnim agensima ili naslijeđene. Među brojnim mutacijama u kliničkim implikacijama se ističu mutacije receptora epidermnog faktora rasta (EGFR, od eng. – *epidermal growth factor receptor*) koje se nalaze u oko 15 – 20 % bijelaca (Rosell i sur. 2009) te u oko 40 % Azijata s dijagnosticiranim NSCLC-om (Mitsudomi i sur. 2005). Prema rezultatima rada Brčića i suradnika iz 2014. godine udio mutacija gena *EGFR* kod novo dijagnosticiranih NSCLC slučajeva za Republiku Hrvatsku iznosi 15,7 %. Učestala je i translokacija gena kinaze anaplastičnog limfoma (*ALK*, od eng. – *anaplastic lymphoma kinase*) gdje dolazi do stvaranja kimeričnog gena *EML4* (od eng. – *echinoderm microtubule-associated protein-like*) i gena *ALK*, a prisutna je u oko 5 % bolesnika s NSCLC-om (Pillai i Ramalingam 2011). Mutacija gena *KRAS* nalazi se u oko 15 – 25 % bolesnika s NSCLC-om te se u 97 % slučajeva ta mutacija nalazi u eksonu 2 ili eksonu 3 (Karachaliou i sur. 2013)

Protein EGFR je transmembranski protein koji svojom citoplazmatskom aktivnošću sudjeluje u signalnom putu prijenosa signala preko faktora rasta iz izvanstaničnog prostora u stanicu. Ako

se uzme u obzir da više od 60% NSCLC eksprimira EGFR, on je logična meta za terapijske protokole kod navedenih tumora. Inhibitori koji ciljaju tirozinsko kinaznu domenu EGFR-a su razvijeni i nalaze se u kliničkoj uporabi (Roengvoraphoj i sur. 2013). Ovakvi lijekovi su posebno uspješni kod tumora koji imaju jednu od mutacija upravo u tirozinsko kinaznoj domeni EGFR-a. Kod pacijenata s uznapredovalim stadijem karcinoma preporuča se inicijalna terapija s tirozinsko kinaznim inhibitorima (TKI, od eng. – *tyrosine kinase inhibitor*) umjesto kemoterapije. Zbog toga je testiranje na mutacije obavezno kako bi se identificirali takvi pacijenti, jer dijagnoza temeljena samo na kliničko – patološkim karakteristikama nije dovoljna (da Cunha Santos i sur. 2011).

Signalni put EGFR-a ima važnu ulogu u razvoju tumora kroz modifikaciju staničnog ciklusa, inhibiciju apoptoze, indukciju angiogeneze i poticanje invazije i metastaziranja tumorskih stanica. Kao odgovor na vezanje liganda dolazi do homodimerizacije EGFR-a ili do heterodimerizacije s drugim receptorima iste porodice, najčešće s receptorom HER2 (od eng. – *human epidermal growth factor receptor 2*), što potom aktivira tirozinsko kinaznu domenu receptora. Ovaj proces rezultira autofosforilacijom citoplazmatske domene receptora i omogućava interakciju s adaptorskim molekulama, što dalje rezultira aktivacijom nizvodne kaskade signalnog puta. Unutarstanična signalizacija se uglavnom odvija preko signalnih putova RAS – MEK – MAPK i PI3K – AKT te preko aktivacije transkripcijskog puta STAT (Carcereny i sur. 2015). Nizvodna regulacija signalizacije EGFR-a u konačnici dovodi do povećane proliferacije, angiogeneze, metastaziranja i smanjene apoptoze (Slika 3).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz signalnih putova aktiviranih receptorom EGFR koji reguliraju stanične funkcije važne u tumorigenezi (preuzeto i prilagođeno prema: da Cunha Santos i sur. 2011).

Najčešće mutacije *EGFR*-a nalaze se u eksonima 18 – 21, koji kodiraju dio kinazne domene *EGFR*-a. Mutacije su obično heterozigotne, a mutantni alel može biti i amplificiran. Pronađeno je više od 188 mutacija *EGFR*-a, ali otprilike 80 – 90 % čine samo dvije: delecija 5 aminokiselina eksona 19 (del19) i točkasta mutacija eksona 21 koja rezultira supstitucijom arginina leucinom na poziciji 858 (L858R). Ove mutacije povećavaju kinaznu aktivnost *EGFR*-a što dovodi do hiperaktivacije nizvodnih signalnih putova potrebnih za preživljavanje stanice (Carcereny i sur. 2015; da Cunha Santos i sur. 2011). Ovisno o promjeni u slijedu nukleotida sve mutacije se mogu svrstati u tri kategorije. Prva kategorija obuhvaća kratke delecije 4 do 6 aminokiselina unutar okvira čitanja na eksonu 19. Druga kategorija obuhvaća supstituciju jednog nukleotida i može se dogoditi na eksonima 18 – 21. Treća kategorija su duplikacije i/ili insercije uglavnom na eksonu 20. Osim ovih mutacija javljaju se još i sekundarne mutacije, koje dovode do

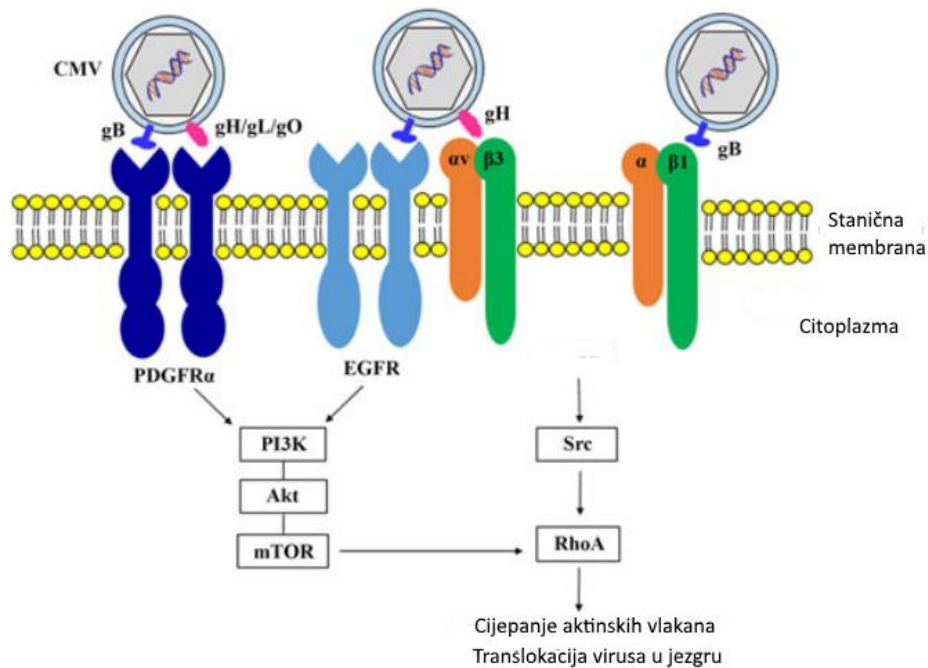
rezistencije i nastaju kao odgovor na ciljanu EGFR-terapiju, a najčešća od ovih mutacija je zamjena metionina treoninom na poziciji 790 (T790M) (Lovly i sur. 2016).

Bez obzira na rasu, mutacije *EGFR*-a se najčešće pronalaze kod ženskih nepušača s dijagnosticiranim adenokarcinomom. Međutim, mogu biti pronađene i u drugim tipovima NSCLC-a, kod sadašnjih i bivših pušača kao i u drugim histološkim tipovima karcinoma pluća. U većini slučajeva mutacije *EGFR*-a se ne preklapaju s drugim onkogenim mutacijama pronađenim u NSCLC-u (npr. mutacije gena *KRAS*, translokacije gena *ALK*) (Lovly i sur. 2016).

1.3. Virusi u tumorigenezi

Dosad je utvrđena virusna etiologija u nekoliko vrsta malignih tumora kod ljudi. Neki od istraženih virusa su danas prepoznati kao onkogeni virusi koji su povezani s određenom vrstom tumora. To su ljudski virus leukemije T-stanica (HTLV-1), virus Epstein-Barr (EBV), ljudski virus herpesa (HHV-8) i ljudski virus papiloma (HPV). Istražuju se i drugi virusi kao potencijalni kancerogeni faktori, ali još uvijek nije potvrđena njihova konačna uloga kao uzročnika karcinoma kod ljudi. To se posebno odnosi na neke vrste poliomavirusa, te ostale vrste iz porodice herpesvirusa poput ljudskog citomegalovirusa (CMV) (Brouchet i sur. 2005).

Oko 80% odraslih osoba se tijekom života zarazi citomegalovirusom. Ovaj virus pripada porodici *Herpesviridae*. Kao i drugi herpesvirusi i CMV ostaje doživotno kod zaražene osobe te postoji mogućnost latentne infekcije nakon zaraze. CMV inficira širok raspon stanica u tijelu. Do infekcije najvjerojatnije dolazi prvo u epitelnim stanicama odakle virus inficira monocite za koje se smatra da imaju najvažniju ulogu u daljnjem prijenosu CMV-a kroz ostatak tijela. Virus također može inficirati endotelne stanice, fibroblaste, hepatocite, žlijezde slinovnice, neutrofile, makrofage, limfocite a katkad čak i glatke mišićice i neurone. Pretpostavlja se da, zbog širokog raspona stanica koje inficira, CMV ulazi preko receptora koji se može pronaći kod skoro svih stanica ili da koristi različite receptore za ulazak u stanicu. Mnoge komponente stanične površine su identificirane kao receptori za virus kao što je receptor trombocitnog faktora rasta (PDGFR, od eng. – *platelet-derived growth factor receptor*) te integrini. EGFR je također identificiran kao receptor za CMV te je esencijalan za vezanje virusa na stanicu te regulaciju daljnje signalizacije potrebne za ulazak virusa (Slika 4) (Falcão i sur. 2017).



Slika 4. Signalni put EGFR-a potreban za ulazak CMV-a u stanicu. Glikoproteini B i H (gB, gH) se vežu na EGFR i integrin $\alpha\beta3$ te pokreću kaskadu PI3K i Src što dovodi do destabilizacije aktinskih vlakna i virusne translokacije u stanicu. Drugi identificirani receptori su PDGFR i integrin $\alpha\beta1$ (preuzeto i prilagođeno prema: Falcão i sur. 2017)

U posljednje vrijeme se istražuje povezanost CMV-a s malignim gliomima, te s karcinomom prostate i kolona. Infekcija CMV-om interferira s unutarstaničnim i izvanstaničnim putovima apoptoze djelujući na tumorske supresore p53 i p73 te preko njih aktivira signalni put za preživljenje stanice. Protein MIE iz CMV-a (od eng. *immediate early protein*) inhibira p53 *in vitro*, što potencijalno ima ulogu u formiranju tumora (Mui i sur. 2017).

Jedan od najbolje istraživanih i najvažniji virus povezan s ljudskim karcinomima je ljudski virus papiloma (HPV, eng. – *human papillomavirus*). Pripada porodici *Papillomaviridae* te HPV naziv obuhvaća grupu vrlo rasprostranjenih virusa koji inficiraju kožu i sluznicu. Identificirano je više od 200 vrsta koje su podijeljene u dvije skupine: grupe koje čine tipovi visokog rizika i tipovi niskog rizika. Utvrđeno je da su onkogeni tipovi HPV-a, odnosno tipovi visokog rizika, najvažniji etiološki faktor kod karcinoma vrata maternice. Onkogeni potencijal HPV-a dolazi od mogućnosti virusa da interferira sa staničnim ciklusom i tumorsko supresivnim funkcijama stanice kroz onkoproteine E6 i E7 (E, eng. - *early*), koji inaktiviraju proteine p53 i Rb (eng. –

retinoblastoma) (Mui i sur. 2017). Tijekom zadnja dva desetljeća istražuje se uloga HPV-a u karcinomima pločastih stanica na različitim sluznicama, uključujući oralnu sluznicu, dušnik, sinuse, grkljan te bronhe i pluća (Giuliani i sur. 2007). Poveznicu HPV-a s lezijama u pločastim stanicama bronha prvi je predložio Syrjänen 1980. koji je opisao epitelne promjene u karcinomu bronha kao vrlo slične onima već utvrđenima kod kondilomatoznih lezija ženskog genitalnog trakta uzrokovanih HPV-om. Infekcija HPV-a u karcinomu pločastih stanica pluća je dokazana, međutim nije konzistentna i postoje razlike među državama, rasama, pušačkom statusu te spolu. Visoka incidencija HPV-a u karcinomu pluća je uočena u azijskim državama, posebice kod nepušača, dok europske studije daju različite rezultate. Uočeno je su tipovi HPV-a visokog rizika, HPV 16 i HPV 18, češće povezani s karcinomom pluća nego ostali tipovi. Pokazano je da onkogeni *E6* i *E7*, iz ova dva tipa HPV-a, imortaliziraju ljudske epitelne stanice traheja. Istraživanja koja se bave HPV-om u karcinomu pluća daju različite rezultate, što možda ovisi i o genetskom utjecaju, metodologiji detekcije HPV-a te o utjecaju okoliša (Dela Cruz i sur. 2011), međutim novije studije pokazuju da postoji povezanost mutacija *EGFR*-a kod adenokarcinoma pluća s infekcijom ljudskim virusom papiloma, i to podtipovima HPV16 i HPV18. Oko 30 % pacijenata čije tumorske stanice imaju neku mutaciju *EGFR*-a inficirano je i HPV-om tipa visokog rizika (Li i sur. 2016).

Virus Epstein-Barr, prijašnjeg naziva ljudski herpesvirus 4, jedan je od osam za čovjeka patogenih herpesvirusa iz porodice *Herpesviridae*. Virus se razmnožava u B-limfocitima, stanicama višeslojnoga pločastog epitela ždrijela, u epitelnim stanicama cerviksa, a može se naći i u spermi. EBV se povezuje s Burkittovim limfomom, Hodgkinovim limfomom i nazofarengialnim karcinomom (NPC, od eng. *nasopharyngeal carcinoma*) i rijetkim oblikom karcinoma pluća – plućnim limfoepiteloidnim karcinomom (LELC, od eng. *lymphoepithelioma-like carcinoma*) – koji se javlja uglavnom kod azijskih pacijenata (Dela Cruz i sur. 2011; Nakanishi i sur. 2017; Xie i sur. 2018). Kod nazofaringealnog karcinoma je gotovo 100 % slučajeva inficirano EBV-om, a veliki metastatski potencijal tog karcinoma povezan je s povećanom aktivnosti *EGFR*-a. Predložen je model djelovanja virusa preko latentnog membranskog proteina 2A kodiranog EBV-om (LMP2A) koji povećava razinu unutarstaničnih kalcijevih iona, aktivira protein kalpain zbog čega dolazi do povećane aktivnosti cijepanja integrina $\beta 4$ pa stanice NPC-a imaju veliki migracijski i metastatski potencijal (Liang i sur. 2017).

EBV uzrokuje limfoproliferativne bolesti u imunokompetentnih i imunokompromitiranih bolesnika. Najčešća klinička manifestacija infekcije u imunokompetentnih osoba je infektivna mononukleoza. Jedini domaćin i izvor infekcije je čovjek. Virus je vrlo rasprostranjen, nakon četrdesete godine života oko 90 % populacije ima specifična antitijela kao dokaz kontakta s virusom. Budući da je EBV osjetljiv na vanjske faktore te vrlo brzo gubi infektivnost izvan čovjeka, za prijenos je potreban neposredan kontakt sa svježom tjelesnom tekućinom koja sadržava aktivan virus, poglavito slinom. Nakon primarne infekcije EBV zaostaje u latentnom stanju, najčešće u B-limfocitima a ponekad i u epitelnim stanicama, T-limfocitima ili NK-stanicama (od eng. – *natural killer*) (Mui i sur. 2017).

Utvrđeno je da mnogi virusi koriste put ulaska u stanicu koji počinje vezanjem za EGFR te da EGFR djeluje kao koreceptor za ulazak CMV-a u stanice, npr. monocite, gdje se prilikom vezanja virusa uočila pojačana aktivnost EGFR-a, popraćena s dodatnom nizvodnom fosforilacijom signalnih putova (Falcão i sur. 2017).

2. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteza istraživanja je da je nastanak karcinoma pluća s mutacijom *EGFR*-a povezan s virusnom etiologijom.

Ciljevi istraživanja:

- utvrditi prisutnost DNA virusa CMV, HPV 16, HPV 18 i EBV kod pacijenata s karcinomom pluća kod kojih je utvrđena mutacija *EGFR*-a
- utvrditi prisutnost DNA virusa CMV, HPV 16, HPV 18 i EBV kod pacijenata s karcinomom pluća kod kojih nije utvrđena mutacija *EGFR*-a
- utvrditi potencijalnu razliku u virusnoj etiologiji kod dvije skupine karcinoma pluća

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključeno je 67 ispitanika s karcinomom pluća. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine. Prva skupina se sastojala od 34 pacijenta kod kojih je dokazana mutacija *EGFR*-a, a druga, kontrolna skupina, je obuhvaćala 33 pacijenta s karcinomom pluća kod kojih nije nađena mutacija *EGFR*-a. Oba spola su bila zastupljena u otprilike jednakom omjeru u obje grupe ispitanika. Grupe su usporedive i prema dobi ispitanika. Svi korišteni uzorci dio su studije odobrene od strane nadležnog povjerenstva Klinike za plućne bolesti Jordanovac.

Od ukupno 34 ispitanika iz prve skupine 14 osoba su pripadnici muškog spola (41,2 %) a 20 ženskog spola (58,8 %). U drugoj, kontrolnoj, skupini od 33 ispitanika, 13 osoba su pripadnici muškog spola (39,4 %) a 20 ženskog spola (60,6 %). Medijan dobi u skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a je bio 69 godina (39 – 91). Medijan dobi u kontrolnoj skupini je bio 69 godina (44 – 89). U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a 24 su bila nepušača, 8 pušača (uključuje i bivše pušače), a za dvije osobe nije bilo podataka o pušačkom statusu. U skupini bez mutacija *EGFR*-a bila su 23 pušača (uključujući i bivše pušače) te 10 nepušača. Podaci o ispitanicima se nalaze u tablici 1.

Tablica 1. Popis ispitanika po skupinama

Skupina ispitanika s mutacijom <i>EGFR</i> -a				Skupina ispitanika kod kojih nije dokazana mutacija <i>EGFR</i> -a		
šifra pacijenta	spol	dob	mutacija <i>EGFR</i> -a	šifra pacijenta	spol	dob
67	ž	89	Ex20Ins	1	m	65
133	m	70	L858R	2	m	56
144	ž	64	Ex19Del	8	m	70
147	m	80	L858R	18	ž	78
154	m	91	L858R	22	ž	46
156	ž	71	L858R	27	m	44
192	m	65	L858R	30	ž	53
197	ž	82	L858R	41	m	81
231	ž	73	L858R	47	ž	74
248	ž	76	L858R; Ex20Ins	50	ž	72
259	ž	68	L858R	52	ž	52
264	ž	49	S768I	58	ž	84
269	ž	85	L858R; T790M	59	ž	89
273	ž	70	Ex19Del; T790M	71	ž	63
342	ž	47	Ex19Del	87	ž	64
344	m	39	Ex19Del	145	ž	58
356	m	82	L858R	261	ž	87
402	m	58	L858R	300	ž	68
432	ž	59	Ex19Del	310	ž	77
434	ž	56	Ex19Del	350	ž	83
482	ž	85	Ex19Del	369	m	67
504	m	49	T790M, G719X	380	m	57
516	ž	74	Ex19Del	404	m	85
519	m	57	Ex21 L858R, Ex20Ins	405	ž	80
521	m	76	Ex18G719X	458	m	75
583	ž	75	Ex21 L858R	564	ž	71
640	m	72	Ex20Ins	655	m	85
684	ž	88	Ex19 Del	657	ž	68
698	ž	83	Ex21 L858R	670	ž	83
729	m	57	Ex21 L858R	792	m	53
745	m	62	Ex21 L858R	808	ž	78
751	m	76	Ex19 Del	813	m	57
836	ž	74	Ex 19 Del	899	m	75
860	ž	65	Ex21 L858R			

3.2 Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom

Virusnu DNA kod ispitanika detektirala sam lančanom reakcijom polimerazom (PCR, od eng. – *polymerase chain reaction*) korištenjem specifičnih setova početnica. Lančana reakcija polimerazom omogućuje umnažanje određenog dijela DNA kalupa *in vitro* (Alberts i sur. 2002). Poznavajući nukleotidni slijed u blizini 5' i 3' – dijela DNA koji želimo umnožiti, konstruiraju se oligonukleotidne početnice nizvodne (*f*, od eng. - *forward*) i uzvodne (*r*, od eng. – *reverse*) orijentacije. PCR se sastoji od 3 ciklusa, a svaki ciklus se sastoji od denaturacije, prijanjanja početnica i produljivanja lanaca.

Za HPV 16 i HPV 18 sam umnažala regiju gena *E7*. Kod HPV 16 očekivana veličina produkta reakcije PCR je 212 pb, a za HPV 18 veličina produkta reakcije PCR je 236 pb (Gheit i sur. 2006). Za EBV sam umnažala regiju BamH1-W, a veličina produkta reakcije PCR je 314 pb (Brocksmitth i sur. 1991). Kod CMV-a sam umnažala dvije regije, jedna je regija ranog gena *MIE* (od eng. – *immediate-early gene*) a druga je ona za glikoprotein B (*gB*) (Fenner i sur. 1991). Glikoprotein B sam umnažala metodom ugniježđenog PCR-a (od eng. – *nested PCR*) s dva seta početnica (Coyle i sur. 2002). Veličina produkta za analizu gena *MIE* je 110 pb, a veličina produkata za gen *gB* je u prvom ciklusu PCR-a s početnicama A i B 326 pb, a u drugom ciklusu s početnicama C i D je 301 pb. Sekvencije početnica se nalaze u tablici 2.

Tablica 2. Oligonukleotidne početnice korištene za reakcije PCR-a i ugniježđenog PCR-a.

Virus	Početnica	Sekvencija početnice (5' - 3')	Veličina produkta (pb)
HPV 16	HPV 16f	TGAGCAATTAATGACAGCTCAGAG	212
	HPV 16r	TGAGAACAGATGGGGCACACAAT	
HPV 18	HPV 18f	GACCTTCTATGTCACGAGCAATTA	236
	HPV 18r	TGCACACCACGGACACACAAAG	
EBV	EBV1	AAAGCGGGTGCAGTAACAGGTAAT	314
	EBV2	TTGACTGAGAAGGTGGCCTAGCAA	
CMV	MIE6	AGTGTGGATGACCTACGGGCCATCG	110
	MIE7	GGTGACACCAGAGAATCAGAGGAGC	
	CMV 5A	TCATGAGGTCGTCCAGA	326
	CMV 5B	TGAGGAATGTCAGCTTC	
	CMV 5C	TCGTCCAGACCCTTGAGGTA	301
	CMV 5D	CCAGCCTCAAGATCTTCA T	

Sve početnice (Macrogen Inc., Korea) su bile liofilizirane u koncentraciji 25 nM. Otopljene su tako da se dobije koncentracija 100 pmol/ μ L.

Prije provođenja reakcije PCR-a na uzorcima izoliranima iz ispitanika isprobala sam različite uvjete kako bih dobila optimalni protokol pojedinih reakcija. Kao kalup sam koristila DNA izoliranu iz stanica za koje je već prije utvrđeno da se u njima nalaze virusi od interesa ili izolate samog virusa, a ti su uzorci kasnije korišteni i kao pozitivne kontrole. Korištene pozitivne kontrole opisane su u tablici 3.

Tablica 3. Izvor DNA korištene kao pozitivna kontrola.

Virus	Virusna DNA
HPV 16	izolirana iz stanica HeLa
HPV 18	izolirana iz stanica karcinoma vrata maternice
EBV	izolirana iz stanica limfoma
CMV	izolirana iz krvne plazme pacijenta zaraženog virusom

Reakcijske smjese PCR-a sadržavale su EmeraldAmp PCR MasterMix 2X (Takara Bio Inc.), oligonukleotidne početnice u koncentraciji od 0,2 μ M, uzorak DNA koncentracije 5 ng/ μ L i dH₂O.

Uvjeti koji su korišteni za reakcije PCR-a nalaze se u tablici 4.

Tablica 4. Optimizirani uvjeti reakcija PCR-a

	Temperatura	Vrijeme	
Početna denaturacija	98 °C	2 min	
Denaturacija kalupa	98 °C	10 s	} 40 ciklusa
Prijanjanje početnica	60 °C	30 s	
Produljivanje lanaca	72 °C	30 s	
Završno produljivanje	72 °C	2 min	

Umnožene produkte dobivene reakcijom PCR-a analizirala sam elektroforezom u 2 % - tnom agaroznom gelu. Koristila sam agarozu u prahu (Sigma-Aldrich, Inc.) i pufer 1X TAE (Tris-Acetat-EDTA), a elektroforeza se vozila 30 min na 120 V. Koristila sam marker veličina DNA GeneRuler DNA Ladder Mix, 0.1µg/µL (Thermo Fisher Scientific, USA).

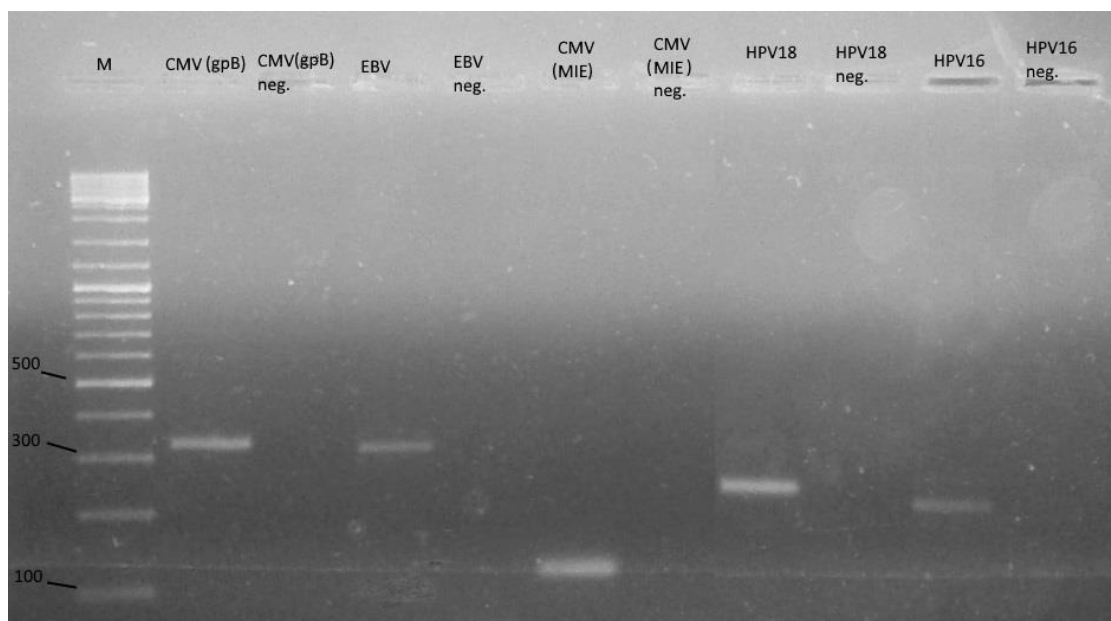
3.2.2 Statistička analiza

Podatke dobivene eksperimentima sam statistički analizirala u programu SPSS 25 (IBM, Armonk, New York). Koristila sam hi-kvadrat test za usporedbu učestalosti infekcije virusima između skupine koja ima mutaciju *EGFR*-a i skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a. Statistička značajnost postavljena je na $p \leq 0.05$.

4. Rezultati

4.1. Optimizacija testova za detekciju virusa

Nakon više isprobanih uvjeta za reakciju PCR-a sa specifičnim početnicama za CMV, EBV i HPV, uspostavljeni su optimalni uvjeti koji se nalaze u tablici 4. Kao pozitivne kontrole za ostale reakcije su poslužili uzorci na kojima su uspostavljeni optimalni uvjeti. Rezultati optimizacije prikazani su na slici 5. Dobivene su vrpce DNA očekivanih veličina za pozitivne uzorke, a na negativnim kontrolama nema vrpce DNA što potvrđuje uspješno provedenu reakciju PCR-a.

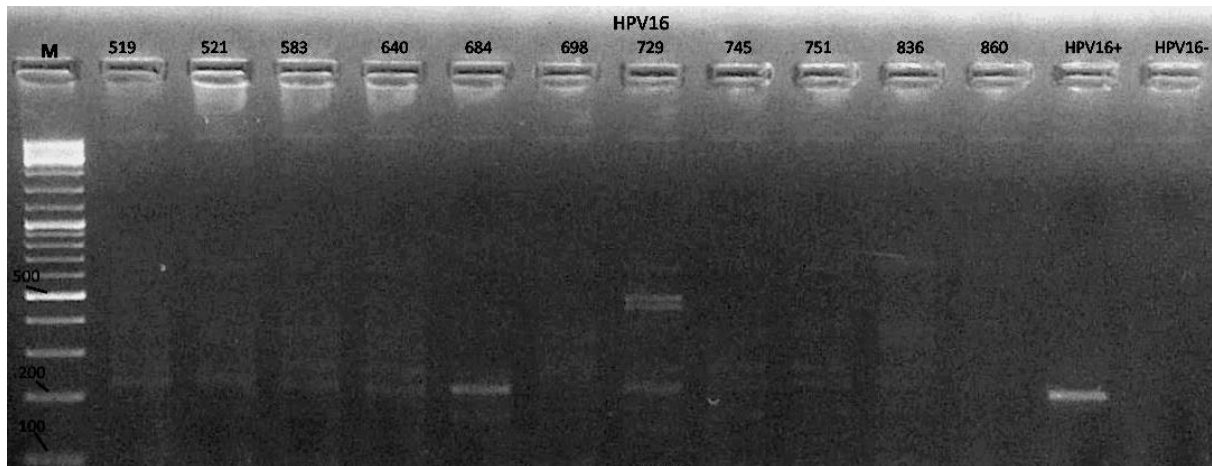


Slika 5. Pozitivne kontrole za detekciju virusa CMV, EBV i HPV.

4.2. Detekcija HPV-a u stanicama karcinoma pluća

Analizirana je prisutnost DNA virusa HPV u uzorcima karcinoma pluća kod kojih je utvrđena mutacija *EGFR*-a i onih kod kojih nije dokazana mutacija *EGFR*-a. U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus HPV 16 je detektiran kod 10 (29,4 %) pacijenata (Slika 6). Od toga su 2 (14,3 %) ispitanika mlađa od 69 godina, a 8 ispitanika (40 %) je starije od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus 6 (42,9 %) je muškog spola a 4 su (20 %) ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod 5 (62,5 %) ispitanika je detektiran HPV16, a i od ukupnog broja nepušača kod 5 (20.8 %) ispitanika utvrđen je HPV 16. Nije utvrđena statistički

značajna povezanost između infekcije HPV 16-om i spola i dobi, dok je između infekcije HPV 16-om i pušačkog statusa utvrđena statistički značajna povezanost od 0,028 unutar skupine s mutacijom *EGFR*-a (Tablica 5).



Slika 6. Detekcija prisutnosti virusa HPV 16 u istraživanim uzorcima

Tablica 5. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa HPV 16 u tumorskim stanicama kod ispitanika s dokazanom mutacijom *EGFR*-a.

Karakteristike	HPV16		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	2 (14,3 %)	12 (85,7 %)	0,105
≥69	8 (40,0 %)	12 (60,0 %)	
Spol			
Muški	6 (42,9 %)	8 (57,1 %)	0,150
Ženski	4 (20,0 %)	16 (80,0 %)	
Pušenje			
Da	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)	0,028
Ne	5 (20,8 %)	19 (79,2 %)	
Ukupno	10 (29,4 %)	24 (70,6 %)	

U skupini ispitanika kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a virus HPV 16 je detektiran kod 3 (29,4 %) ispitanika. Od toga je 1 (6,7 %) ispitanik mlađi od 69 godina a 2 (11,1 %) ispitanika su stariji od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus 2 (15,4 %) su muškg

spola a 1 (5 %) ispitanik je ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod jednog (4,3 %) ispitanika je detektiran HPV 16, a od ukupnog broja nepušača kod 2 (20,8 %) ispitanika je utvrđen HPV 16. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije HPV16-om i spola, dobi te pušačkog statusa unutar skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa HPV16 u tumorskim stanicama kod ispitanika kod kojih nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	HPV16		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	1 (6,7 %)	14 (93,3 %)	0,658
≥69	2 (11,1 %)	16 (88,9 %)	
Spol			
Muški	2 (15,4 %)	11 (84,6 %)	0,822
Ženski	1 (5,0 %)	19 (95,0 %)	
Pušenje			
Da	1 (4,3 %)	22 (95,7 %)	0,151
Ne	2 (20,0 %)	8 (80,0 %)	
Ukupno	3 (9,1 %)	30 (90,9 %)	

U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a kod njih 10 je detektiran HPV 16, dok je u skupini kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a kod 3 ispitanika detektiran HPV 16. Statistički je utvrđena češća infekcija virusom HPV 16 stanica koje imaju mutaciju *EGFR*-a ($p=0,035$) (Tablica 7).

Tablica 7. Usporedba prisutnosti virusa HPV 16 u tumorskim stanicama između skupine kod koje postoji mutacija *EGFR*-a i skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	HPV16		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
<i>EGFR</i> status			
pozitivan	10 (29,4 %)	24 (70,6 %)	0,035
negativan	3 (9,1 %)	30 (90,9 %)	
Ukupno	13 (19,4 %)	54 (80,6 %)	

U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus HPV 18 je detektiran kod 23 (67,6 %) ispitanika. Od toga je 11 (78,6 %) ispitanika mlađe od 69 godina a 12 ispitanika (60 %) je starije od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus 9 (64,3 %) je muškog spola a 14 (70 %) su ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod 6 (75 %) ispitanika je detektiran HPV 18, a od ukupnog broja nepušača kod 15 (62,5 %) ispitanika je utvrđen HPV 18. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije virusom HPV 18 i spola, dobi i pušačkog statusa unutar skupine kod koje postoji mutacija *EGFR*-a (Tablica 8).

Tablica 8. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa HPV 18 u tumorskim stanicama kod ispitanika s dokazanom mutacijom *EGFR*-a.

Karakteristike	HPV 18		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	11 (78,6 %)	3 (21,4 %)	0,255
≥69	12 (60,0 %)	8 (40,0 %)	
Spol			
Muški	9 (64,3 %)	5 (35,7 %)	0,726
Ženski	14 (70,0 %)	6 (30,0 %)	
Pušenje			
Da	6 (75,0 %)	2 (25,0 %)	0,519
Ne	15 (62,5 %)	9 (37,5 %)	
Ukupno	23 (67,6 %)	11 (32,4 %)	

U skupini ispitanika kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a kod jednog (3,1 %) ispitanika je detektiran virus HPV 18. Ispitanik je ženska osoba, starija od 69 godina i pušač (Tablica 9).

Tablica 9. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa HPV 18 u tumorskim stanicama kod ispitanika kod kojih nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	HPV 18		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	0	15	0,354
≥69	1 (5,6 %)	17 (94,4 %)	
Spol			
Muški	0	13	0,413
Ženski	1 (5,0 %)	19 (95,0 %)	
Pušenje			
Da	1 (4,3 %)	22 (95,7 %)	0,503
Ne	0	10	
Ukupno	1 (3,1 %)	32 (96,9 %)	

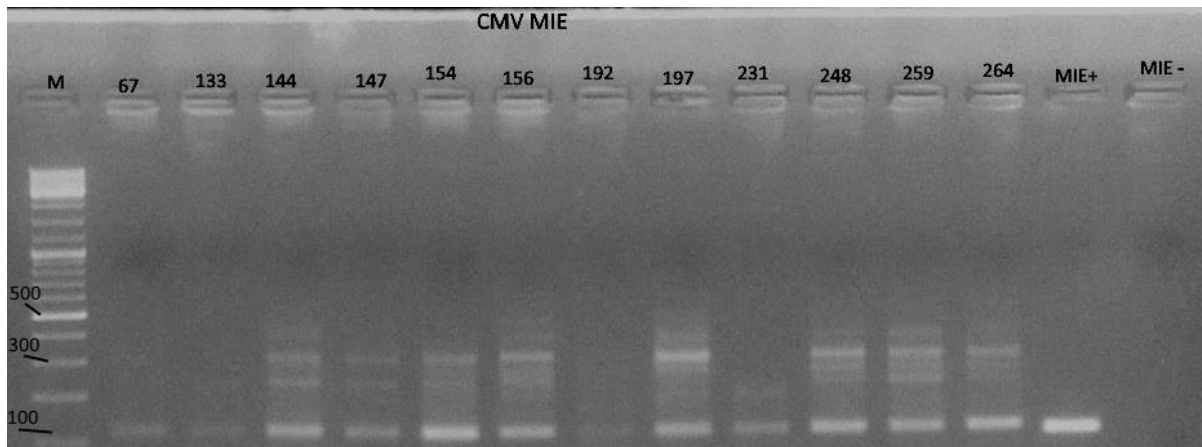
U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a kod njih 23 je detektiran HPV 18, dok je u skupini kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a kod jednog ispitanika utvrđen HPV 18. Statistički je utvrđena češća infekcija virusom HPV 18 stanica koje imaju mutaciju *EGFR*-a ($p < 0.001$) (Tablica 10).

Tablica 10. Usporedba prisutnosti virusa HPV 18 u tumorskim stanicama između skupine kod koje postoji mutacija *EGFR*-a i skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	HPV 18		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
<i>EGFR</i> status			
pozitivan	23 (67,6 %)	11 (32,4 %)	<0.001
negativan	1 (3,0 %)	32 (97,0 %)	
Ukupno	24 (35,8 %)	43 (64,2 %)	

4.3. Detekcija CMV-a u stanicama karcinoma pluća

U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus CMV (*MIE*) je detektiran kod 13 (38,2 %) ispitanika (Slika 7). Od toga je 5 (35,7 %) ispitanika mlađe od 69 godina a 8 ispitanika (40 %) je starije od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus 4 (28,6 %) je muškog spola a 9 (45 %) je ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod jednog (12,5 %) ispitanika je detektiran CMV (*MIE*), a od ukupnog broja nepušača kod njih 11 (45,8 %) je detektiran CMV (*MIE*). Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije virusom CMV (*MIE*) i spola, dobi i pušačkog statusa unutar skupine kod koje je dokazana mutacija *EGFR*-a (Tablica 11).



Slika 7. Detekcija virusa CMV (*MIE*) u istraživanim uzorcima.

Tablica 11. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa CMV (*MIE*) u tumorskim stanicama kod ispitanika s dokazanom mutacijom *EGFR*-a.

Karakteristike	CMV (<i>MIE</i>)		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	5 (35,7 %)	9 (64,3 %)	0,800
≥69	8 (40,0 %)	12 (60,0 %)	
Spol			
Muški	4 (28,6 %)	10 (71,4 %)	0,332
Ženski	9 (45,0 %)	11 (55,0 %)	
Pušenje			
Da	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)	0,092
Ne	11 (45,8 %)	13 (54,2 %)	
Ukupno	13 (38,2 %)	21 (61,8 %)	

U skupini ispitanika kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a kod ni jednog ispitanika nije utvrđena prisutnost virusa CMV (*MIE*) (Tablica 12).

Tablica 12. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa CMV (*MIE*) u tumorskim stanicama kod ispitanika kod kojih nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	CMV (<i>MIE</i>)		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	0	15	-
≥69	0	18	
Spol			
Muški	0	13	-
Ženski	0	20	
Pušenje			
Da	0	23	-
Ne	0	10	
Ukupno	0	33	

U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus CMV (*MIE*) je detektiran kod 13 ispitanika, dok u skupini kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a kod ni jednog ispitanika nije utvrđena prisutnost CMV (*MIE*). Statistički je utvrđena češća infekcija virusom CMV (*MIE*) stanica koje imaju mutaciju *EGFR*-a ($p < 0,001$) (Tablica 13).

Tablica 13. Usporedba prisutnosti virusa CMV (*MIE*) u tumorskim stanicama između skupine kod koje postoji mutacija *EGFR*-a i skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	CMV (<i>MIE</i>)		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
<i>EGFR</i> status			
pozitivan	13 (38,2 %)	21 (61,8 %)	<0,001
negativan	0	33	
Ukupno	13 (19,4 %)	54 (80,6 %)	

U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a, nakon ugniježdene reakcije PCR-a, virus CMV (*gB*) je detektiran kod 4 (13,3 %) ispitanika. Od toga je 1 (7,2 %) ispitanik mlađi od 69 godina a 3 ispitanika (15 %) su starija od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus 2 (14,3 %) su muškog spola i 2 (10 %) su ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod 3 (37,5 %) ispitanika je detektiran CMV (*gB*), a od ukupnog broja nepušača kod jednog (4,2 %) je utvrđena prisutnost CMV-a (*gB*). Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije virusom CMV-a (*gB*) i spola, dobi i pušačkog statusa unutar skupine kod koje je dokazana mutacija *EGFR*-a (Tablica 14).

Tablica 14. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa CMV (*gB*) u tumorskim stanicama kod ispitanika s dokazanom mutacijom *EGFR*-a.

Karakteristike	CMV (<i>gB</i>)		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	1 (7,2 %)	13 (92,8 %)	0,484
≥69	3 (15,0 %)	17 (85,0 %)	
Spol			
Muški	2 (14,3 %)	12 (85,7 %)	0,703
Ženski	2 (10,0 %)	18 (90,0 %)	
Pušenje			
Da	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)	1,000
Ne	1 (4,2 %)	23 (95,8 %)	
Ukupno	4 (13,3 %)	30 (88,2 %)	

U skupini ispitanika kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a, nakon ugniježdene reakcije PCR-a, virus CMV (*gB*) je utvrđen kod jednog (3,1 %) ispitanika, ženskog spola, nepušača, dobi starije od 69 godina (Tablica 15).

Tablica 15. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa CMV (*gB*) u tumorskim stanicama kod ispitanika kod kojih nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	CMV (<i>gB</i>)		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	0	15	0,354
≥69	1 (5,6 %)	17 (94,4 %)	
Spol			
Muški	0	13	0,413
Ženski	1 (5,0 %)	19 (95,0 %)	
Pušenje			
Da	0	23	0,124
Ne	1 (10,0 %)	9 (90,0 %)	
Ukupno	1 (3,1 %)	32 (96,9 %)	

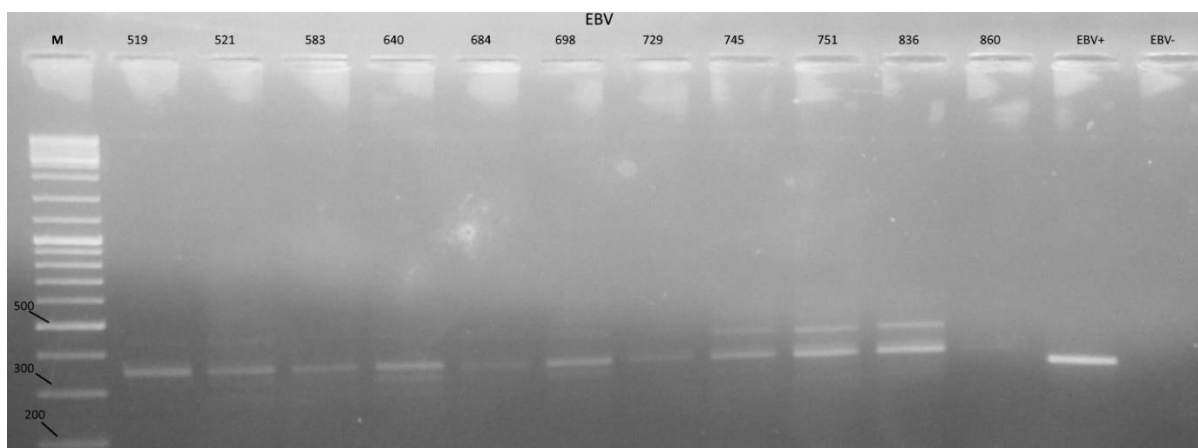
U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus CMV (*gB*) detektiran je kod 4 ispitanika, dok u skupini kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a je kod jednog ispitanika utvrđena prisutnost CMV (*gB*). Nije utvrđena statistički značajna češća infekcija virusom CMV-a (*gB*) stanica koje imaju mutaciju *EGFR*-a (Tablica 16).

Tablica 16. Usporedba prisutnosti virusa CMV (*gB*) u tumorskim stanicama između skupine kod koje postoji mutacija *EGFR*-a i skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	CMV (<i>gB</i>)		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
<i>EGFR</i> status			
pozitivan	4 (11,8 %)	30 (88,2%)	0,174
negativan	1 (3,0 %)	32 (97,0 %)	
Ukupno	5 (7,5 %)	62 (92,5 %)	

4.4. Detekcija EBV-a u stanicama karcinoma pluća

U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus EBV je detektiran kod 26 (76,5 %) ispitanika (Slika 8). Od toga je 11 (78,6 %) ispitanika mlađe od 69 godina, a 15 (78,6 %) ispitanika je starije od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus njih 11 (64,3 %) je muškog spola, a 15 (75 %) ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod 7 (87,5 %) ispitanika je detektiran virus EBV, a od ukupnog broja nepušača kod 17 (70,8 %) ispitanika je detektiran EBV. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije virusom EBV-a i spola, dobi i pušačkog statusa unutar skupine s mutacijom *EGFR*-a (Tablica 17).



Slika 8. Detekcija virusa EBV u istraživanim uzorcima.

Tablica 17. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa EBV u tumorskim stanicama kod ispitanika s dokazanom mutacijom *EGFR*-a.

Karakteristike	EBV		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	11 (78,6 %)	3 (21,4 %)	0,809
≥69	15 (75,0 %)	5 (25,0 %)	
Spol			
Muški	11 (78,6 %)	3 (21,4 %)	0,809
Ženski	15 (75,0 %)	5 (25,0 %)	
Pušenje			
Da	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	0,346
Ne	17 (70,8 %)	7 (29,2 %)	
Ukupno	26 (76,5 %)	8 (23,5 %)	

U skupini ispitanika kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a virus EBV je detektiran kod 6 (18,2 %) ispitanika. Od toga je 4 (26,7 %) ispitanika mlađe od 69 godina a 2 (11,1 %) ispitanika su starija od 69 godina. Od ukupnog broja ispitanika kod kojih je nađen virus njih 4 (30,8 %) je muškog spola a 2 (10 %) su ženskog spola. Od ukupnog broja pušača kod 5 (21,7 %) ispitanika je detektiran EBV, a od ukupnog broja nepušača kod jednog (10 %) ispitanika je detektiran EBV. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije virusom EBV-a i spola, dobi i pušačkog statusa unutar skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a (Tablica 18).

Tablica 18. Usporedba dobi, spola i pušačkog statusa s prisutnošću virusa EBV u tumorskim stanicama kod ispitanika kod kojih nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	EBV		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
Dob			
<69	4 (26,7 %)	11 (73,3 %)	0,249
≥69	2 (11,1 %)	16 (88,9 %)	
Spol			
Muški	4 (30,8 %)	9 (69,2 %)	0,131
Ženski	2 (10,0 %)	18 (90,0 %)	
Pušenje			
Da	5 (21,7 %)	18 (78,3 %)	0,422
Ne	1 (10,0 %)	9 (90,0 %)	
Ukupno	6 (18,2 %)	27 (81,8 %)	

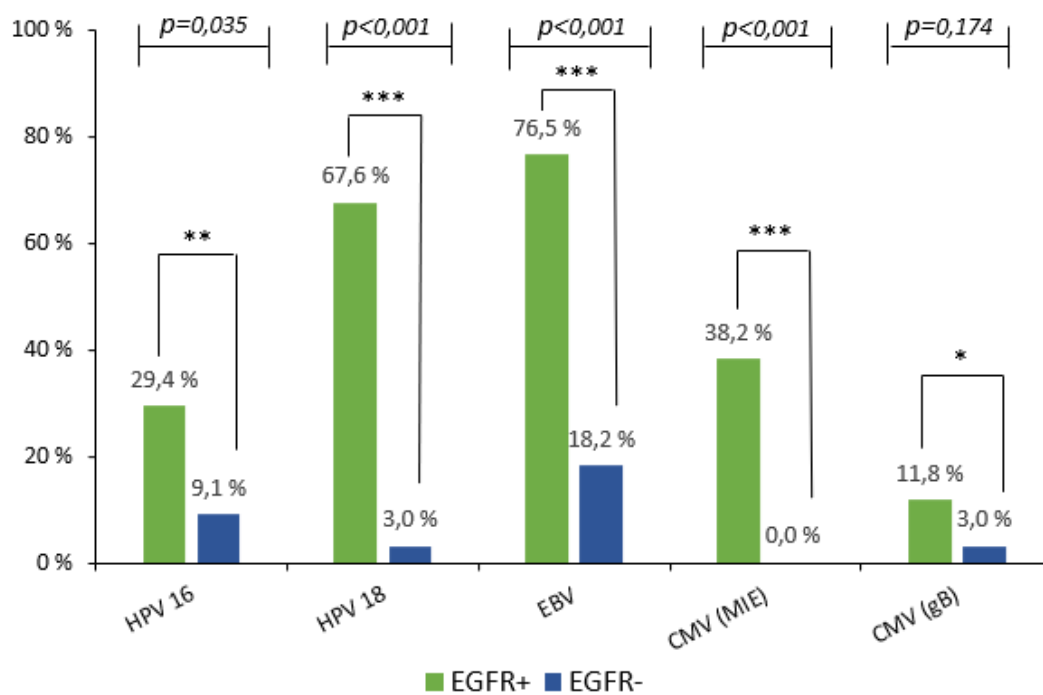
U skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a virus EBV je detektiran kod 26 ispitanika, dok je u skupini kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a kod 6 ispitanika detektiran EBV. Statistički je utvrđena češća infekcija virusom EBV stanica koje imaju mutaciju *EGFR*-a ($p < 0.001$) (Tablica 19).

Tablica 19. Usporedba prisutnosti virusa EBV u tumorskim stanicama između skupine kod koje postoji mutacija *EGFR*-a i skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

Karakteristike	EBV		p - vrijednost
	pozitivno	negativno	
EGFR status			
pozitivan	26 (76,5 %)	8 (23,5 %)	<0,001
negativan	6 (18,2 %)	27 (81,8 %)	
Ukupno	32 (47,8 %)	35 (52,2 %)	

4.5. Učestalost infekcije virusima kod skupine adenokarcinoma s mutacijom EGFR-a i kod skupine kod koje nije dokazana mutacija EGFR-a

Razlike u učestalosti različitih infekcija između adenokarcinoma pluća koje imaju mutaciju *EGFR*-a i onih koje nemaju tu mutaciju prikazana je na slici 9. Statistički je utvrđena češća infekcija virusima u stanicama koje imaju mutaciju *EGFR*-a nego u stanicama kojima nije dokazana mutacija *EGFR*-a.



Slika 9. Detekcija virusa u skupini s mutacijom *EGFR*-a i skupini kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a.

5. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja pokazali su prisutnost virusa HPV-a kod 43 % ispitanika s karcinomom pluća. Od toga je tip visokog rizika HPV 16 utvrđen kod 13, a HPV18 kod 24 ispitanika, dok su oba tipa virusa bila prisutna kod 8 ispitanika. Rezultati se razlikuju od dosadašnjih istraživanja kod europskih populacija gdje su različiti tipovi virusa HPV-a uočeni u prosjeku u 16 % slučajeva, ali su u skladu s istraživanjima koja obuhvaćaju Kinu i ostatak Azije gdje ti postoci iznose u prosjeku 37 %. U istraživanjima kod američke populacije postotak je 12,5 % a za Australiju iznosi 18,5 % (Syrjänen 2012). U nedavnoj grčkoj studiji samo je kod 3 % ispitanika pronađen HPV (Argyri i sur. 2017), a u indijskoj studiji kod 6.8% ispitanika (Gupta i sur. 2016). U ovom istraživanju je statistički utvrđena češća infekcija virusom HPV-a u skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a nego u skupini bez mutacije ($p=0,035$ za HPV16 i $p<0,001$ za HPV18, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Li i sur. 2015). Razlog češćoj infekciji u skupini s mutacijom *EGFR*-a bi mogao biti zbog virusnog proteina E6, za kojeg je pokazano da uzvodno regulira inhibitor apoptoze u signalnom putu EGFR/PI3K/AKT te je moguće da taj signalni put ima središnju ulogu u tumorigenezi karcinoma s mutacijom *EGFR*-a i infekcijom HPV-om (Nakamura i Saji 2014). U dosadašnjim istraživanjima HPV je potvrđen u etiologiji karcinoma vrata maternice i određenom tipu orofaringealnog karcinoma, ali dosad ta povezanost s karcinomom pluća nije u potpunosti utvrđena, uglavnom zbog velike heterogenosti među studijama, geografskim razlikama te različitim metodama detekcije virusne DNA (Argyri i sur. 2017; Gupta i sur. 2016). U ovom istraživanju kao metoda detekcije korišten je PCR i kao potvrda detekcije virusa HPV 16 i HPV 18 se uzimala prisutnost vrpce DNA odgovarajuće veličine nakon elektroforeze na gelu. Za usporedbu su osim standardnog markera veličina korištene i pozitivne kontrole. Kod većine rezultata koji su smatrani pozitivnima pojavljivale su se i vrpce drugih veličina, što bi moglo ukazivati na prisutnost onečišćenja u uzorcima ili možda na nespecifično vezanje početnica, što bi moglo objasniti dosta veći postotak prisutnosti HPV-a nego što je to očekivano. Međutim, takve vrpce neodgovarajućih veličina na gelu su se pojavljivale samo kod slučajeva koji su imali detektiranu mutaciju gena za EGFR i kod detekcije virusa HPV 16 i HPV 18. Dodatnih vrpca DNA nije bilo kod slučajeva koji su smatrani negativnima tj. onih kod kojih nije dokazana mutacija gena za EGFR, iako su svi uzorci rađeni u istim uvjetima. Dodatno, pozitivne kontrole su uvijek imale

prisutnost samo jedne vrpce očekivane veličine, dok su negativne kontrole bile konzistentno negativne. Kako bi se prisutnost virusa utvrdila sa sigurnošću potrebno je daljnje istraživanje s osjetljivijim molekularnim metodama, te na kraju i sekvenciranje DNA kao konačna potvrda. Isti nalazi zapaženi su i kod detekcije prisutnosti ostalih istraživanih virusa.

Kod 47,8 % ispitanika u ovoj studiji utvrđena je prisutnost EBV-a. To nije u skladu s dosadašnjim istraživanjima kod europskih populacija gdje se virus u stanicama karcinoma pluća javlja u postotku od 0 do 2,1 %, ali je u skladu s istraživanjima na azijskim populacijama gdje je učestalost veća i iznosi između 30 i 50 % (Gupta i sur. 2016). U nedavnom istraživanju detekcije virusa EBV-a u koncentratu kondenziranog izdaha pacijenata s karcinomom pluća utvrđena je prisutnost EBV-a u oko 30 % slučajeva, ali i u oko 20 % slučajeva iz kontrolne skupine (Carpagnano i sur. 2016). U istraživanjima prisutnosti virusa kod drugih tipova karcinoma poput NPC-a i LELC-a utvrđena je prisutnost EBV-a u većim postocima (Xie i sur. 2018). U ovom istraživanju je statistički utvrđena češća infekcija virusom EBV-a u skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a u odnosu na skupinu ispitanika s adenokarcinomom bez te mutacije ($p < 0,001$). U dosadašnjoj literaturi nema podataka o karcinomu pluća s mutacijom *EGFR*-a i infekcije EBV-om osim kod već spomenutog karcinoma pluća tipa LELC, gdje je uočeno upravo suprotno, da infekcija EBV-om obično nije povezana s mutacijama *EGFR*-a (Xie i sur. 2018). Visoka razina detekcije virusne DNA u ovom istraživanju mogla bi se objasniti činjenicom da je infekcija EBV-om dosta česta i rasprostranjena, te kod 90 % populacije zaostaje latentna infekcija s malim brojem kopija virusa tijekom cijelog života. Međutim latentna infekcija s malim brojem kopija virusa se najčešće zadržava u memorijskim B-limfocitima i u dosadašnjim istraživanjima kod zdravih seropozitivnih pojedinaca nije detektiran EBV, ili je detektiran u manjem postotku, dok se u uzorcima izoliranim iz Burkittovog limfoma ili Hodgkinovog limfoma uočila infekcija EBV-om u velikom postotku (Carpaganano i sur. 2016; Hassan i sur. 2006). Za potvrdu ovih rezultata s još većom sigurnošću trebalo bi provesti i sekvenciranje DNA, ali i neke druge molekularne metode, npr. detekciju aktivnih transkripata miRNA kodiranih EBV-om (EBERs) što je jedna od standardnih metoda za detekciju aktivnosti EBV-a (Xie i sur. 2018). U dosadašnjim istraživanjima prisutnosti EBV-a kod karcinoma pluća rezultati su nekonzistentni i uloga EBV-a u tumorigenezi ostaje nepotvrđena. S obzirom na rezultate ovog rada i manjak dosadašnjih istraživanja bilo bi dobro naknadno obraditi veći uzorak populacije s fokusom na karcinome pluća čije stanice imaju mutacije

EGFR-a, te također uključiti i kontrolne uzorke zdravih pojedinaca kako bi se utvrdilo je odgovara li ovako veliki postotak detekcije EBV-a učestalosti infekcije u generalnoj populaciji ili samo kod karcinoma s mutacijom *EGFR*-a, što bi moglo potvrditi etiološku ulogu ovog virusa kod tog tipa karcinoma pluća, te prebaciti fokus na ranu detekciju i ciljanu terapiju ili cjepiva za ovaj virus kao što je to slučaj s cjepivima za HPV. Također, nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi preko kojih bi EBV djelovao preko *EGFR*-a, ali moguće je da poput HPV-a ili CMV-a mijenja regulaciju jednog od signalnih putova koji djeluju preko *EGFR*-a i koji su značajni za životni ciklus i preživljenje stanice, a zasad je kao kandidat predložen protein LMP2A u virusu EBV-a koji ubrzanim cijepanjem integrina povećava metastatski potencijal stanica karcinoma (Liang i sur. 2017).

Virus CMV kod naših je ispitanika detektiran u 27 % slučajeva. Od toga je CMV (*MIE*) detektiran kod 38 %, a CMV (*gB*) je detektiran kod 13 % ispitanika. I ovdje je uočena statistički značajna razlika u prisutnosti CMV (*MIE*) kod skupine s mutacijom *EGFR*-a ($p < 0,001$), dok kod prisutnosti CMV (*gB*) nije uočena statistički značajna razlika među skupinama. U dosadašnje dvije studije, za francusku i indijsku populaciju, koje su detektirale CMV u karcinomu pluća nije detektiran ni jedan pozitivan slučaj (Gupta i sur. 2016), dok je nedavna studija na talijanskoj populaciji utvrdila 10 % pozitivnih slučajeva kod karcinoma pluća, ali nije utvrđena statistički značajna razlika između skupine ispitanika s karcinomom i zdravih pojedinaca (Carpagnano i sur. 2016). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju za prisutnost CMV (*MIE*) se slažu s rezultatima istraživanja kod kojeg je korišten isti set početnica za detekciju gena *MIE* i gdje je on detektiran u 23 % ispitanika, a kod kontrolne skupini nije bilo detekcije CMV (*MIE*). U tom istraživanju cilj nije bio istražiti karcinome s mutacijom *EGFR*-a, pa nije poznato koliko od ispitanika s karcinomom pluća kod kojih je utvrđena prisutnost CMV-a ima i mutaciju *EGFR*-a (Giuliani i sur. 2007). Rezultati statistički utvrđene češće infekcije virusom CMV-a (*MIE*) u skupini ispitanika s mutacijom *EGFR*-a mogli bi ići u prilog teoriji da CMV za svoj ulazak u stanicu kao koreceptor koristi signalni put povezan s *EGFR*-om, te preko gena *MIE* inhibira protein p53, što je pokazano *in vitro*, te na taj način djeluje kao onkogen (Falcão i sur. 2017; Mui i sur. 2017).

Kod detekcije CMV-a očekuje se da će kod svih ispitanika kod kojih je detektiran CMV (*MIE*) biti detektiran i CMV (*gB*) ako postoji infekcija CMV-om, međutim to nije bio slučaj na istraživanim uzorcima. I kod detekcije CMV-a u stanicama karcinoma pluća bilo bi potrebno

proširiti istraživanje na druge molekularne metode te uključiti kontrolnu skupinu iz generalne populacije kako bi se utvrdilo jesu li pozitivni rezultati samo odraz stope infekcije virusom u generalnoj populaciji ili postoji etiološka poveznica s nastankom karcinoma.

S obzirom na utvrđene značajne razlike u učestalosti infekcije jednim od virusa kod skupine s mutacijom EGFR-a naspram skupine kod koje nije dokazana mutacija *EGFR*-a, postoji mogućnost da ove dvije skupine karcinoma imaju različitu virusnu etiologiju i da virusi djeluju kao onkogeni te sudjeluju u razvitku karcinoma pluća koji ima mutaciju *EGFR*-a.

6. Zaključci

- Statistički je utvrđena češća infekcija virusima HPV, EBV i CMV kod ispitanika s karcinomom pluća koji kao dio tumorigeneze imaju mutaciju *EGFR*-a.
- Nije utvrđena statistički značajna povezanost između infekcije virusima HPV, EBV i CMV i dobi, spola i pušačkog statusa ispitanika.

7. Literatura

Alberg A. J., Brock M. V., Samet J. M. (2016): Epidemiology of Lung Cancer. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*: 927-939. doi:10.1016/b978-1-4557-3383-5.00052-x

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York, Garland Science (dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>, posljednje pristupljeno 25.1.2019.)

Brcic L., Jakopovic M., Misic M., Seiwert F., Kern I., Smojver-Jezek S., Quehenberger F., Samarzija M., Seiwert S. (2016): Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. *Diagnostics Pathology* **11**: 1–8.

Brocksmith D., Angel C. A., Pringle J. H., Lauder I. (1991): Epstein-Barr viral DNA in Hodgkin's disease: amplification and detection using the polymerase chain reaction. *Journal of pathology* **165**: 11–15.

Brouchet L., Valmary S., Dahan M., Didier A., Galateau-Salle F., Brousset P., Degano B. (2005): Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *British Journal of Cancer* **92**: 743–746.

Bzhalava D., Eklund C., Dillner J. (2015): International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, **476**: 341–344. doi:10.1016/j.virol.2014.12.028

Carcereny E., Morán T., Capdevila L., Cros S., Vilà L., de Los Llanos Gil M., Remón J., Rosell R. (2015). The epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer. *Translational respiratory medicine* **3**. doi:10.1186/s40247-015-0013-z

Carpagnano G. E., Lacedonia D., Natalicchio M. I., Cotugno G., Zoppo L., Martinelli D., Antonetti R., Foschino-Barbaro M. P. (2016): Viral colonization in exhaled breath condensate of lung cancer patients: Possible role of EBV and CMV. *The Clinical Respiratory Journal* **12**(2): 418–424. doi:10.1111/crj.12531

Coyle P. V., Wyatt D. E., Ong G. M., Maxwell A. P., McCaughey C., O’Neill H. J. (2002): A nested primer set targeting the cytomegalovirus glycoprotein B gene. *Journal of Clinical Virology* **25**: 95–96.

Da Cunha Santos G., Shepherd F. A., Tsao, M. S. (2011): EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **6**: 49–69. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130206

Davidson M. R., Gazdar A.F., Clarke B.E. (2013). The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease* **5**: 463–478

Dela Cruz C. S., Tanoue L. T., Matthay R. A. (2011): Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, **32**: 605–44.

Falcão A. S. C., da Costa Vasconcelos P. F., Lobato da Silva D. de F., Viana Pinheiro J. de J., Falcão L. F. M., Quaresma J. A. S. (2017). Mechanisms of human cytomegalovirus infection with a focus on epidermal growth factor receptor interactions. *Reviews in Medical Virology*, **27**: e1955. doi:10.1002/rmv.1955

Fenner E. T., Garweg J. I., Hufert F. T., Boehnke M., Schmitzl H. (1991): Diagnosis of Human Cytomegalovirus-Induced Retinitis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected

Subjects by Using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **29**: 2621–2622.

Gheit T., Landi S., Gemignani F., Snijders P. J. F., Vaccarella S., Franceschi S., Canzian F., Tommasino M. (2006): Development of a sensitive and specific assay combining multiplex pcr and dna microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 2025–2031.

Giuliani L., Terese J., Caterina C., Marisa G., Assunta M., D'Antonio D., Kari S., Cartesio F., Marco C. (2007): Detection of oncogenic viruses (SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV) and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **57**: 273-81. doi:10.1016/j.lungcan.2007.02.019.

Gupta P., Haldar D., Naru J., Dey P., Aggarwal A. N., Minz R. W., Aggarwal R. (2016): Prevalence of human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus in fine needle aspirates from lung carcinoma. A case–control study with review of literature. *Diagnostic Cytopathology* doi: 10.1002/dc.23613

Hassan R., White L. R., Stefanoff C. G., de Oliveira D. E., Felisbino F. E., Klumb C. E., Bacchi C. E., Seuánez H. N., Zalberg I. R. (2006): Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagnostic pathology* **1**(17). doi:10.1186/1746-1596-1-17

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.

Jean Beltran P. M., & Cristea I. M. (2014): The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert review of proteomics* **11**(6): 697-711.

Karachaliou N., Mayo C., Costa C., Magrí I., Gimenez-Capitan A., Molina-Vila M. A., Rosell, R. (2013). KRAS Mutations in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, **14**: 205–214. doi:10.1016/j.clcc.2012.09.007

Li M., Deng F., Qian L. T., Meng S. P., Zhang Y., Shan W. L. (2016). Association between human papillomavirus and EGFR mutations in advanced lung adenocarcinoma. *Oncology letters* **12**: 1953– 1958.

Liang J., Zheng S., Xiao X., Wei J., Zhang Z., Ernberg I. (2017). Epstein-Barr virus-encoded LMP2A stimulates migration of nasopharyngeal carcinoma cells via the EGFR/Ca²⁺/calpain/ITGβ4 axis. *Biology Open* **6**: 914-922. doi:10.1242/bio.024646

Lovly C., Horn L., Oxnard G., Pao W. (2016). EGFR c.2369C>T (T790M) Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer. *My Cancer Genome*. Dostupno na: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/4/> (pristupljeno 15.12.2018.)

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., Adjei, A. A. (2008): Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings*, **83**: 584-94.

Mui U. N., Haley C. T., Tying S. K. (2017): Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *Journal of clinical medicine*, **6**: 111. doi:10.3390/jcm6120111

Nakamura H., Saji H. (2014): A worldwide trend of increasing primary adenocarcinoma of the lung. *Surg Today*, **44**: 1004–12.

Nakanishi Y., Wakisaka N., Kondo S., Endo K., Sugimoto H., Hatano M., Ueno T., Ishikawa K., Yoshizaki T. (2017): Progression of understanding for the role of Epstein-Barr virus and management of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer metastasis reviews* **36**: 435-447.

Pillai R. N., Ramalingam S. S. (2012): The Biology and Clinical Features of Non–small Cell Lung Cancers with EML4-ALK Translocation. *Current Oncology Reports* **14**: 105–110. doi:10.1007/s11912-012-0213-4

Rami-Porta R., Crowley J. J., Goldstraw P. (2009): The revised TNM staging system for lung cancer. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **15**: 4–9.

Roengvoraphoj M., Tsongalis G. J., Dragnev K. H., Rigas J. R. (2013): Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: Focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer treatment reviews* **39**: 839 – 850.

Rosell R., Moran T., Queralt C., Porta R., Cardenal F., Camps C., Majem M., Lopez Vivanco G., Isla D., Provencio M., Insa A. (2009): Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England Journal of Medicine* **361**: 958-67.

Syrjänen K. J. (1980): Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix. *Lung* **158**: 131–142.

Syrjänen K. (2012): Detection of Human Papillomavirus in Lung Cancer: Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Research* **32**(8): 3235 – 3250.

World Health Organization (2018): 'Lung fact sheet'

Dostupno na: gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-lung-fact-sheet.pdf (posljednje pristupljeno 20.12.2018.)

Xie C., Xu X., Wu B., Yang K. Y., Huang J. (2018): Primary pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma in non-endemic region: A case report and literature review. *Medicine* **97**(8): e9976.

8. Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Hajdi Šefčić

Obrazovanje:

- 10/2016. – 4/2019. **Diplomski studij Molekularna biologija**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet
- 10/2009. – 6/2013. **Diplomski studij Biologija i ekologija mora**
Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora
- 10/2006. – 9/2009. **Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora**
Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora

Osposobljavanje:

- 3/2017. – 9/2017. **Laboratorijska stručna praksa**
Laboratorij za biofiziku stanice, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
- 12/2017. **Radionica**
Uvod u bio-procesno inženjerstvo, BIOCentar, Zagreb, Hrvatska
- 6/2015. – 10/2015. **Laboratorijski rad**
Volonterski rad na projektu "Discriminating stocks of red mullet *Mullus barbatus* and striped red mullet *Mullus surmuletus* in the Adriatic and Mediterranean seas using microsatellite analysis" financiranim od strane FAOAdriaMed-a.

Ostale vještine:

- Strani jezici: engleski (C1), talijanski (B2), portugalski (A2)
- Digitalne vještine: Microsoft Office alati (Word, Excel i PowerPoint)
- Statistički program SPSS
- Završen tečaj "Osnove programiranja u Python-u" (coursera.org)