

Univerzitet u Banjoj Luci
Medicinski fakultet



Gordana Katalina

Uticaj kvaliteta uzorka na rezultat testiranja
receptora epidermalnog faktora rasta kod
adenokarcinoma pluća

Master rad

Banja Luka

Univerzitet u Banjoj Luci

Medicinski fakultet

Gordana Katalina

Uticaj kvaliteta uzorka na rezultat testiranja
receptora epidermalnog faktora rasta kod
adenokarcinoma pluća

Master rad

Prof. dr Vesna Gajanin,

vanredni profesor, uža naučna oblast anatomija

Banja Luka

Podaci o mentoru i članovima komisije

Mentor:

Dr Vesna Gajanin, vanredni profesor, uža naučna oblast: anatomija.
Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet.

Članovi komisije:

1. Dr Zdenka Krivokuća, redovni profesor, uža naučna oblast: anatomija.
Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet, predsjednik.
2. Dr Vesna Gajanin, vanredni profesor, uža naučna oblast: anatomija.
Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet, član
3. Dr Aleksandra Salapura, docent, uža naučna oblast: patologija.
Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet, član
4. Dr Aleksandra Šmitran, docent, uža naučna oblast: medicinska
mikrobiologija. Univerzitet u Banjoj Luci, Medicinski fakultet, rezervni
član.

Datum odbrane: Juni 2020. godine

Zahvalnica

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Vesni Gajanin, na svesrdnoj pomoći prilikom pisanja rada, za veliko strpljenje i razumijevanje, a ponajviše za sve divne riječi podrške i ohrabrenja koje su mi bile podstrek da idem naprijed kad god sam zastala.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Radoslavu Gajaninu na podršci da upišem master studije i da uspješno završim ovaj značajni projekat.

Hvala najdražima, Dorotei, Ani i Goranu, uz njihovu ljubav, vjeru i preko najveće prepreke se prelazi kao preko lastinog pera.

Hvala bratu i mojim prijateljima koji me na razne načine podsjećaju na moju životnu krilaticu: “Ko hoće nešto da učini, nađe način, ko neće ništa da učini, nađe opravdanje.” (Pablo Picasso).

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija i etiologija tumora pluća	1
1.2. Klinička slika.....	4
1.3. Paraneoplastični sindromi u karcinomu pluća	5
1.4. Širenje tumora pluća.....	8
1.5. Radiološke karakteristike karcinoma pluća.....	9
1.6. Histološka klasifikacija tumora pluća	11
1.7. Stadiranje tumora pluća.....	16
1.8. Lokalizacija tumora pluća	19
1.9. Makroskopske karakteristike tumora pluća.....	20
1.10. Citološke karakteristike adenokarcinoma pluća	22
1.11. Histološke karakteristike adenokarcinoma pluća	23
1.12. Histološki subtipovi adenokarcinoma pluća.....	24
1.13. Genetski profil adenokarcinoma pluća	28
1.14. Prognostički i prediktivni faktori u adenokarcinomu pluća	29
1.15. Molekularna testiranja u tretmanu karcinoma pluća	30
1.16. Genska osnova ciljne terapije u nemikrocelularnom karcinomu pluća	32
1.17. Korišćenje biopsijskih i citoloških uzoraka u molekularnom testiranju karcinoma pluća	33
1.17.1. EGFR testiranje u karcinomu pluća.....	34
1.17.2. EGFR testiranje na tkivnim uzorcima tumora	35
1.17.3. EGFR testiranje na citološkim uzorcima tumora.....	36
1.18. Mutacije EGFR u pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća	37
1.18.1. Terapijski značaj EGFR mutacija	37
1.18.2. Stečena rezistencija na EGFR inhibitore	38
2. ISPITANICI I METODE.....	40
3. HIPOTEZA.....	44
4. CILJEVI.....	44
5. REZULTATI	45

5.1.	Analiza pacijenata u odnosu na dob	45
5.2.	Analiza pacijenata u odnosu na pol.....	46
5.3.	Analiza pacijenata u odnosu na zdravstvenu ustanovu u kojoj je uzet uzorak	46
5.4.	Analiza pacijenata u odnosu na godinu u kojoj je rađena analiza.....	47
5.5.	Analiza pacijenata u odnosu na histološki gradus tumora	48
5.6.	Analiza pacijenata u odnosu na vrstu analiziranog materijala.	49
5.7.	Analiza prisustva i tipa molekularnih promjena u EGFR genu u uzorcima nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom.....	50
5.8.	Analiza uticaja pola i dobi pacijenata na prisustvo i tip promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom.	51
5.9.	Analiza uticaja vrste uzorka (citološki, bioptički uzorci, metastaze i resekcioni uzorci) na prisustvo promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom	55
5.10.	Analiza uticaja kvaliteta i kvantiteta (količina DNK) na prisustvo i tip promjena u EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom	57
5.11.	Analiza uticaja postupanja sa uzorkom u različitim zdravstvenim ustanovama na prisustvo promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom.....	59
6.	DISKUSIJA	61
7.	ZAKLJUČCI	66
8.	LITERATURA	68

SAŽETAK

Uvod. Karcinom pluća je vodeći uzrok smrti u svijetu, a od svih tipova karcinoma pluća, najzastupljeniji je non-small cell lung cancer (NSCLC), koga nalazimo kod oko 80% oboljelih. Identifikacija mutacija epidermalnog faktora rasta u NSCLC, utrla je put personalizovanoj terapiji kod karcinoma pluća sa inhibitorima EGFR-tirozin kinaze (TKIs). Molekularnim testiranjem je omogućen pravilan izbor pacijenata kojima je time pružena mogućnost za ciljanu terapiju. **Cilj istraživanja** je da se utvrde faktori koji mogu uticati na rezultate molekularnih testiranja prisustva promjena na EGFR genu: utvrditi prisustvo i tip molekularnih promjena na EGFR genu, uticaj pola i dobi pacijenata na prisustvo i tip promjena na EGFR genu, te uticaj vrste uzorka (citološki, sitni bioptički uzorci i resekcioni uzorci) na prisustvo i tip promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom; **Ispitanici i metode.** Ispitivanje je koncipirano kao studija retrospektivno-prospektivnog karaktera. Utvrđivanje promjene na EGFR genu je rađeno na 299 uzoraka pacijenata, oboljelih od karcinoma pluća u periodu od 2013. do 2018. godine. Pacijenti su podijeljeni u grupe s obzirom na vrstu materijala na kojem je utvrđena dijagnoza i na kojem su se radila molekularna testiranja. Prvu grupu čine uzorci pacijenata kod kojih je materijal za analizu dobijen hirurškom resekcijom tumora pluća; drugu grupu čine pacijenti kod kojih je uzorkovana metastatska promjena, treću grupu uzorci dobijeni biopsijom i četvrtu grupu čine citološki uzorci dobijeni tokom različitih intervencija (sputum, lavaža bronha itd.). Podaci su analizirani i predstavljeni korišćenjem deskriptivne statistike i primjenom adekvatnih statističkih testova analitičko-statističkog softverskog paketa SPSS (Statistical Product and Service Solutions), verzija 20. **Rezultati** Kod od 89,3% ispitivanih uzoraka nisu detektovane promjene u EGFR genu. Kod 10 % slučajeva uzoraka je detektovana neka od promjena u EGFR genu, dok je kod 0.7% uzoraka reakcija bila nevažeca. Najčešći tip genetski promjena u EGFR genu u istraživanju je bila delecija u 43,3% slučajeva i mutacija L858R u 40% slučajeva. Genetske promjene na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom se statistički značajno češće sreću kod žena ($\chi^2 = 11.492$, $p = 0.001$); Najveći broj detektovanih genetskih promjena u EGFR genu je bio u sitnim bioptičkim materijalima 46,7% i resekatima pluća u 43,3% slučajeva. Statistički značajna razlika nije utvrđena u pogledu prisustva ili odsustva promjena u EGFR genu s obzirom na vrstu uzorka (biopsija, resekcija, metastaza i citološki uzorci). **Ključne riječi:** adenokarcinom pluća, EGFR mutacije, biopsija, citologija.

EXECUTIVE SUMMARY

Introduction. Lung cancer is a leading cause of death worldwide, and the most prevalent of all types of lung cancers is the non-small cell lung cancer (NSCLC), found in about 80% of patients. Identification of epidermal growth factor mutations in NSCLC paved the way for personalized therapy for lung cancer with EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Molecular testing has made it possible to make the right choice for patients who are given the opportunity for targeted therapy. **The objective of the research** is to determine the factors that can influence the results of molecular testing of the presence of EGFR gene changes: to determine the presence and type of molecular changes on the EGFR gene, the influence of patient sex and age on the presence and type of changes on the EGFR gene, and the influence of the type of sample (cytological, small biopsy specimens and resection specimens) on the presence and type of changes on the EGFR gene in patients with non-microcellular carcinoma with adenodifferentiation.

Respondents and methods. The examination was conceived as a retrospective-prospective study. Determination of the change on the EGFR gene was performed on 299 lung cancer patient specimens dating from 2013 to 2018. Patients were divided into groups depending on the type of material subject to diagnosis and the molecular testing. The first group consists of patient testing specimens obtained by surgical resection of the lung tumour; the second group consists of patients with whom is sampled metastatic change; the third group contains biopsy specimens and the fourth group consists of cytological specimens obtained during various interventions (sputum, bronchial lavage, etc.). Data were analysed and presented by using descriptive statistics and the use of adequate statistical tests of the Statistical Product and Service Solutions (SPSS) analytical software package, version 20. **Results.** No changes in the EGFR gene were detected in 89.3% of the tested specimens. Some changes in the EGFR gene were detected in 10% of the specimens, while in 0.7% of the specimen the reaction was invalid. The study showed that the most common type of genetic alterations in the EGFR gene included deletion in 43.3% of the cases and the L858R mutation in 40% of the cases. EGFR gene changes in patients suffering from non-microcellular carcinoma with adenodifferentiation were statistically significantly more frequent in women ($\chi^2 = 11,492$, $p = 0,001$); The biggest number of detected EGFR gene changes was found in the small biopsy specimens in 46.7% and lung resections in 43.3% of cases. No statistically significant difference was found in respect of the presence or absence of

changes in the EGFR gene based on the type of specimen (biopsy, resection, metastasis and cytological specimens). **Key words: lung adenocarcinoma, EGFR mutations, biopsy, cytology.**

1.UVOD

1.1. Epidemiologija i etiologija tumora pluća

Rak pluća je vodeći uzrok smrti od raka širom svijeta, kod oba pola. Svake godine, karcinom pluća izaziva više smrtnih slučajeva od raka dojke, kolona i prostate u kombinaciji [1,2]. Po izvještaju Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2012.godine, dijagnostikovano je više od 1,8 miliona oboljelih od karcinoma pluća, od kojih je 1,5 miliona smrtnih slučajeva. U poređenju sa ukupnom stopom smrtnosti od karcinoma, koja iznosi 19,4%, opet je broj jedan među svim neoplazmama [3]. Učestalost ovog karcinoma je izraženija u razvijenim zemljama, zbog izloženosti duvanskom dimu. Područja sa najvećom incidencijom i mortalitetom, kad su u pitanju muškarci, su Istočna Evropa, Sjeverna Amerika, Australija/Novi Zeland, Južna Amerika, a najniža stopa je u Južnoj Aziji i subsaharskoj Africi. Kod žena je taj geografski obrazac drugačiji, te je najveća incidencija u Sjevernoj Americi i Sjeverozapadnoj Evropi, a umjerena u Australiji, Novom Zelandu i Kini [4].

Dok je kod drugih maligniteta postignut određen napredak u stopi preživljavanja, kod pluća je to još uvijek zanemarljiva brojka. Od 1985.godine je evidentirana učestalost karcinoma pluća u svijetu za čak 51% i to porast od 44% kod muškaraca i 76% kod žena. Karcinom pluća je i u vrhu liste godišnjeg mortaliteta. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), smrtni slučajevi kao posljedica karcinoma pluća, širom svijeta će nastaviti rasti. Kao glavni faktor rizika se navodi globalno povećanje upotrebe duhana. Iako se širom svijeta ulažu ogromni naponi da se suzbije pušenje, procjena je da će trenutna brojka od 1,1 milijardu pušača do 2025. godine dostići nevjerovatnih 1,9 milijardi [5].

Vezu između pušenja i povećanog rizika od prerane smrti, studijom je dokazao Pearl, još 1938. godine [6]. Od tada su mnoge, nekontrolisane i kontrolisane studije, dokazale ulogu duvanskog dima kao uzročnika karcinoma pluća. U jednoj od većih epidemioloških studija, u Velikoj Britaniji 1950. godine, Doll i Hill su opisali uzročnu vezu karcinoma pluća i pušenja cigareta, kao i količine konzumiranih cigareta i razvoja karcinoma [7]. U drugoj takvoj studiji, iste godine u Sjedinjenim Američki Državama, Vinder i Graham su došli do zaključka da su količina

cigareta, kao i dužina konzumiranja važan faktor nastanka karcinoma pluća, te da može da postoji period od 10 godina od prestanka pušenja do kliničkih simptoma karcinoma. Tada je karcinom pluća kod nepušača bio rijedak, ali to se kasnije promijenilo. Takođe, bio je mnogo češći kod muškaraca nego kod žena [5,8]. Zbog progresivnog prelaska upotrebe duvana iz razvijenih zemalja u one manje razvijene, očekuje se povećanje broja oboljelih od karcinoma pluća. Tome ujedno doprinose i rastuća prevalenca gojaznosti, sjedeći način života, izmijenjene prehrambene navike i izmijenjeni obrasci reprodukcije [9]. Prehrambene navike se razlikuju kod pušača i nepušača, te pušači unose više masti i zasićenih masnih kiselina u odnosu na voće i povrće [10]. Pozitivan učinak, te značajno smanjen rizik za nastanak karcinoma pluća kod pušača, kao i kod bivših pušača ima ishrana bogata α -karotenom, β -karotenom, folatima, vitaminima (C, E, B2, B6 i B12), te likopenom [11].

U tabeli 1. su prikazani faktori rizika za karcinom pluća.

Tabela 1. Faktori rizika za nastanak karcinoma pluća [2]

Faktor rizika za karcinom pluća		Zaštitni	Faktor rizika	Kontroverza
Pušenje	Cigarete		*	
	Lula		*	
	Cigare		*	
	Cigarilosi		*	
	Nargila		*	
	Marihuana			*
Dijeta i alkohol	Beta Karoten		*	
	Arsen		*	
	Voće, povrće i mikronutrijenti	*		
Alkohol				*
Profesionalna oboljenja		*		
Plućna oboljenja	HOBP *			*
	TB *	*		
	Astma	*		
Zračenje	Radioterapija grudnog koša		*	
	Niska radijacija			*
Zagađenje vazduha			*	
Nizak socio-ekonomski status			*	
Porodična istorija	Astma		*	
	TB		*	
Pol	Muški	*		
	Ženski		*	
Etnička pripadnost	Crnac		*	
	Bijelac	*		
	Crnkinja	*		
	Bjelkinja		*	

*HOBP- hronična opstruktivna bolest pluća, TB – tuberkuloza

1.2. Klinička slika

U većini slučajeva, karcinom pluća je asimptomatski u ranim fazama. Razlog nalazimo u tome što plućni parenhim ne posjeduje receptore za bol, te tumor može dostići značajnu veličinu do pojave prvih izraženih simptoma. Bolest se u asimptomatskoj fazi obično pronađe slučajno, tokom radiografije pluća u sklopu preoperativne pripreme ili dužih medicinskih ispitivanja kod nekarakterističnih simptoma bolesti [12,13] . Najčešći simptomi karcinoma pluća su:

- kašalj koji ne prolazi ili se pogoršava
- iskašljavanje krvi ili ispljuvak boje rđe
- bol u grudima koja se često pojačava prilikom dubljeg disanja, kašljanja, smijanja
- promuklost
- oslabljen apetit i gubitak na težini
- kratak dah
- brzo umaranje i osjećaj slabosti
- ponovljene ili teško izlječive epizode bronhitisa i pneumonije
- ponovljene epizode weezing-a

Neki karcinomi pluća mogu izazvati sindrome sa izraženim specifičnim simptomima. U vezi su sa lokalizacijom samog tumora [12]. Takođe, razlika u izraženim simptomima se uočava i kod različitih tipova karcinoma pluća. Tako je adenokarcinom najčešće asimptomatski i otkriva se slučajno, dok kod sitnoćelijskih tipova karcinoma pluća (engl. *small cell lung cancer*- SCLC) često nalazimo simptome koji ukazuju na udaljene metastaze [4] . Najčešći simptomi na koje nailazimo kod primarnog tumora su nelagodnost ili bol u grudima, kašalj, dispneja i hemoptizija. Nelagodnost ili bol u grudima je simptom koji opisuju pacijenti i prije nego što postoji invazija u pleuru, grudni koš ili medijastinum. Nejasnog je porijekla s obzirom da plućni parenhim nije snabdjeven receptorima za bol. Pacijenti je opisuju kao nedefinisanu, različitog intenziteta.

Kašalj nije nespecifičan simptom. U zavisnosti od lokalizacije, može ga proizvesti i mali tumor koji djeluje kao strano tijelo i ometa bronhijalnu peristaltiku. Suprotno tome, periferni tumori

koji nastaju iz manjih bronhija i bronhiola, mogu dostići veće dimenzije bez prisustva kašlja kao simptoma. Kašalj je često produktivni, sa različitim ispljuvkom, naročito kod pušača. Izuzetak je neproduktivan kašalj koji nastaje kao posljedica invazije na karinu [13].

Dispneja se javlja kod do 60 posto bolesnika, a može je uzrokovati tumor koji zakrči disajne puteve [14]. U uskoj vezi je sa povećanim kašljem i količinom ispljuvka, kao i sa pušenjem.

Hemoptiza je čest simptom bolesnika s karcinomom pluća. Rijetko je obilna i obično se sastoji samo od tragova krvi u sputumu. Najčešće sumnju pobudi iskašljavanje krvi nekoliko dana zaredom.

Iako su to nekarakteristični simptomi, koje nalazimo i kod benignih oboljenja pluća kao što je akutni bronhitis, na karcinom pluća treba posumnjati ako se te epizode ponavljaju ili ne reaguju na ordiniranu terapiju. Navedena sumnja se takođe odnosi na pacijente starije od 40 godina, pušače, koji imaju u anamnezi hroničnu opstruktivnu bolest pluća (HOBP)[14,15]. Posebnu pažnju treba posvetiti pacijentima sa hemoptizom kod kojih je negativan rentgentski snimak pluća. Negativan rentgen može značiti da pacijent ima benigni uzrok krvarenja, ali isto tako je moguće da se radi o malom ili centralno smještenom tumoru, koga skriva medijastinum [16].

1.3. Paraneoplastični sindromi u karcinomu pluća

Sistemske simptome, povezane sa paraneoplastičnim sindromom, razvije otprilike 10 % bolesnika. Tačan mehanizam nastanka paraneoplastičnog sindroma nije u potpunosti razumljiv u svim slučajevima. Sindrom je uzrokovan oslobađanjem bioaktivnih tvari koje proizvodi sam tumor ili nastaju kao odgovor na prisustvo tumora. Ponekad simptomi paraneoplastičnog sindroma budu i prvi znaci bolesti, te prethode samoj dijagnozi. U drugim slučajevima, mogu se pojaviti u kasnoj fazi bolesti ili kao prvi znak recidiva. Iako je širok spektar paraneoplastičnih sindroma, povezanih sa karcinomom pluća, najčešće je riječ o neurološkim, endokrinim i skeletnim poremećajima. Svi simptomi paraneoplastičnog sindroma, prikazani su u tabeli 2 [14,15].

Tabela 2. Paraneoplastični sindromi povezani sa karcinomom pluća

Endokrini sindromi	Neurološki sindromi
SIADH produkcija Nemetastatska hiperkalcijemija Kušingov sindrom Ginekomastija Hiperkalcitonemija Povišen nivo LSH i FSH Hipoglikemija Hipertireoza Karcinoid sindrom	Subakutna senzorna neuropatija Mononeuritis multipleks Crijevna pseudo-opstrukcija LEMS Encefalomyelitis Nekrotizirajuća mijelopatija Retinopatija povezana sa karcinomom
Skeletni sindromi	Bubrežni sindromi
Hipertrofična osteoartropatija Batičasti prsti	Glomerulonefritis Nefrotski sindrom
Metabolički sindromi	Sistemički sindromi
Laktacidoza Hipourikemija	Anoreksija i kaheksija Groznica
Kolagen-vaskularni sindromi	Kožni
Dermatomiozitis Polimiozitis Vaskulitis Sistemički lupus eritematosus	Stečena hipertrihosa langvinoza Eritema gyratum repens Eritema multiforme Tilosis Eritroderma Eksfolijativni dermatitis Akantosis nigrikans Sweet sindrom Pruritus i urtikarija
Hematološki	Koagulopatije
Anemija Leukocitoza i eozinofilija Leukemoidne reakcije Trombocitoza Trombocitopenična purpura	Tromboflebitis Diseminovana intravaskularna koagulacija
* Sindrom neprikladnog antidiuretskog hormona (engl. <i>syndrome of inappropriate antidiuretic hormone</i>-SIADH); Lambert Eaton mijastenični sindrom(engl. <i>Lambert-Eaton myasthenic syndrome</i>- LEMS); lutein stimulirajući hormon (engl. <i>lutein-stimulating hormone</i>-LSH); folikulostimulirajući hormon (engl. <i>follicle-stimulating hormone</i>-FSH).	

Dijagnoza neurološkog paraneoplastičnog sindroma se postavlja kada drugi uzroci, poput neravnoteže elektrolita, metastatske bolesti, cerebralne i vaskularne bolesti, te infekcije, budu isključeni. Neurološki sindrom uključuje: Lambert-Eatonov mijastenični sindrom (LEMS), limbičku encefalopatiju, polineuropatiju, degeneraciju cerebelarnog sistema, retinopatiju, opsoklonus-mioklonus i autonomnu neuropatiju. U LEMS-u koji je najviše prepoznati od ovih poremećaja, kod pacijenata je prisutna slabost proksimalnog dijela donjeg ekstremiteta dok je slabost proksimalnog gornjeg ekstremiteta obično manje uočljiva. Simptomi sindroma mogu biti više izraženi ujutro i poboljšavati se tokom dana.

Iako je zahvatanje ekstraokularnih mišića neuobičajeno, ptoza se često nalazi. Paraneoplastični neurološki sindromi povezani su gotovo isključivo sa sitnoćelijskim karcinomom pluća [15].

U sklopu endokrinog paraneoplastičnog sindroma, nailazimo na povišene vrijednosti pojedinih hormona, te poremećaj ravnoteže vode i elektrolita. Kod sitnoćelijskog karcinoma pluća, zbog ektopičnog stvaranja adrenokortikotropnog hormona (engl. *Adrenocorticotropic hormone*-ACTH) nailazimo na pojavu Kušingovog sindroma (slabost, gubitak mišića, pospanost, zbunjenost, moguća psihoza, ovisan edem, hipokalijemička alkalozna, hiperglikemiju i „lice poput mjeseca“). Skvamocelularni karcinom je povezan sa hiperkalcijemijom, koja najčešće nastaje humoralnim mehanizmom, mada uzrok mogu biti i koštane metastaze.

Od skeletnih promjena izdvaja se pojava „batičastih prsta“, kao uvećanje terminalnih segmenata prstiju na rukama ili nogama, koje nastaje zbog proliferacije vezivnog tkiva ispod nokta. Drugi simptom vezan za skeletne promjene je sistemski poremećaj, hipertrofična osteoartropatija (HOA). Obilježava je bolna simetrična artropatija, gležnjeva, koljena, zapešća, te periostalno stvaranje novih kostiju u udaljenim dugim kostima ekstremiteta. Skeletne promjene su najčešće povezane sa adenokarcinomom, rjeđe sa sitnoćelijskim karcinomom pluća. Tačan mehanizam nije poznat, ali se u novije vrijeme povezuje sa prekomjernom ekspresijom vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*-VEGF) [15,17].

1.4. Širenje tumora pluća

Karcinom pluća može da se širi intratorakalno i to direktnim širenjem i putem limfe ili ekstratorakalno, dajući udaljene metastaze, najčešće u jetru, nadbubrežne žlijezde, intraabdominalne limfne čvorove, te mozak i kičmenu moždinu, limfne čvorove i kožu.

- a) Intratorakalno širenje karcinoma pluća daje niz simptoma i znakova u zavisnosti od zahvaćenih struktura:
- Povratna paraliza laringealnog nerva je češća kod lijevo lokalizovanih tumora, zbog putanje samog laringealnog živca oko luka aorte što uzrokuje promuklost.
 - Paraliza freničnog nerva se može uočiti i na rendgenskom snimku pluća, gdje se uočava podignuta dijafragma i paradoksalno disanje.
 - Hornerov sindrom (jednostrani enoftalmus, ptosis, male zjenice i ipsilateralni izostanak znojenja lica).
 - Pancoast tumor, naziva se i superiorni tumor sulcusa, a nastaje posteriorno u vrhu gornjeg reznja u blizini brahijalnog plexusa, obično infiltrirajući korijene sedmog vratnog i prvog i drugog torakalnog živca. To uzrokuje bol u ramenu sa širenjem niz ulnarni dio ruke [17].
 - Sindrom šuplje vene (engl- *Syndrome vene cave-SVC*) nalazimo kod više od polovine pacijenata sa karcinomom pluća i to najčešće kod sitnoćelijskog tipa. Usljed direktne invazije primarnim tumorom ili uvećanja desnih paratrahealnih limfnih čvorova, pacijent se žali na oticanje lica, uključujući i vrat i vjeđe. Vidljive su i proširene vene preko gornjeg dijela trupa, ramena i ruku. Mogu biti prisutni glavobolja, vrtoglavica, posebno priikom saginjanja, te pospanost, zamagljen vid, kašalj i disfagija [18].
 - Zbog zahvaćenosti zidova grudnog koša, više od 50% pacijenata sa karcinomom pluća se žali na bolove u prsima, koje opisuju kao prigušene i uporne. Kao posljedica masivnog zahvatanja hilarnih i mediastinalnih limfnih čvorova, javlja se retrosternalna bol. Na invaziju pleure i zida grudnog koša, te metastaze rebara, obično ukazuje jako izražena bol.
 - Bol zbog zahvatanja pleure može nestati s pojavom pleuralnog izliva. Znak pleuralnog izliva je tup zvuk prilikom perkusije i oslabljen disajni šum.
 - Metastaze u srce i perikard obično nastaju širenjem limfnim putem [17].

- b) Ekstratorakalno širenje karcinoma pluća je najčešće na mozak, nadbubreg i kosti. Najčešća mjesta koštanih metastaza su kičma, karlica i butna kost. Udaljene metastaze u koljeno i lakat su rijetke, zbog smanjene vaskularnosti [19].
- Pluća su primarno mjesto oko 70% karcinoma koji se prvobitno pojavljuju sa metastazama na mozgu. Metastaze na kičmenoj moždini se javljaju rjeđe i to kod bolesnika s cerebralnim metastazama. Kod pojave moždanih metastaza može se javiti glavobolja, mučnina i povraćanje, te žarišni neurološki simptomi ili znaci, napadi, zbunjenost i promjene ličnosti.
 - Najčešće metastaze koje se javljaju kao posljedica karcinoma pluća su jetrene metastaze, koje daju simptome slabosti i gubitka težine i znak su loše prognoze. Kod sitnoćelijskog karcinoma se mogu javiti metastaze nadbubrega i aortalnih limfnih čvorova.
 - Karcinom pluća je prisutan kod četvrtine pacijenata sa ovim karcinomom. Može metastazirati gotovo na svaku kost, najčešće na proksimalne duge kosti i aksijalni skelet [17].

1.5. Radiološke karakteristike karcinoma pluća

Radiografija grudnog koša je uobičajena, polazna radiološka pretraga u pulmologiji. Iako se velika većina primarnih karcinoma pluća otkriva upravo ovom tehnikom, postoje slučajevi kada je radiološki nalaz uredan, a daljim dijagnostičkim procedurama, zbog postojanja upornih simptoma, utvrdi se suprotno. Isto tako, radiografija grudnog koša je dovoljan postupak kada je bolest u pođmakloj fazi, kada već postoje metastatske lezije kosti ili uvećani kontralateralni medijastinalni limfni čvorovi (slika 1). Nasuprot tome, za otkrivanje metastaza medijastinalnih limfnih čvorova i zida grudnog koša, kao i medijastinalne invazije, radiografija grudnog koša je nedovoljno osjetljiva metoda [20].



Slika 1. Primarni karcinom pluća

Rendgenski snimak grudnog koša pokazuje nesitnoćelijski karcinom pluća lijevog gornjeg režnja s medijastinalnom i lijevom hilarnom adenopatijom. Primarni tumor je kavitaliziran i uočljivo je prisustvo vazduha i slobodne tečnosti. *Image courtesy of Anne S. Tsao, MD.*

Kompjuterizovana tomografija (engl. *Computed tomography*-CT) grudnog koša je takođe standardizovana metoda u savremenoj dijagnostici oboljenja respiratornog trakta. Veoma je korisna za pružanje anatomskih detalja koji bolje definišu mjesto tumora, njegovu blizinu lokalnim strukturama, kao i eventualno uvećanje medijastinalnih limfnih čvorova [21]. CT ima ograničenu korist u otkrivanju zahvaćenosti zida grudnog i invaziji parijetalne pleure. Takve lezije su klasifikovane kao T3 lezije i mogu se resekirati, stoga imaju veliki klinički značaj [20]. Za razliku od radiografije, CT može otkriti većinu tumora manjih od 2 cm i pogodan je za otkrivanje nesitnoćelijskih tumora pluća [22]. Zbog svoje široke dostupnosti, primarni je i najčešće korišćeni modalitet za ranu dijagnozu bolesnika s karcinomom pluća na osnovu morfoloških kriterijuma.

Magnetna rezonanca (engl. *Magnetic Resonance Imaging* - MRI) je, zbog svoje multiplanarne sposobnosti, superiorna u odnosu na CT u slučaju utvrđivanja proširenja tumora na zid grudnog

koša, medijastinuma, te zahvatanja kičmenih pršljenova i brahijalnog pleksusa. Njen značaj se ogleda i u razlikovanju metastaze nadbubrežne žlijezde od adenoma nadbubrega, kao i kod sumnje na zahvaćenost endokranijuma malignim procesom [23].

Kao neinvazivna dijagnostička metoda se u novije vrijeme koristi pozitron-emisiona tomografija (engl. *positron emission tomography*-PET), koja se zasniva na biološkoj aktivnosti malignih ćelija. Njena korist se ogleda u dijagnostikovanju, planiranju liječenja i procjeni terapijskog odgovora [24]. Glavni nedostatak PET-a su lažno pozitivni rezultati koji mogu da se pokažu kod postojanja infekcije, hiperplazije, sarkoidoze, kao i relativno visoki troškovi svakog ispitivanja.

Postoje određene radiološke karakteristike prema kojima možemo pretpostaviti o kojem histološkom tipu plućnog karcinoma se radi. Adenokarcinomi su obično smješteni periferno, za razliku od karcinoida koji su locirani centralno. Na CT-u se, kod adenokarcinoma, uočava masa koja podsjeća na neprozirno mliječno staklo i sporijeg je rasta, promjera manjeg od 4 cm ili čvrsta masa koja ima tendenciju bržeg rasta. Adenoskvamozni karcinom se najčešće javlja kao solitarni, periferni čvor, promjera 1-3 cm. U polovini slučajeva se uočava prisustvo fibroze ili parenhimskog ožiljka. Skvamocelularni karcinomi su centralno lokalizivani, promjera većeg od 4 cm i sa prisutnom kavitacijom. Za sitnoćelijski karcinom (SCLC) je karakteristična masa u hilumu ili u njegovoj okolini, sa invazijom medijastinuma, dok se krupnoćelijski karcinom prepoznaje po izuzetno brzom rastu i ranim metastaziranjem u medijastinum i mozak [25].

1.6. Histološka klasifikacija tumora pluća

Zbog izuzetnih napredaka u genetici i terapiji karcinoma pluća u toku protekle decenije, postoje značajne promjene u klasifikaciji tumora Svjetske zdravstvene organizacije, SZO (engl. *World Health Organization, WHO*) iz 2004. godine. U poređenju sa tom klasifikacijom, postoje brojne i značajne promjene kod karcinoma pluća, od kojih većina prati klasifikaciju adenokarcinoma pluća iz 2011. koju je predložila Međunarodna asocijacija za proučavanje karcinoma pluća (engl. *International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC*), Američkog torakalnog društva (engl. *American Thoracic Society, ATS*) i Evropskog respiratornog udruženja (*European Respiratory Society, ERS*), koja je u suštini usvojena samo sa minimalnim promjenama i postala je sastavni dio klasifikacije karcinoma pluća iz 2015. godine [26].

Klasifikacija tumora pluća prema WHO iz 2015.godine

1. EPITELNI TUMORI

Adenokarcinomi:

- Lepidični adenokarcinom
- Acinarni adenokarcinom
- Papilarni adenokarcinom
- Mikropapilarni adenokarcinom
- Solidni adenokarcinom
- Invazivni mucinozni adenokarcinom
 - Miješani invazivni mucinozni i nemucinozni adenokarcinom
- Koloidni adenokarcinom
- Fetalni adenokarcinom
- Enterični adenokarcinom
- Minimalno invazivni adenokarcinom
 - Mucinozni
 - Nemucinozni
- Preinvazivne lezije
 - Atipična adenomatozna hiperplazija
 - Adenokarcinoma in situ
 - Mucinozni
 - Nemucinozni

Skvamozni karcinomi:

- Keratinizirajući skvamozni karcinom
- Nekeratinizirajući skvamozni karcinom
- Bazaloidni skvamozni karcinom
- Preinvazivne lezije
 - Skvamozni karcinom in situ

Neuroendokrini tumori:

- Mikrocelularni karcinom
 - Kombinovani mikrocelularni karcinom
- Krupnoćelijski neuroendokrini karcinom
 - Kombinovani krupnoćelijski neuroendokrini karcinom
- Karcinoidi
 - Tipični
 - Atipični
- Preinvazivne lezije
 - Difuzna idiopatska plućna neuroendokrina hiperplazija

Krupnoćelijski karcinom**Adenoskvamozni karcinom****Pleomorfni karcinom****Vretenastoćelijski karcinom****Gigantocelularni karcinom****Karcinosarkom****Pulmonarni blastom****Drugi i neklasifikovani karcinomi:**

- Limfoepitelioma like karcinom
- NUT karcinom

Tumori tipa pljuvačnih žlijezda:

- Mukoepidermoidni karcinom
- Adenoid cistični karcinom
- Epitelijalni-mioepitelijalni karcinom
- Pleomorfni adenom

Papilomi:

- Skvamozni papilom
 - Egzofitni
 - Inveterirani
- Glandularni papilom

- Miješani skvamozni i glandularni papilom

Adenomi:

- Sklerozirajući pneumocitom
- Alveolarni adenom
- Papilarni adenom
- Mucinozni adenom
- Adenom tipa pljuvačnih žlijezda

2. MEZENHIMALNI TUMORI

Pulmonarni hamartom

Hondrom

PEComatozni tumori

- Limfangioleiomyomatosis
- Benigni PECom
 - Svjetloćelijski tumor
- Maligni PECom

Kongenitalni peribronhijalni miofibroblastični tumor

Difuzna pulmonarna limfangiomatoza

Inflamatorni miofibroblastični tumor

Epiteloidni hemangioendoteliom

Pleuropulmonarni blastom

Sinovijalni sarkom

Sarkom plućne arterije

Pulmonarni miksoidni sarkom sa EWSR1-CREB1 translokacijom

Mioepitelijalni tumori:

- *Mioepitelioma*
- Mioepitelijalni karcinom

3. LIMFOHISTIOCITNI TUMORI

Ekstranodalni B ćelijski limfom marginalne zone MALT porijekla

Difuzni krupnoćelijski B limfom

Limfomatoidna granulomatoza

Intravaskularni krupnoćelijski B limfom

Pulmonarna Langerhans ćelijska histiocitoza

Erdheim-Chester-ova bolest

4. TUMORI EKTOPIČNOG PORIJEKLA

Germinativni ćelijski tumori

- Zreli teratom
- Nezreli teratom

Intrapulmonalni timom

Melanom

Meningeom, NOS

5. METASTATSKI TUMORI

Veliki napredak u dijagnozi i liječenju karcinoma pluća, u protekloj deceniji, kada se terapijski protokoli zasnivaju na specifičnim histološkim i genetskim karakteristikama tumora pacijenata, daju novu važnost u definitivnoj histološkoj i genetskoj klasifikaciji karcinoma pluća. Pored prethodnog, prognostički značajnog diferenciranja dvije grupe karcinoma pluća na sitnoćelijski i nesitnoćelijski karcinom, napredak u razumijevanju molekularnog mehanizma nastanka i progresije tumora obavezao je dalju preciznu klasifikaciju nesitnoćelijskog karcinoma pluća (engl. *non-small cell lung cancer, NSCLC*) u specifične patološke podtipove (npr. adenokarcinom u odnosu na skvamozni kacinom). Definitivna diferencijacija nemikrocelularnog karcinoma na adenokarcinom i non-adenokarcinom ima prije svega terapijski i prognostički značaj [26].

1.7. Stadiranje tumora pluća

Za stadiranje tumora pluća se koristi TNM (*tumor, nodus, metastaze*) klasifikacija, koju su odobrili Američki komitet za karcinom (engl. *American Joint Committee for Cancer-AJCC*) i Internacionalno udruženje protiv karcinoma (engl. *Union Internationale Contre le Cancer-UICC*) [27,28]. Klasifikacija je, od svog prvog izdanja, napretkom i novim saznanjima, doživjela nekoliko revizija, za šta je prije svega zaslužno Međunarodno udruženje za proučavanje karcinoma pluća (engl. *International Association for the Study of Lung Cancer-IASLC*). Revidirano izdanje priručnika AJCC-a (8. izdanje) objavljeno je krajem 2016. godine i na snazi je za sve slučajeve karcinoma pluća zabilježene 1. januara 2018. godine ili poslije [27,28]. Osnovni zadatak TNM klasifikacije je pomoć kliničarima u planiranju liječenja, te olakšan put razmjene informacija među raznim centrima. Sam TNM sistem, zapravo opisuje veličinu i stepen lokoregionalne invazije primarnim tumorom (T) (tabela 3), obim zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N), te prisustvo ili odsustvo intratorakalnih ili udaljenih metastaza (M) [29,30].

Tabela 3. TNM klasifikacija [30]

T		Primarni tumor
TX		Primarni tumor se ne može procijeniti ili se tumor dokaže prisustvom malignih ćelija u sputum, ali se ne može vizualizirati radiološkim pregledom ni bronhoskopijom
T0		Ne postoji dokaz o primarnom tumoru
Tis		<i>Carcinoma in situ</i> Squamous cell carcinoma <i>in situ</i> (SCIS) Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS): adenokarcinom čisto lipidnog izgleda, najvećeg promjera do 3 cm
T1		Tumor od 3cm ili manjih dimenzija, obuhvaćen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopske potvrde o invaziji proksimalno od lobarnog bronha (tj. ne u glavnom bronhu)
	T1mi	Minimalno invazivni adenokarcinom: adenokarcinom (najveća dimenzija ≤ 3 cm) sa pretežno lepidnim uzorkom i invazijom ≤ 5 mm u najvećoj dimenziji
	T1a	Tumor ≤ 1 cm u najvećoj dimenziji. Površinski šireći tumor bilo koje veličine čija je invazivna komponenta ograničena na bronhijalni zid i može se prostirati proksimalno do glavnog bronha takođe je klasifikovan kao T1a, ali su ovi tumori rijetki.
	T1b	Tumor veličine od 1 do 2 cm
	T1c	Tumor veličine od 2 do 3 cm
T2		Tumor sa bilo kojom pratećom karakteristikom za veličinu ili proširenost: · Tumori veličine između 3- 5cm, · smješteni u glavnom bronhu, distalno od glavne karine 2 cm i više · koji zahvataju visceralnu pleuru, udruženi sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi do hilusa, ali ne zahvata cijelo plućno krilo
	T2a	Tumor od 3 do 4 cm
	T2b	Tumor od 4 do 5 cm
T3		Tumor veličine od 5 do 7 cm ili koji zahvata grudni zid (uključujući <i>sulcus superior</i> tumore), dijafragmu, medijastinalnu pleuru, parijetalni perikard; ili tumori koji daju satelitske noduse u istom plućnom lobusu
T4		Tumor veći od 7 cm ili tumor bilo koje veličine, a koji zahvata: dijafragmu, medijastinum, srce, velike krne sudove, traheju, rekurentni nerv, jednjak, kičmene pršljenove, karinu, te kod kojeg nalazimo pojedinačne tumorske čvorove u ipsilateralnom režnju.

N	Regionalni limfni čvorovi
NX	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaze u istostranim peribronhijalnim i/ili istostranim hilarnim čvorovima i intrapulmonalni čvorovi zahvaćeni direktnom invazijom primarnog tumora
N2	Metastaze u istostranim medijastinalnim i/ili subkarinalnim limfnim čvorovima
N3	Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim, kontralateralnim hilarnim limfnim čvorovima, istostranim ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima

M		Udaljene metastaze
MX		Udaljene metastaze se ne mogu procijeniti
M0		Bez udaljenih metastaza
M1		Postoje udaljene metastaze
	M1a	Odvojeni tumorski čvorovi u kontralateralnom režnju; tumor sa pleuralnim ili perikardnim čvorovima ili malignim pleuralnim ili perikardnim izlivom
	M1b	Pojedinačne ekstratorakalne metastaze u jednom organu (uključujući postojanje jednog neregionalnog čvora)
	M1c	Višestruke ekstratorakalne metastaze u jednom ili više organa

1.8. Lokalizacija tumora pluća

U zavisnosti od lokalizacije, karcinomi pluća se dijele na centralne, intermedijarne, periferne i paracentralne. Centralni vode porijeklo iz glavnog ili lobarnog bronha, te stoga daju opstruktivne smetnje i dovode do pneumonije, bronhiektazija i atelektaze. Periferni su porijeklom iz bronha od pete generacije grananja pa nadalje, a intermedijarni iz segmentalnog ili subsegmentalnog bronha. Paracentralni su lokalizacijski, svojim rastom u blizini hilusa, a porijeklom su iz sitnijeg bronha [31].

Skvamozni karcinomi su najčešći središnji tumori. Mogu se proširiti u regionalne limfne čvorove i pojaviti kao hilarna ili medijastinalna masa s pomijeranjem medijastinuma na ipsilateralnu stranu, te dovesti do propadanja dijela ili cijelih pluća [32]. Kad se javi periferno, skvamozni karcinom nalazimo kao solitarni plućni čvor (<3 cm) ili kao masa (> 3 cm). Takođe, mogu se javiti u gornjem plućnom režnju, kad dovodi do razaranja leđnih rebara i izazivaju Hornerov sindrom. Takve tumore nazivamo Pancoast [33].

Periferno, najčešće se javljaju adenokarcinomi i to kao čvorići veličine ispod 4 cm. Veoma rijetko se javljaju u centralnom dijelu pluća, kao hilarna ili perihilarna masa i veoma rijetko, za razliku od skvamoznog karcinoma stvaraju kavitacije.

Nasuprot adenokarcinomu, SCLC se najčešće pojavljuje upravo kao hilarna ili perihilarna masa, sa medijastinalnom limfadenopatijom [34]. Otprilike 5% SCLC predstavlja periferne lezije izgleda kovanice [35].

Karcinomi velikih ćelija su, kao velike mase, najčešće prisutni na periferiji pluća, ali mogu uključivati i subsegmentalne ili velike bronhije. Ovakvi tumori često zauzimaju i visceralnu pleuru, grudni koš, kao i okolne strukture.

Periferno nalazimo i krupnoćelijski neuroendokrini tumor, dok je za bazaloidni karcinom pluća karakterističan egzofitni rast bronha [36]. Adenskvamozni karcinom karakteriše središnji ožiljak. Njegova lokalizacija, kao i većine NSCLC tumora je periferna [37].

Sarkomatoidni karcinomi mogu nastati u središnjem dijelu, ali i u periferno i to češće u gornjim režnjevima. Pleomorfni karcinomi pokazuju tendenciju invazije grudnog koša. Često je riječ o velikim, perifernim tumorima [38]. Tipični karcinoid se može javiti u bilo kojem dijelu pluća, dok je atipični češće periferni [39].

1.9. Makroskopske karakteristike tumora pluća

Makroskopski, karcinom pluća, u zavisnosti od histološkog tipa, može da raste:

- endobronhijalno, egzofitno, karfiolasto i polipoidno;
- intramuralno, pri čemu cirkularno obuhvata bronh bez značajnijeg suženja lumena;
- medijastinalno, veći deo tumorske mase se nalazi van pluća u medijastinumu;
- u obliku perifernog čvora okruglog ili policikličnog;
- u vidu karcinomske "kaverne", ako centralni deo čvora nekrotiče;
- difuzno mrežasto (retikularno, tj. limfangitično), ako se karcinom širi kroz limfatike intersticijuma;
- pneumonično, odnosno intraalveolarno;
- pseudomezotelijalno, kada se tumor širi van pluća po pleuri u vidu debele švarte;
- kao karcinom u ožiljku, ako je čvor lokalizovan subpleuralno sa pupčasto uvučenom pleurom i velikom količinom veziva;
- kao Pancoast, ako je lokalizovan u plućnom vrhu i infiltrira strukture gornje torakalne aperture [31].

Adenokarcinomi pluća mogu biti pojedinačni ili multipli, raznih veličina. Makroskopski izgled im je raznolik, ali se može grupisati u šest različitih obrazaca javljanja. Kod jednih je izražena sivo-bijela središnja fibroza, a ako je prisutna i invazija, onda je moguće prisustvo nekroze,

kavitacije i krvarenja. Rubovi tumora mogu biti lobulirani ili loše definisani zvjezdastim rubom. Zbog obilne količine prisutnog mucina, neki perferni tumori mogu imati želatinoznu strukturu. Drugi uzorak adenokarcinoma je centralni ili endobronhijalni tumor [40]. Kod nekih su uočljive difuzne pneumonijske promjene, lobarna konsolidacija sa očuvanom osnovnom arhitekturom. Četvrti mogući izgled adenokarcinoma je posljedica difuzne bilateralne plućne bolesti, te se nekad nalaze rašireni čvorovi različitih dimenzija i u svim režnjevima, a u nekim slučajevima, zbog raširenog limfogenog širenja, izgled sugerise intersticijsku pneumoniju. U petom uzorku se vidi periferno širenje, kao i duž visceralne pleure, sa zadebljanjem koje podjeća na koru. Tim izgledom oponaša maligni mezoteliom [41]. Moguć je još jedan izgled adenokarcinoma, kada se on razvija u pozadini fibroze, kao lokalizovan ožiljak ili difuzna intersticijska fibroza [42].

Skvamozni tumori pluća su najčešće sivi ili bijeli, što zavisi od stepena fibroze. Čvrsti su, sa prisutnim fokalnim depozitima ugljičnog pigmenta i zvjezdolikim uvlačenjem na periferiji. Mogu dostići veće dimenzije sa prisutnom kavitacijom. Središnji skvamozni tumori tvore intraluminalnu polipoidnu masu [43].

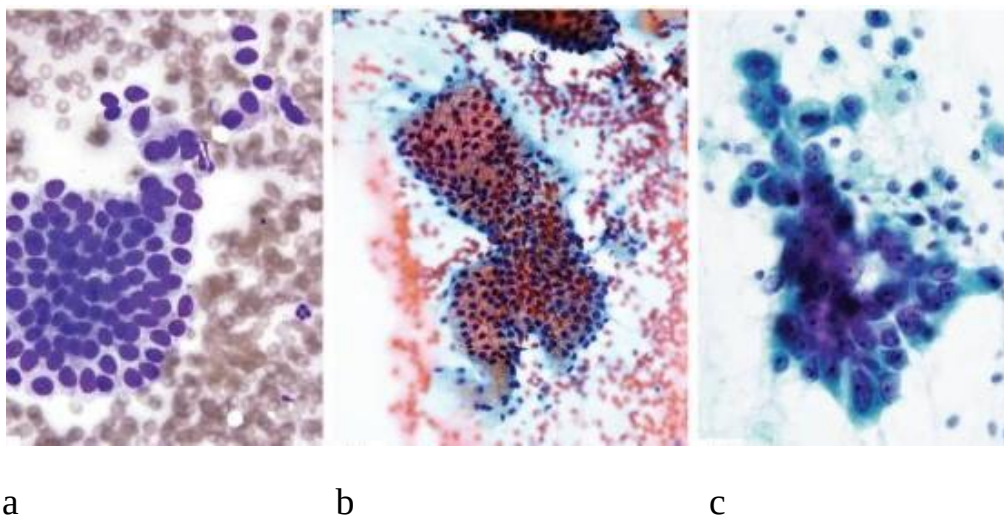
SCLC tumori su obično bijelo-žutosmeđe boje, oskudne perihilarne mase sa opsežnom nekrozom. Često zahvataju limfne čvorove. Unutar pluća se obično širi duž bronha, kroz submukozu ili rubno. Često su zahvaćeni limfatici [35].

Krupnoćelijski karcinom pluća ima karakterističan ružičasti izgled. Tumor je mekan, često sa nekrozom, ponekad sa prisutnim krvarenjem. Kavitacije rijetko nalazimo.

Karcinoidi mogu nastati periferno ili centralno. Rijetko su veći od 3 do 4 cm u promjeru. Periferni su čvrsti i nodularni [44]. I tipični i atipični karcinoid tvore čvrste, jasno definisane, žute do žutosmeđe tumore. Tipični karcinoid je često endobronhijalni, netaknute ili ulcerisane gornje sluznice, sa mogućom skvamoznom metaplazijom. Ostali karcinoidi prodiru u susjedni plućni parenhim [42].

1.10. Citološke karakteristike adenokarcinoma pluća

Citologija ima veliku ulogu u dijagnostici karcinoma pluća, posebno u razlikovanju adenokarcinoma od pločastih ćelija [45]. Diferencijacija adenokarcinoma se može citološki izraziti u više arhitektonskih obilježja, od izgleda ravne ploče ili trodimenzionalnih ćelijskih kuglica, do pseudopapilarnih skupina ili pravih papila sa centralnim fibrovaskularnim jezgrama, te kohezivnim nakupinama sa akinarnim strukturama (slika 2a). Može da ima izgled „drvene ograde“ ili kao „pijano saće“ (slika 2b). Pojedinačne ćelije adenokarcinoma obično imaju bazofilnu citoplazmu, koja može biti homogena, izrazito zrnasta ili pjenasta i obično prozirna, često sa citoplazmatskim vakuolama (slika 2c). Jezgro se često nalazi ekscentrično sa hromatinom koji varira od sitno zrnatih, jednoličnih do hiperhromatskih, grubih sa nepravilno distribucijom. Većina tumorskih ćelija ima jedan makronukleolus [46].



Slika 2. Adenokarcinom, ciologija.

- a) Ravan, kohezivan izgled jednoličnih žljezdanih ćelija, koje karakteriše blaga promjenjivost nuklearnih veličina, neupadljivi nukleoli, veoma delikatna citoplazma i nizak nivo poremećaja polariteta (nuklearna gužva).
- b) Ravan, kohezivan izgled jednoličnih žljezdanih ćelija ima obilnu, bistru citoplazmu ispunjenu mucinom i nepravilno raspoređene jezgre u obliku “pijanog saća”, karakteristično za invazivi mucinozni adenokarcinom.
- c) Luminalni prostor je okružen žljezdanim ćelijama sa delikatnom citoplazmom i izrazito malignim, često ekscentrično postavljenim jezgrama, od kojih svaka ima dobro razvijen nucleolus [46].

Dakle, ćelije adenokarcinoma u citologiji mogu biti jednostruke ili raspoređene u trodimenzionalne morule, acine, pseudopapile, prave papile sa fibrovaskularnim jezgrama i/ili pločama ćelija. Granice ćelijskih nakupina su obično oštro zbrisane. Količina citoplazme je promjenjiva, ali je najčešće relativno obilna. Većinom je homogena ili zrnasta, rjeđe pjenasta zbog obilnih masnih nejasnih vakuola. Jedna velika mucinirana vakuola može biti istaknuta i u nekim slučajevima, raspršuje citoplazmu i komprimira jezgro do jednog ruba, tvoreći takozvanu ćelijsku prstenastu stanicu. Jezgre su obično pojedinačne, ekscentrične i okrugle do ovalne, s relativno glatkim konturama i minimalnom nuklearnom nepravilnošću. Hromatin je fino zrnat i ravnomjerno raspoređen u bolje diferentovanim tumorima, a grub i nepravilno raspoređen ili hiperhromatski kod slabo diferentovanih tumora. Nukleoli su u većini tumora istaknuti i karakteristično su jednostruki, makronukleoli, variraju od glatkih i okruglih do nepravilnih [4].

1.11. Histološke karakteristike adenokarcinoma pluća

Karcinom žlijezdanih ćelija je najčešći histološki tip karcinoma pluća, sa daljim porastom incidencije. Adenokarcinom pluća je zloćudni epitelni tumor sa žljezdanom diferencijacijom. Histološki variraju od dobro diferentovanih tumora s očiglednim žljezdanim elementima do papilarnih lezija sličnih drugim papilarnim karcinomima, te do čvrstih masa sa samo povremenim žljezdama i ćelijama koje stvaraju mucin. Adenokarcinomi rastu u različitim obrascima, uključujući acinarne, papilarne, bronhiolo-alveolarne i čvrste s tvorbom mucina [47].

Zapravo, 2011. godine nova klasifikacija adenokarcinoma pluća predložila je značajne promjene klasifikacije WHO 2004. za resecirane tumore, uključujući: 1) ukidanje izraza bronhioloalveolarni karcinom i miješani podtip adenokarcinoma; 2) dodavanje adenokarcinoma *in situ* kao preinvazivne lezije, radi pridruživanja atipične adenomatozne hiperplazije; 3) dodavanje minimalno invazivnog adenokarcinoma; 4) razvrstavanje invazivnih adenokarcinoma prema prevladavajućem podtipu nakon sveobuhvatnog histološkog podtipiziranja polukvantitativno procjenom postotka različitih podtipova koji su prisutni u koracima od 5%; 5) upotreba termina “lepidic” za neinvazivnu komponentu (prethodno klasifikovanu kao bronhioloalveolarni karcinom); 6) uvođenje izraza invazivni mucinozni adenokarcinom za

adenokarcinom prethodno klasifikovan kao mucinozni bronhioalveolarni karcinom, isključujući tumore koji udovoljavaju kriterijima za adenokarcinom *in situ* ili minimalno invazivni adenokarcinom; 7) ukidanje podtipova adenokarcinoma prozirnih ćelija i zaštitnog prstena i njihovo prepoznavanje kao svojstva kada je prisutna bilo koja količina, ma koliko mala; i 8) ukidanje termina mucinozni cistadenokarcinom, i uključujući ih pod kategoriju koloidnog adenokarcinoma [47].

U trenutnoj klasifikaciji nediferentovani karcinomi koji su ranije bili klasifikovani kao karcinomi velikih ćelija, ali koji izražavaju imunohistokemijske markere pneumocita, uključuju se, kao i oni koji pokazuju ekspresiju mucina, u kategoriju čvrstih adenokarcinoma. Invazivni adenokarcinom čini 70-90% svih operativno resekiranih slučajeva, s varijantom koja odražava razlike u prevalenciji adenokarcinoma *in situ* i minimalno invazivnog adenokarcinoma. Invazivni adenokarcinom karakteristično se sastoji od složene heterogene mješavine histoloških podtipova, koje često predstavljaju morfološki kontinuum, a ne diskretni odjeljci.

U revidiranoj klasifikaciji, termin koji prevladava dodan je svim kategorijama invazivnih nemuscinoznih ADC-a, jer je većina ovih tumora heterogena, a sastoji se od mješavina histoloških podtipova [47].

1.12. Histološki subtipovi adenokarcinoma pluća

Podklasifikacija adenokarcinoma pluća bila je izazov za revizore ranije klasifikacije, jer je poznato da je primarni adenokarcinom pluća u mnogim aspektima vrlo heterogena neoplazija, ne samo po svojoj histopatološkoj složenosti, već i u pogledu molekularnog, kliničkog, radiološkog i hirurškog aspekta.

Uporedo s klasifikacijom IASLC / ATS / ERS, upotreba termina bronhoalveolarni karcinom (engl. *Bronchoalveolar carcinoma*-BAC) prekinuta je i zamijenjena je sa pet određenih dijagnostičkih kategorija, a to su mucinozni i nukleinski adenokarcinom *in situ* (engl. *Adenocarcinoma in situ*-AIS), minimalno invazivni adenokarcinom (engl. *Minimally invasive*

carcinoma-MIA), lepidični prevladavajući adenokarcinom i invazivni mucinozni adenokarcinom [26,48].

a) Preinvazivne lezije

U trenutnoj klasifikaciji atipična adenomatozna hiperplazija (engl. *Atypical adenomatous hyperplasia*-AAH) opisana je kao lokalizovana, mala (obično 5 mm ili manje) proliferacija, od blago do umjereno atipičnih pneumocita tipa II i / ili klupskih stanica (ranije nazvanih Clara stanice) nastalih u centriacinarnoj regiji i obloge alveolarnih zidova, a ponekad i respiratornih bronhiola. U kategoriji preinvazivnih lezija, AAH je suprotan od pločaste displazije. Lezija se obično slučajno nađe tokom pregleda hirurških uzoraka. Razlikovati višećelijski i atipični AAH i adenokarcinom *in situ* (AIS) može biti teško. AIS je mali (manji od 3 cm), solitarni nemucinozni ili mucinozni adenokarcinom čistog lepidičnog rasta, bez nedostatka stromalne, vaskularne i pleuralne invazije. Nuklearna atipija je odsutna ili neupadljiva. Dijagnoza AIS-a može se postaviti samo u reseciranom tumoru uz poznavanje veličine tumora i pregledom cijelog tumora kako bi se potvrdilo da nema invazivne komponente [26].

b) Minimalno invazivni adenokarcinom

Minimalno invazivni adenokarcinom (MIA) je mali (manji od 3 cm), solitarni adenokarcinom s pretežno lepidnim uzorkom i invazijom ≤ 5 mm u najvećoj dimenziji. Invazivna komponenta uključuje bilo koji histološki podtip osim lepidičnog uzorka, tj. acinarni, papilarni, mikropapilarni, čvrsti, koloidni, fetalni ili invazivni mucinozni adenokarcinom i tumorske ćelije koje infiltriraju miofibroblastičnu stromu. Dijagnoza MIA se isključuje ako tumor napadne limfu, krvne sudove, vazdušni prostor ili pleuru, sadrži nekrozu tumora ili se širi kroz vazdušne prostore [48].

c) Invazivni adenokarcinom

Invazivni adenokarcinomi predstavljaju više od 70 do 90% hirurški reseciranih adenokarcinoma pluća s varijacijom koja odražava razlike u prevalenciji adenokarcinoma *in situ* (AIS) i minimalno invazivnom adenokarcinomu (MIA). Sastoje se od složene heterogene mješavine histoloških podtipova, koja se može posmatrati kao morfološki i biološki kontinuum. Adenokarcinomi koji pokazuju čisti pojedinačni uzorak relativno su rijetki [48].

d) Lepidni adenokarcinom

Lepidični adenokarcinom sastoji se od blagih pneumocitnih tumorskih ćelija koje rastu duž površine alveolarnih zidova, slično morfolgiji definisanoj za AIS i MIA. Invazivna komponenta adenokarcinoma prisutna je u najmanje jednom fokusu dimenzija > 5 mm u najvećoj dimenziji. Izraz lepidični preovlađujući adenokarcinom definiše nemucinozni adenokarcinom koji ima lepidični rast kao svoju prevladavajuću komponentu [47].

e) Acinarni adenokarcinom

Najčešći dominantni uzorak u adenokarcinomu pluća je acinarni obrazac. Acinarni adenokarcinom pokazuje većinsku komponentu žljezdanih struktura, okruglog do ovalnog oblika, sa središnjim luminalnim prostorom okruženim tumorskim ćelijama. Neoplastične ćelije i žljezdani prostori mogu sadržavati mucin. Kad lepidični rast formira gnijezda zarobljena kolapsom, morfolgiju može biti teško razlikovati od acinarnog uzorka. Međutim, kad se izgubi alveolarna arhitektura i / ili postoji miofibroblastična stroma, uzima se u obzir dijagnoza invazivnog acinarnog adenokarcinoma. U trenutnoj klasifikaciji WHO-a, kribiformni uzorak za koji je karakteristična žljezdana fuzija i složenost žljezdanih struktura također se svrstava u kategoriju acinarnog adenokarcinoma [48].

f) Papilarni adenokarcinom

Papilarni podtip sastoji se od zloćudnih kuboidnih do stupolarnih žljezdanih ćelija koje rastu duž središnjih fibrovaskularnih jezgara. To bi trebalo razlikovati od tangencijalnog presjeka alveolarnih zidova na području lepidičnog adenokarcinoma. Ako tumor ima lepidični rast, ali su alveolarni prostori ispunjeni papilarnim strukturama, tumor se klasifikuje kao papilarni adenokarcinom. Miofibroblastička stroma nije potrebna za dijagnostikovanje ovog obrasca [48].

g) Mikropapilarni adenokarcinom

Klasifikacija IASLC / ATS / ERS pokrenula je novi mikropapilarni podtip. Glavna komponenta mikropapilarnog adenokarcinoma su tumorske ćelije koje rastu u papilarnim nakupinama, tvoreći cvjetove kojima nedostaju fibrovaskularne jezgre karakteristične za papilarni adenokarcinom. Ove cvjetnice se mogu pojaviti odvojene od alveolarnih zidova ili su povezane sa njima. Ćelije

tumora obično su malene i kuboidne, a imaju promjenjivu atipiju. Žljezdane strukture u obliku prstena mogu naizgled plutati unutar alveolarnih prostora. Vaskularna i stromalna invazija je česta, a mogu se vidjeti i psamomska tjelašca [26].

h) Solidni adenokarcinom

Solidnom adenokarcinomu nedostaju prepoznatljivi obrasci adenokarcinoma, tj. acinarni, papilarni, mikropapilarni ili lepidični rast i pokazuju poligonalne tumorske ćelije koje rastu u čvrstim listovima ili gnijezdima. Ako je tumor 100% (čisti) solidni, unutarćelijski mucin mora biti prisutan u najmanje pet tumorskih ćelija [47].

Varijante adenokarcinoma

Invazivni mucinozni adenokarcinom (IMA) uključuje adenokarcinome koji su prethodno klasifikovani kao mucinozni BAC, sa tumorskim ćelijama koje imaju peharastu i / ili kolonastu morfologiju sa obilnim intracitoplazmatskim mucinom i malim, u osnovi smještenim jezgrama. Nuklearna atipija je karakteristično neupadljiva ili je nema. Okolni alveolarni prostori često se ispunjavaju mucinom. Može se vidjeti bilo koji obrazac rasta, osim čvrstog: acinarni, papilarni, mikropapilarni i lepidični, pri čemu je lepidični uzorak najčešći. Rijetko se mogu pojaviti mješavine mucinoznih i nukleinskih adenokarcinoma. Ako ima $\geq 10\%$ svake komponente, tumor treba klasifikovati kao miješani invazivni mucinozni i neminozni adenokarcinom s opisom svake komponente. Kod koloidnog adenokarcinoma obilni bazeni izvanćelijskog mucina zamjenjuju vazdušne prostore i razaraju njihove zidove. Ćelije tumora mogu činiti samo mali postotak ukupnog tumora i biti vrlo dobro diferentovane i neprimjetne. Fetalni adenokarcinom (bivši plućni blastom) sastoji se od složenih žljezdanih struktura koje oponašaju razvijajući epitel u pseudoglandularnoj fazi pluća fetusa, dok enterički adenokarcinom nalikuje adenokarcinomima koji nastaju u kolorektumu [48].

1.13. Genetski profil adenokarcinoma pluća

Utvrđene su brojne promjene gena koje imaju uticaj u odabiru terapije. Ispitivanje uzoraka karcinoma pluća na ove promjene važno je za identificiranje potencijalno djelotvornih ciljanih terapija, kao i izbjegavanje terapija koje vjerojatno neće pružiti kliničku korist [30].

Trenutno je u adenokarcinomu pluća poznato nekoliko promjena “drajver” gena, kao što su: epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*-EGFR), KRAS, BRAF, ERBB2/HER2, anaplastični limfom kinaza (engl. *Anaplastic lymphoma kinase*-ALK), ROS1, RET, NTRK1 i NRG1. Klinički najrelevantije su EGFR i ALK mutacije, jer su za pacijente, čiji tumori dokazano imaju ove molekularne poremećaje, odobreni i dostupni ciljani lijekovi [47]. HER1, ROS1 i NTRK1 dijele kliničkopatološke karakteristike sa EGFR i ALK mutacijama, u smislu učešća koje je gotovo specifično za adenokarcinom pluća, posebno kod TTF1(engl. *thyroid transcription factor 1*-TTF1) pozitivnih adenokarcinoma, a gotovo uvijek kod žena, nepušača. Dakle, postoje kliničke razlike između adenokarcinoma kod pušača i nepušača. KRAS mutacije češće nalazimo kod pušača [49].

Najveću histološko-molekularnu korelaciju nalazimo kod invazivnog mucinoznog adenokarcinoma, kod kojeg je uočen visok postotak KRAS, dok je manje EGFR mutacija. U većini invazivnih histoloških podtipova adenokarcinoma mogu se naći EGFR i KRAS mutacije, kao i ALK pregrupisanje. Same EGFR mutacije se povezuju sa nemucinoznim adenokarcinomima, najčešće lepidični ili papilarni, dok se KRAS mutacije najčešće nalaze u solidnim adenokarcinomima, ali ih možemo naći i u tumorima koji proizvode vanćelijski mucin. ALK rearanžiranje je u većini slučajeva povezano sa acinarnim uzorkom [47]. Adenokarcinomi sa mikropapilarnim uzorkom imaju veću učestalost EGFR mutacija u odnosu na one bez tog uzorka [50].

Fuzijski geni su nedavno identifikovani kao onkogeni pokretači. Kod invazivnih mucinoznih adenokarcinoma su često prisutne KRAS mutacije. Stoga su, Nakaoku i sar. ispitali 34 slučaja IMA bez KRAS mutacije [51]. Identifikovano je pet onkogenih fuzija: CD74 – NRG1, SLC3A2 – NRG1, EZR– ERBB4, TRIM24 – BRAF i KIAA1468 – RET. Ovi fuzijski geni bili su međusobno isključeni iz KRAS mutacija. Fuzije NRG1 bile su prisutne u 17,6% (6/34) KRAS

divljih vrsta IMA. S obzirom da su fuzije NRG1, ERBB4, BRAF i RET potencijalne molekularne mete, njihova klinička primjena obećava [52].

1.14. Prognostički i prediktivni faktori u adenokarcinomu pluća

Nekoliko biomarkera pojavilo se kao prediktivni i prognostički markeri za NSCLC. Prediktivni biomarker pokazatelj je terapijske djelotvornosti jer postoji interakcija između biomarkera i terapije na ishod pacijenta. Prognostički biomarker ukazuje na preživljavanje pacijenta nezavisno o primljenom tretmanu, jer je biomarker pokazatelj urođenog ponašanja tumora [30].

Prediktivni biomarkeri uključuju ALK fuzijski onkogen (fuzija između ALK-a i drugih gena (npr. Ehinoderm mikrotubuli povezani s proteinima sličnim 4), ROS1 izmjena gena, senzibiliziranje mutacija gena EGFR, mutacije BRAF V600E i ekspresija PD-L1. Nastali prediktivni biomarkeri uključuju mutacije ERBB2 (poznate i kao HER2) mutacije, reorganizovanje RET gena, visok nivo MET mutacije ili preskočena MET exon 14 mutacija (METex14) i mutacijsko opterećenje tumora (TMB). Prisutnost delecija EGFR na egzonu 19 ili mutacija na egzonu 21 L858R je prediktivna za liječenje terapijom inhibitorom EGFR tirozin kinaze (EGFR TKI) (npr. Erlotinibom); Stoga se ove mutacije nazivaju senzibilizirajućim mutacijama EGFR-a. Prisutnost mutacija EGFR-a na egzonu 19 (LREA) ili mutacija na egzonu 21 L858R ne čini se prognostičkim za preživljavanje bolesnika s NSCLC, neovisno o terapiji [53].

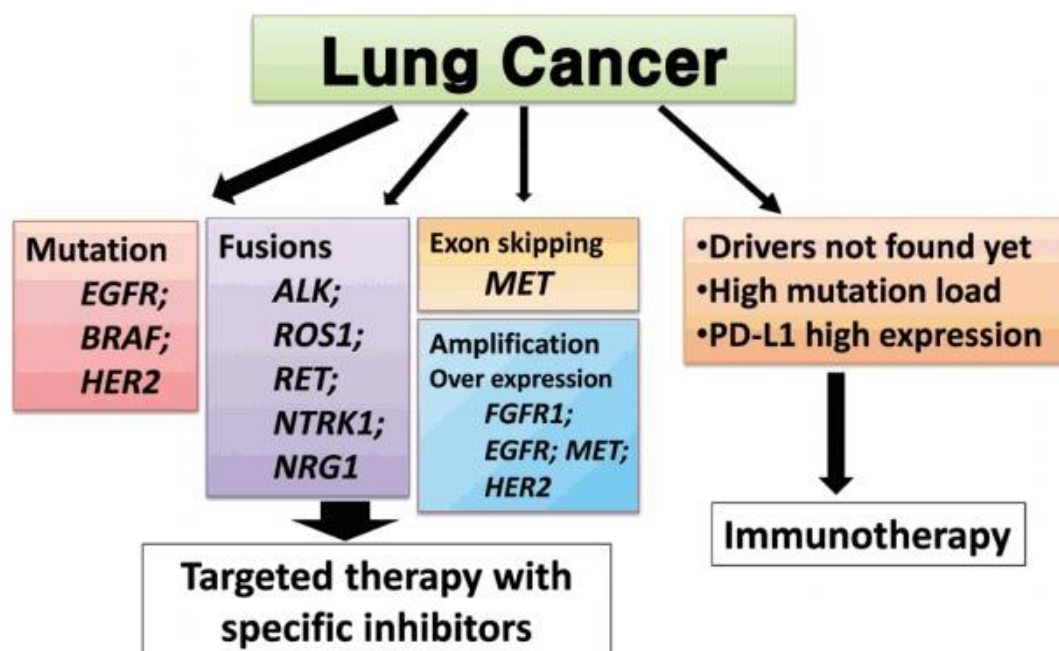
ALK fuzijski onkogeni (tj. rearanžiran ALK gen) i ROS1 preuređenja su prediktivni biomarkeri koji su identifikovani u malom podskupinu bolesnika s NSCLC; oba predviđaju korist od ciljane terapije kao što su crizotinib ili ceritinib. Nedavno su identifikovane druge reorganizacije gena (tj. fuzija gena) (poput RET-a) podložna ciljanim terapijama, posebno terapijama koje su trenutno pod istragom u kliničkim ispitivanjima [54-57].

Onkogen KRAS je prognostički biomarker. Prisutnost KRAS mutacija prognostički je loša za preživljavanje bolesnika s NSCLC, za razliku od pacijenata bez KRAS mutacija [58]. Mutacije KRAS-a također prediktiraju nedostatak koristi od EGFR TKI terapije [59]. EGFR, KRAS,

ROS1 i ALK genetske promjene obično se ne preklapaju [60]. BRAF mutacije obično se ne preklapaju s EGFR mutacijama niti sa ALK ili ROS1 rearanžiranjima. EGFR, KRAS, ROS1 i ALK genetske promjene međusobno se ne preklapaju. S toga, testiranje na KRAS mutacije može identifikovati pacijente koji neće imati koristi od daljnjeg molekularnog ispitivanja [61]. BRAF mutacije obično se ne preklapaju s EGFR mutacijama ili ALK preuređenjima [62].

1.15. Molekularna testiranja u tretmanu karcinoma pluća

Pojavom novih genetskih otkrića, novih terapija i novih tehnologija, pacijenti sa uznapredovalim karcinomom pluća, koji imaju lošu prognozu, dobijaju šansu za duže i kvalitetnije preživljavanje. To se posebno odnosi na pacijente sa adenokarcinomom pluća, čiji tumori imaju određene specifične molekularne promjene (npr. aktiviranje promjena u EGFR, ALK i ROS1 genima). Kod njih, ciljana terapija inhibitorom tirozin kinaze (engl. *tyrosine kinase inhibitors*-TKI) pruža značajno poboljšanje preživljavanja i kvalitete. Stoga, kod pacijenata s tipovima uznapredovalog karcinoma pluća kod kojih se te ciljane molekularne promjene obično pojavljuju, treba uraditi molekularno testiranje potrebno za njihovo identifikovanje i na taj način im omogućiti da dobiju odgovarajuće ciljane tretmane [63]. Dok je molekularna dijagnostika postala standard u liječenju pacijenata s karcinomom pluća, imunoterapija se pojavila kao nova terapijska opcija za pacijente koji nemaju ciljane promjene (slika 3). Oba terapijska pristupa zahtijevaju patološku dijagnozu postavljenu na osnovu procjena molekularnih biomarkera.



Slika 3. Sadašnji terapijski pristup pacijentima s karcinomom pluća. EGFR, receptor faktora rasta; ALK, anaplastična limfomska kinaza; FGFR1, receptor faktora rasta fibroblast 1; PD-L1, programirani smrtni ligand 1.

Klinička ispitivanja su potvrdila da su EGFR mutacije najbolji prediktivni faktor efikasnosti EGFR TKI. Zbog visoke učestalosti EGFR mutacija, naročito kod azijske populacije, kao i same dostupnosti ciljanih terapijskih sredstava, EGFR testiranje je postalo najvažniji korak u odlučivanju o liječenju pacijenata sa karcinomom pluća [64].

Za razliku od EGFR mutacija, ciljane terapije KRAS mutacija do sada nisu bile tako uspješne. KRAS mutacije su poznate kao negativni prediktivni markeri lošeg odgovora na EGFR TKI. Takođe, prisustvo KRAS mutacija predstavlja loš prognostički faktor, što najvjerojatnije zavisi od specifične mutacije KRAS kodona, ali i od stadijuma bolesti u vrijeme postavljanja dijagnoze [65]. Poznato je da invazivni mucinozni adenokarcinom pokazuje visoku učestalost KRAS mutacija [66].

Osim pomenutih mutacija, pronađene su i druge ciljane mutacije, ali je njihov značaj manji zbog male učestalosti. Tako je, na primjer, BRAF mutacija pronađena kod 3%-4% bolesnika sa adenokarcinomom pluća kod pacijenata sa Zapada. Za razliku od melanoma ili papilarnog karcinoma štitne žlijezde, V600E mutacija čini samo 50% BRAF mutacija [67].

Her2 mutacije su prisutne kod otprilike 1%– 2% adenokarcinoma pluća i to najčešće se radi o mutaciji u okviru egzona 20. Kod ovih pacijenata je primijećen klinički odgovor na terapijska sredstva poput trastuzumaba i afatiniba [68].

1.16. Genska osnova ciljane terapije u nemikrocelularnom karcinomu pluća

Ciljane terapije, zasnovane na genotipu, predstavljaju prvi korak ka personalizaciji terapije nemikrocelularnog karcinoma pluća. Korišćenjem algoritma liječenja zasnovanog na biomarkerima, na osnovu molekularnog profila tumora pacijenta, povećao se standard njege oboljelog od NSCLC. Ovaj pristup je najefikasniji kod pacijenata sa genskom mutacijom receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) ili ALK promjenom gena [69].

Jedan od genski najraznovrsnijih tumora je upravo nemikrocelularni karcinom, bez obzira na subtip i predstavlja ogroman izazov i za prevenciju i za liječenje [70]. Upravo ta biološka raznolikost pruža mogućnost za iskorištavanje heterogenosti tumora raspoređivanjem NSCLC u različite, molekularno definisane skupine, za koje mutacije i / ili nenormalni genski izrazi podstiču rast i opstanak ćelija karcinoma i mogu poslužiti kao ciljevi za liječenje [71]. Najbolji primjer je identifikacija prisustva EGFR mutacije koja aktivira tirozin kinazu, kao najbolji prediktivni biomarker u odnosu na kliničko-patološki značaj u predviđanju tumorskog odgovora i preživljavanju bez progresije na inhibitore EGFR tirozin kinaze (TKIs) [72]. Takođe, valjani prediktivni biomarker u predviđanju tumorskog odgovora i preživljavanju bez progresije, na ALK TKI crizotinib iz prve linije terapije, daje rearanžman gena tirozin kinaze [73].

1.17. Korišćenje bioptičkih i citoloških uzoraka u molekularnom testiranju karcinoma pluća

Uzorci na kojima se utvrđuje dijagnoza bolesti mogu biti bioptički ili citološki (razmazi ćelija na predmetnom staklu). Bioptički uzorci predstavljaju isječak tkiva sa dijelom tumorske promjene. Ovi isječki se mogu dobiti tokom endoskopskih dijagnostičkih procedura (bronhoskopije i sl.) ili prilikom hirurških intervencija (resekcija dijela pluća sa tumorskom promjenom). Postupci sa uzorcima, bez obzira na vrstu uzorka koji se koristi u dijagnostici i molekularnom testiranju su jako značajni i mogu uticati i na mogućnosti u dijagnostici, diferencijaciji tumorskih procesa, ali i na rezultate molekularnih testiranja. Za molekularna isitivanja su najprikladnija, a i najčešće se koriste, tkiva fiksirana u formalin, uklopljena u parafin (engl. *formalin-fixed paraffin-embedded* FFPE). Najpribližniji idealnom fiksativu je 10% neutralni puferovani formalin, a optimalno vrijeme fiksacije se kreće u razmaku od minimalnih 6, do maksimalnih 72 časa. Na taj način se izbjegava mogućnost podfiksacije, kao i prefiksacije.

Prije molekularne analize, patolozi moraju da potvrde prisutnost tumorskih ćelija, bez obzira o kojoj vrsti uzorka se radi, jer je za pravilno testiranje mutacija, prije svega veoma značajan postotak, ali i kvalitet tumorskih ćelija. Procjena postotka tumorskih ćelija je od posebnog značaja za manje osjetljive metode testiranja, kao što je direktno sekvencioniranje. Za povećanje koncentracije tumorskih ćelija, preporučuje se korišćenje disekcije tumora, naročito kod uzoraka u kojima je prisutna nekroza tkiva [64].

Postoji nekoliko ograničenja u primjeni pojedinih uzoraka, citoloških i bioptičkih, koji se koriste za molekularna testiranja. Uzorak može biti nereprezentativan, da ne sadrži tumorske ćelije, ne sadrži dovoljnu količinu tumorskih ćelija, neadekvatno postupanje sa uzorkom, postojanje drugih patoloških procesa, tehničko oštećenje uzorka tokom uzimanja ili tokom laboratorijske obrade i slično [74]. Kroz razne studije se prikazuje uticaj kvaliteta uzorka na rezultate molekularnih testiranja. Ovdje je bitno napomenuti da kod velikog broja pacijenata (preko 70% pacijenata) dijagnoza bude utvrđena u odmakloj fazi bolesti i za testiranja najčešće imamo jedan uzorak koji je obično citološki materijal ili sitni bioptički uzorak dobijen tokom endoskopskog pregleda (bronhoskopije) [75, 76].

Postoje različita mišljenja o reprezentativnosti citoloških materijala u molekularnim testiranjima. Većina istraživača i laboratorija daju prednost bioptičkim uzorcima (kad god je to moguće) [77, 78, 79]. Jedna od studija pokazuje citološke blokove ćelija kao dobar izvor tumorskih ćelija za testiranje mutacija, jednako kao i histološki uzorci, bez obzira na fiksativ, prisustvo nekroze ili tip uzorka [80].

1.17.1. EGFR testiranje u karcinomu pluća

Nakon diferencijacije nemikrocelularnog karcinoma na adenokarcinom i non-adenokarcinom, prije svega upotrebom dodatnih dijagnostičkih procedura (obično imunohistohemijskih), prema preporukama IASLC potrebno je izvršiti dodatna molekularna testiranja kod svih karcinoma koji pokazuju bar i djelimičnu adeno diferencijaciju, kako bi se utvrdilo prisustvo i tip mutacija u ćelijama tumora. Situacija se zapravo drastično promijenila od prethodne decenije, otkrivanjem nekoliko terapijskih opcija koje su odobrene samo za liječenje pacijenata sa specifičnim histološkim tipovima i genetskim promjenama. Otkriće da su mutacije epidermalnog faktora rasta *EGFR* i kinaze anaplastičnog limfoma, *ALK* preuređene efektivne mete za inhibitore EGFR tirozin kinaze ili *ALK* inhibitora kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća predstavlja revoluciju u terapijskim modalitetima kod karcinoma pluća. Ova činjenica je i obavezala patologe da se u dijagnostici pored morfoloških kriterijuma koriste i molekularni kriterijumi. Dakle, u dijagnostici tumora pluća potrebno je izvršiti definitivnu morfološku, histohemijsku, imunohistohemijsku diferencijaciju prije konačnog zaključka odnosno utvrđivanja dijagnoze. Nakon utvrđivanja dijagnoze, kod svih karcinoma pluća koji imaju sigurnu ili nesigurnu adeno komponentu potrebno je uraditi dodatna molekularna testiranja, a sa ciljem odabira pacijenata koji mogu imati značajne koristi od primjene ciljane terapije [81].

Dakle, nakon dijagnoze odvajaju se ne-mikrocelularni karcinomi sa adeno diferencijacijom i na uzorcima se vrše molekularna testiranja.

Kod pacijenata sa NSCLC koji nisu pušači, na molekularnom nivou se češće pojavljuju mutacije u domenu receptora epidermalnog faktora rasta tirozin kinaze (EGFR), te kao takvi pokazuju

dobar odgovor na inhibitore EGFR-a u odnosu na pacijente koji su u direktnoj vezi sa konzumacijom duvana [82].

Poznato je takođe da je frekvencija EGFR mutacija u NSCLC povezana sa mnogim faktorima, uključujući rasu, pol, status pušenja i tumorsku histologiju. Oko 8% -15% evropskih pacijenata sa NSCLC-om imaju EGFR mutacije. Kod azijskih pacijenata frekvencija je do 31%, a mutacije su povezane sa azijskom etničkom pripadnošću, ženskim polom, nepušenjem i adenokarcinomom [83].

EGFR gen se nalazi na kratkom kraku hromozoma 7 (7p11.2) i kodira receptor transmembranskog faktora 170-kDa tipa I sa aktivnošću tirozin-kinaze. EGFR spada u HER / ErbB familiju receptorskih tirozin kinaza. Intracelularna signalizacija je posredovana uglavnom putem RAS / RAF / MEK / MAPK puta, PI3K / PTEN / AKT putanje i STAT putanje. Nadalje, EGFR signalizacija na kraju dovodi do povećane proliferacije, angiogeneze, metastaziranja i besmrtnosti (izbjegavanja apoptoze).

1.17.2. EGFR testiranje na tkivnim uzorcima tumora

U molekularnim ispitivanjima, uključujući i EGFR testiranje, najčešće se koriste tkiva fiksirana u formalinu, uklopljena u parafinu (FFPE). Takvi uzorci su najpraktičniji za EGFR analizu, bez obzira na artefakte povezane sa fiksacijom [84].

Različiti mali uzorci se mogu upotrijebiti, bilo da su uzeti aspiracijom, pod kontrolom CT-a ili da je u pitanju transbronhijalna biopsija [85]. Različiti pristupi obradi i rukovanju malim biopsijama zahtijevaju dobro osmišljenu strategiju u koordinaciji sa histološkom i imunohistohemijskom laboratorijom. U suprotnom, materijal može postati oskudan za EGFR analizu. Volumen tumorskih ćelija može biti nizak zbog čestih, istaknutih stromalnih reakcija [86].

Najoptimalniji izvor, ali i najrjeđi, za otkrivanje EGFR mutacija jesu hirurški resektati tumora pluća. Na taj način se može izdvojiti kompletna i dovoljna dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) iz uzorka, za razliku od uzoraka dobijenih transtorakalnim putem ili perkutanom biopsijom pluća, koji ne pokazuju cijeli genom tumora, zbog postojanja intratumorske genetske

heterogenosti [87]. Hirurški uzorci mogu pokazati relativno potpunu genomiju tumora, čime se izbjegavaju ili smanjuju lažno negativni rezultati otkrivanja mutacije EGFR [88].

Za adekvatno testiranje mutacija, presudan je odnos tumorskih i normalnih ćelija, kao i postotak i kvalitet tumorskih ćelija. Postoji preporuka da se procijeni postotak tumorskih ćelija u određenom uzorku. Za povećanje čistoće tumora, dakle povećanje sadržaja samo tumorskih ćelija, može se koristiti makro ili mikrodisekcija [64].

1.17.3. EGFR testiranje na citološkim uzorcima tumora

Uloga citologije u molekularnim testiranjima, samim tim i u EGFR testiranju, postaje sve važnija iz više razloga. Jedan od njih je minimalno invazivan dijagnostički pristup, kao i činjenica da se citološki uzorci ne fiksiraju formalinom, koji je povezan sa lošom kvalitetom nukleinskih kiselina zbog strukturnih oštećenja i fragmentacije u procesu ekstrakcije DNK [89]. Za EGFR testiranje se mogu upotrijebiti nerazrijeđeni direktni brisevi, uzorci fiksirani alkoholom, obojeni po Papanicolau i uzorci sušeni na vazduhu, obojeni Diff-Quik ili *May-Grünwald Giemsa* (MGG) metodom [90]. Nedostatak citološke metode predstavlja često mala količina uzorka, kao i malen broj prisutnih tumorskih ćelija. Takođe, adekvatnost uzorka za EGFR testiranje zavisi od dijagnostičkog modaliteta, vrste uzorka, kao i promjera upotrebljenih igala [91]. Iako igle većeg promjera obezbjeđuju celularniji uzorak i tačnije rezultate, loše celularne uzorke ne bi trebalo isključiti iz testiranja, već primijeniti visoko osjetljive molekularne testove [92]. Kod bolesnika sa uznapredovalim karcinomom pluća, koji predstavlja dvije trećine populacije raka pluća, uzorci citologije često su jedini uzorci koji su dostupni za molekularno testiranje da bi se donijele odluke o liječenju.

Analitičke metode moraju biti u stanju otkriti mutacije u uzorku s 20% ili više malignog ćelijskog sadržaja [93]. Makro i mikrodisekcije mogu obogatiti uzorak povećavanjem odnosa neoplastičnih i ne-neoplastičnih ćelija. Makro i mikrodoekcija se mogu obaviti i na citološki uzorcima [94]. Za ekstrakciju DNK, ćelije iz obojenih citoloških uzoraka, mogu se ukloniti sa pločica struganjem i prikupiti u epruvete za mikrocentrifugu [95].

1.18. Mutacije EGFR u pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća

Postoji nekoliko opisanih mutacija na EGFR genu. Dve najčešće genske mutacije koje su odgovorne za anomaliju u ćelijskom ciklusu su supstitucija arginina za leucin kod kodona 858 (L858R), ekson 21 i delecije u okviru eksona 19 (del E746_A750 je najčešći). L858R predstavlja 45-50% mutacija, dok su delecije na egzonu 19 odgovorne za dodatnih 45-50%. Druge rijetke mutacije (5%) povezane sa konstitutivnom aktivacijom EGFR-a u egzonu 20 i zamjene na ostatku glicina kod kodona 719 egzona 18 (mutacija G719S). Molekularne studije na receptorima koji imaju poznatu mutaciju L858R pokazali su smanjen afinitet tirozin kinaze za ATP i povećanje afiniteta za inhibitore tirozin kinaze (TKI). Istraživani lijekovi specifično usmjeravaju puteve onkogeneze zahvaljujući EGFR-ovoj hiperaktivaciji i uzrokuju malo štete na ne-tumorskim ćelijama. Postoje dokazi koji podržavaju različitu osjetljivost NSCLC-a na TKI-re gefitinib u zavisnosti od prisustva mutacije egzona 21 ili delecije egzona 19, gdje su delecije na eksonu 19 povezane sa boljim odgovorom na terapiju [96].

1.18.1. Terapijski značaj EGFR mutacija

Identifikacija mutacija epidermalnog faktora rasta (EGFR) u NSCLC je utrla put personalizovanoj terapiji kod karcinoma pluća sa inhibitorima EGFR-tirozin kinaze (engl. *tyrosine kinase inhibitor, TKIs*). Sa dostupnošću ciljane terapije i pravilnim izborom pacijenata molekularnim testiranjem, došlo je do povećanja ukupnog preživljavanja kod pacijenata sa karcinomom pluća [97]. Pacijenti koji su oboljeli od nesitnoćelijskog karcinoma pluća sa sa adenodiferencijacijom kod kojih se utvrdi postojanje mutacija EGFR mogu imati benefit od ciljane terapije. Status EGFR mutacije treba sistematski analizirati - sa sekvenciranjem kao standardom kriterijuma - za pacijente koji imaju uznapredovali NSCLC sa neskvamoznom histologijom. Aktivirajuća EGFR mutacija je prediktor za odgovor na inhibitore EGFR tirozin kinaze (TKIs), uključujući gefitinib i erlotinib prve generacije, afatinib druge generacije i dacomitinib, kao i treće generacije lijeka osimertinib [98]. Identifikacija mutacija epidermalnog faktora rasta (EGFR) u NSCLC je, dakle, utrla put personalizovanoj terapiji kod karcinoma pluća sa inhibitorima EGFR-tirozin kinaze. Sa dostupnošću ciljane terapije i pravilnim izborom

pacijenata molekularnim testiranjem, došlo je do povećanja ukupnog preživljavanja kod pacijenata sa karcinomom pluća [99]. U 2004. godini, FDA je odobrila erlotinib za liječenje bolesnika sa lokalno uznapredovalim ili metastatskim NSCLC, nakon progresije na najmanje jednom režimu hemioterapije, a kod pacijenata sa prisutnom EGFR mutacijom i kao terapiju prve linije [100]. Erlotinib i gefitinib su preporučeni u algoritmu NSCLC, kao terapija prve linije kod pacijenata sa naprednim, recidivnim ili metastatskim neskvamoznim NSCLC, kod kojih su poznate aktivne senzibilizirajuće EGFR mutacije. Ove preporuke su zasnovane na fazi III randomizovane studije (IPASS) u kojoj su pacijenti sa dokazanom EGFR mutacijom koji su primili gefitinib, povećali stopu odgovora i kvalitet života sa manje neželjenih efekata (npr. neutropenijom) u poređenju sa onima koji primaju hemoterapiju (carboplatin/paclitaxel) [101].

1.18.2. Stečena rezistencija na EGFR inhibitore

Stečena rezistencija na EGFR TKIs može da bude rezultat sekundarnih mutacija EGFR ili angažovanja alternativnih signalnih puteva, kao što su PIK3/Akt, insulin sličan factor rasta 1 receptora i C-mezenhimalnoepitelni factor tranzicije (c-MET), te aktivacija mTOR signalnog puta. Kao posljedicu stečene rezistencije na primijenjenu EGFR TKIs, kod pojedinih mutiranih adenokarcinoma pluća, nalazimo progresiju bolesti i transformaciju adenokarcinoma u drugi histološki tip tumora [102]. Glavna uloga u nastanku ove stečene rezistencije pripada tačkastim mutacijama na egzonu 20, gdje je treonin zamijenjen metioninom na poziciji 790 (T790M). Kod više od polovine rezistentnih bolesnika, kod kojih često nailazimo na porodični karcinom pluća, detektovane su navedene mutacije [103]. Osim tačkastih mutacija na egzonu 20, razlog stečene rezistencije, iako rjeđe, mogu biti i insercije na egzonu 20, tačkaste mutacije na egzonu 19 i kombinacije mutacija G719S i L858R, L858R i D761I, L858R i L747S, L858R i T790M, kao i L858R i T854A [104].

Pretklinička ispitivanja pokazala su da snažnija inhibicija EGFR-a sa EGFR TKI druge generacije, kao što je afatinib, može prevladati stečenu otpornost na mutaciju T790M, ali jake toksičnosti povezane s inhibicijom normalnog EGFR receptora na ovoj razini doze bile bi pogubne za kliničku upotrebu [98]. Biohemijska ispitivanja pokazuju da u prisutnosti mutacije

T790M EGFR, gefitinib više nije u mogućnosti inhibisati fosforilaciju divljih ili mutiranih vrsta EGFR-a. Međutim, ostali nepovratni inhibitori EGFR-a i dalje zadržavaju inhibitornu aktivnost, što sugerira daljnje razumijevanje odnosa strukture / funkcije mutiranih inhibitora EGFR i EGFR [105]. Time se konačno mogu identifikovati EGFR TKI druge generacije koji bi se mogli primijeniti u bolesnika koji razviju stečenu mutaciju T790M i dovedu do sekvenciranja tumora kod pacijenata koji se ponove nakon uspješnog liječenja s EGFR-TKI [106].

2. ISPITANICI I METODE

Ispitivanje je koncipirano kao studija retrospektivno-prospektivnog karaktera. Analiza se vršila na biopsijskim i citološkim uzorcima pacijenata iz Republike Srpske i Federacije Bosne i Hercegovine koji su dostavljani u Zavod za patologiju UKC RS u period od 2013. godine do 2018. godine. U istraživanje je uključeno 299 pacijenata oboljelih od karcinoma pluća. Pacijenti su podijeljeni u grupe s obzirom na vrstu materijala na kojem je utvrđena dijagnoza i na kojem su se radila molekularna testiranja. Prvu grupu čine pacijenti kod kojih je materijal za analizu dobijen hirurškom resekcijom tumora pluća; drugu grupu čine pacijenti kod kojih je uzorkovana metastatska promjena, treću grupu čine pacijenti kod kojih je materijal dobijen biopsijom prilikom endoskopskog pregleda (bronhoskopije) i četvrtu grupu čine pacijenti kod kojih je materijal citološki dobijen tokom različitih intervencija (sputum, lavaža bronha, kateter aspiracija, četkanje bronha, pleuralna punkcija i sl.).

Faktori uključenja u studiju su bili:

- Pacijenti kod kojih je dijagnostikovao nesitnoćelijski karcinom pluća;
- Morfološki i/ili imunohistohemijski dokazano postojanje komponente adenokarcinoma u uzorcima;
- Postojanje reprezentativnog uzorka na kome je moguće provesti molekularna testiranja (EGFR test);

Faktori isključenja iz studije su bili:

- Pacijenti kod kojih je dijagnostikovao tumor koji ne sadrži komponentu adenokarcinoma;
- Nereprezentativan materijal (utvrđeno pregledom dostavljenog materijala);

Pol i godine starosti su podaci koji su preuzeti iz medicinske dokumentacije i uputnica za analizu.

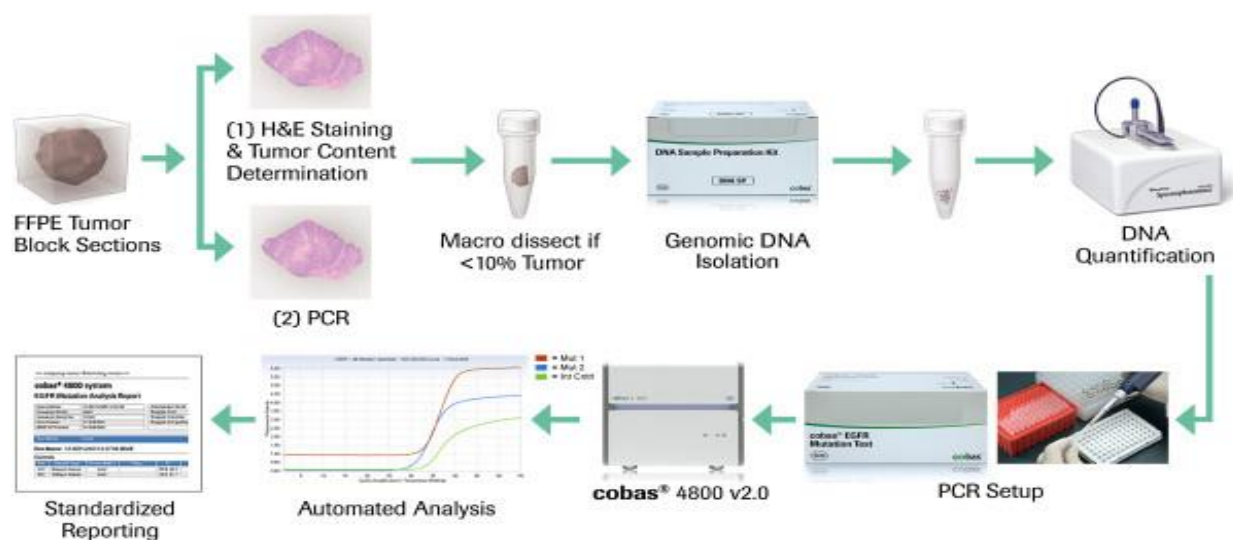
Analiza bioptičkih uzoraka tkiva i citoloških materijala se vršila u Zavodu za patologiju UKC RS. Materijal dobijen biopsijom je fiksiran u 10% formalinu. Nakon rutinske obrade pravili su se parafinski blokovi tkiva, koji su se rezali na mikrotomu u serijskim rezovima i bojili rutinskom hematoksilin-eozin (HE) metodom bojenja. U analiziranju je korišćen binokularni mikroskop *Leica* (objektiv 10x, 25x, 35x, 40x; okulari 10x) sa širinom vidnog polja 1,4mm.

Citološki materijali se sušio na vazduhu 15 do 20 minuta, a nakon toga se vršilo bojenje metodom *May-Grünwald Giemsa* (MGG). Kod svih ispitanika se određivao tip karcinoma prema WHO klasifikaciji iz 2015. godine, te preporukama IASLC. U definitivnoj diferencijaciji tumora su se koristile standardne metode obrade uzoraka HE metodom bojenja, a za citološke uzorke MGG metodom, te dodatne histohemijske i imunohistohemijske metode u slučaju potrebe u diferencijaciji nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Od imunohistohemijskih metoda u slučaju potrebe su bila korišćena sljedeća antitijela: TTF-1, Napsin, p63, CK5/6.

Nakon utvrđivanja dijagnoze adenokarcinoma (ili karcinoma u kome postoji adenodiferencijacija), prvo je utvrđena reprezentativnost uzorka za molekularna testiranja. Na većim uzorcima koji su dobijeni resekcijom je urađena makrodisekcija (obilježavanje dijela tumorskog tkiva koje je optimalno za molekularna testiranja).

Priprema uzoraka za molekularno testiranje-EGFR testiranje, se vršila odabirom reprezentativnog uzorka. Kod uzoraka koji su imali manje od 10% tumorske DNK, radila se makrodisekcija. Od označenog dijela, kod parafinskih uzoraka, pravili su se rezovi debljine 5 µm (od 1 do 6 rezova) i stavljali u sterilne mikrocentrifugalne tube od 1.5 mL (engl. *Safe-Lock microcentrifuge tubes*), a citološki uzorci i materijal su se dobijali struganjem sterilnim skalpelom i takođe se stavljali u tube.

Za testiranje se koristio Cobas® DNA Sample Preparation Kit za manuelnu pripremu uzorka i Cobas® EGFR mutation test, te Cobas 480 analizator za automatsku amplifikaciju i detekciju (slika 4).



Slika 4. Cobas EGFR mutacijski test-tok rada

Testiranje se bazira na dva glavna postupka prema uputstvu proizvođača testa (Roche, USA):

1) ručna priprema uzorka, da bi se dobila genomska DNK iz formalinom fiksiranog i u parafinu uklopljenog tkiva (engl. *formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE*) ili iz citološkog uzorka.

2) PCR amplifikacije i detekcije ciljane DNK pomoću komplementarnog para početnica i oligonukleotidnih proba obilježenih fluorescentnim bojama.

Ova dva postupaka se sastoje od deparafinizacije FFPE rezova, DNK izolacije, DNK kvantifikacije na aparatu Qubit® 2.0 Fluorometer, te amplifikacije i detekcije (postavke instrumenta; izračunavanja razrijeđenja DNK uzorka; razređivanja uzorka; pripreme radne Master Mix smjese i dodavanja kontrola i uzoraka).

Deparafinizacija FFPE uzoraka se vršila pomoću ksilola, zatim su se uzorci rehidrirali u apsolutnom alkoholu. Od ovog koraka proces obrade isti je i kod obrade citoloških uzoraka, koji su dobijeni prethodno struganjem sakupljeni u mikrocentrifugalne pipete. Inkubacijom na povišenoj temperaturi, pomoću proteinaze K i pufera, oslobađa se nukleinska kiselina koja štiti oslobođenu DNK. Tokom daljeg procesa izolacije, dodaje se izopropanol, centrifugiraju uzorci u posebnim tubama sa filterom. Genomska DNK se na taj način vezuje za površinu filtera, a nevezane supstance, kao što su soli, proteini i druge ćelijske nečistoće se uklanjaju centrifugiranjem. Adsorbovane nukleinske kiseline se ispiraju, a zatim eluiraju vodenim rastvorom. Takav uzorak je spreman za DNK kvantifikaciju. Za obavljanje Cobas® EGFR testiranja, koncentracija DNK bi trebalo da je $> 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Izolat je stabilan do 24 sata na temperaturi od 15°C to 30°C , do 14 dana na 2°C to 8°C , a na temperaturi od -15°C to -25°C i do 60 dana.

Ciljana DNK se zatim amplifikuje i detektuje na analizatoru Cobas 480, pomoću reagenasa za amplifikaciju i detekciju iz cobas® EGFR Mutation Test kit-a.

Cobas® EGFR mutacijski test je real-time PCR test za kvalitativnu detekciju i identifikaciju specifičnih mutacija na EGFR TK domenu u koje spadaju G719X (G719A, G719C i G719S) u egzonu 18, delecije i složene mutacije u egzonu 19, S768I i T790M u egzonu 20, L861Q i L858R u egzonu 21. Rezultat testa, osim detekcije pomenutih mutacija, može da bude i bez prisustva mutacija, ali i neuspješan (*invalid* ili *failed*). Tokom istraživanja podaci su analizirani i predstavljeni korišćenjem deskriptivne statistike i primjenom adekvatnih statističkih testova

analitičko-statističkog softverskog paketa SPSS (Statistical Product and Service Solutions), verzija 20.

Varijable mjerene nominalnom ili ordinalnom skalom predstavljene su i tabelarno (uz prikaz apsolutne vrijednosti) i grafički.

Za predstavljanje neprekinutih varijabli korišćena je deskriptivna statistika koja je obuhvatila prikaz: broja ispitanika (N), minimalne vrijednosti (Minimum), maksimalne vrijednosti (Maximum), medijane (Median, Md), aritmeričke sredine (Mean) i standardne devijacije (Std. Deviation) i grafički prikaz korišćenjem box-plot dijagrama kreiranih u SPSS-u.

Primjenjeni testovi

Pri testiranju normalne distribuiranosti obilježja mjerenih neprekinutom skalom koristi se

Kolmogorov-Smirn-ovljev test, a pri graničnim vrijednostima **Shapiro-Wilk's**-ov test.

Pri nivou značajnosti većem od 0.05 prihvata se da obilježje potiče iz normalne distribucije.

Ukoliko je poznato da osnovni skup ima približno normalan raspored, bolje je koristiti parametarske tehnike. Ako osnovni skup znatnije odstupa od normalnog rasporeda ili ako podaci sadrže više ekstremnih opservacija, preporučuje se upotreba neparametarskih tehnika [107,108].

Za dvije grupe rezultata kod kojih je dobijen normalan raspored primjenjuje se **t – test nezavisnih uzoraka** (Independent Samples t test).

Kruskal Wallis-ov test

Kruskal Wallis-ov test se koristi za testiranje neparametarske analize varijansi (za tri i više grupa). Ako se dobije statistički značajna razlika neophodno je primjenom Mann-Whitney-ev U testa testirati značajnost razlike rangova pojedinih grupa.

Mann-Whitney-ev U

Mann-Whitney-ev U test predstavlja ekvivalent parametarskom t – testu nezavisnih uzoraka, pri čemu poredi medijane uzoraka. Vrijednosti koje su dobijene pretvara u rangove obe grupe, a nakon toga izračunava značajnost razlike rangova grupa.

Hi-kvadrat (χ^2) test

Hi-kvadrat (χ^2) test se najčešće koristi kod podataka datih kategorija. Osnova mu je poređenje opserviranih i očekivanih frekvencija u različitim kategorijama [109].

U tablicama kontingencije dimenzija 2 x 2 vršena je korekcija prema **Yates-u**.

Ako su pojedine učestalosti u poljima tablice kontingencije 2 x 2 manje od pet (5) ili je ukupan broj ispitanika manji od 20 primjenjivan je **Fisher-ov** test [109].

3. HIPOTEZA

Na rezultate molekularnih testiranja utvrđivanja promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma pluća sa adenodiferencijacijom utiču vrsta, kvalitet, kvantitet uzorka i postupanje sa uzorkom.

4. CILJEVI

Cilj istraživanja je da se utvrde faktori koji mogu uticati na rezultate molekularnih testiranja prisustva promjena na EGFR genu.

1. Utvrditi prisustvo i tip molekularnih promjena na EGFR genu u svim uzorcima nemikrocelularnih karcinoma s adenodiferencijacijom;
2. Utvrditi uticaj pola i dobi pacijenata na prisustvo i tip promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom;
3. Utvrditi uticaj vrste uzorka (citološki, sitni bioptički uzorci i resekcioni uzorci) na prisustvo i tip promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom;
4. Utvrditi uticaj kvaliteta i kvantiteta (količina DNK) na prisustvo i tip promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom;
5. Utvrditi uticaj postupanja sa uzorkom u različitim zdravstvenim ustanovama na prisustvo promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom;

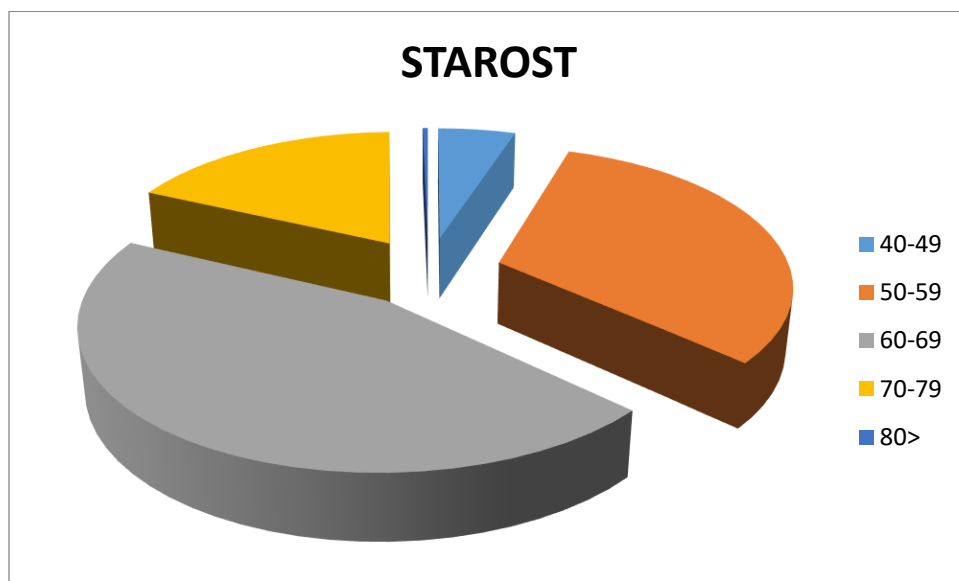
5. REZULTATI

Ispitivanje je koncipirano kao studija retrospektivno-prospektivnog karaktera. Analiza se vršila na biopsijskim i citološkim uzorcima pacijenata iz Republike Srpske i Federacije Bosne i Hercegovine koji su dostavljani u Zavod za patologiju UKC RS u period od 2013. godine do 2018. godine. U istraživanje je uključeno 299 pacijenata oboljelih od karcinoma pluća.

5.1. Analiza pacijenata u odnosu na dob

U odnosu na starosnu dob, najmlađi pacijent je imao 44 godine, a najstariji 80 godina. Prosječna starost pacijenata je 61 godina.

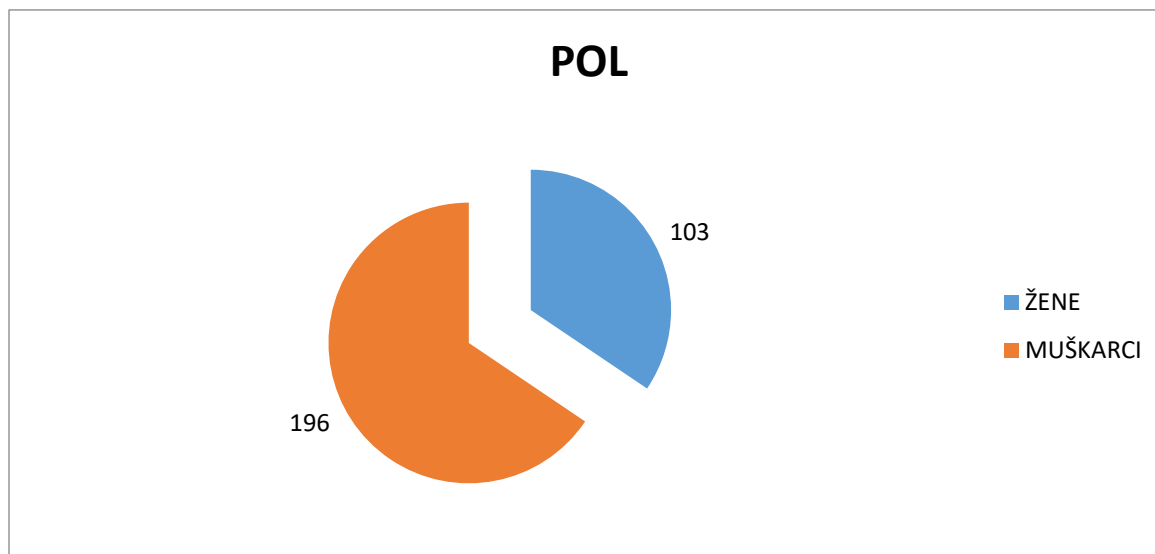
Na slici 5. uočavamo da je najviše pacijenata u grupi od 60-69 godina (45% ispitanika).



Slika 5. Distribucija ispitanika prema dobi

5.2. Analiza pacijenata u odnosu na pol

Od ukupnog broja testiranih pacijenata, njih 196 (66 %) je muškog pola, dok je 103 pacijenta (34 %) bilo ženskog pola (Slika 6).



Slika 6. Distribucija ispitanika prema polu

5.3. Analiza pacijenata u odnosu na zdravstvenu ustanovu u kojoj je uzet uzorak

Najveći broj uzoraka (81 uzorak ili 27.1%) je iz Banjaluke, dok je iz Gradiške 21 uzorak (7%), a iz Prijedora je 14 uzoraka (4.7%), te iz Tuzle 13 (4.3%). Po sedam uzoraka (2.3%) je iz Doboja i Laktaša, a po šest (2%) iz Bijeljine i Teslića. Iz Modriče, Prnjavora, Sarajeva i Trebinja je po pet (1.7%) uzoraka, a iz Dervente, Gradačca, Mrkonjić Grada, Sokoca, Srbca i Zvornika je po četiri (1.3%) uzorka. Po tri (1%) uzorka su iz Broda, Čelince, Kotor Varoša i Ribnika, dok su po dva (0.7%) uzorka iz Istočnog Sarajeva, Kneževa, Kostajnice, Kozarske Dubice, Lopara, Milića, Mostara, Novog Grada, Šipova, Vukosavlja i Zenice, a po jedan (0.3%) uzorak iz Banovića, Bileće, Bratunca, Čitluka, Fojnice, Gacka, Gračanice, Kalesije, Ljubinja, Lukavice, Nevesinja,

Pala, Petrova, Šamca, Šekovića, Teočaka i Višegrada. Za 49 (16.4%) uzoraka je nepoznato mjesto uzimanja.

Iz gradova i opština Republike Srpske je uzeto 218 uzoraka (72.9%), a iz Federacije Bosne i Hercegovine 32 (10.7%) uzorka.

U tabeli 4. je predstavljen prikaz zdravstvenih ustanova iz kojih su se upućivali uzorci na testiranje. Može se uočiti da najveći broj uzoraka iz UKCRS, Banjaluka, a zatim slijedi UKC Tuzla sa 46 uzoraka, SKB Mostar sa 18, te UKC Sarajevo sa 10 uzoraka.

Tabela 4. Ustanove iz kojih su upućivani uzorci na analizu

Ustanova - uzorak	N	%
Institut za patologiju, Beograd	1	0.3
IZPBV Sremska Kamenica	1	0.3
JZU Sveti Vračevi Bijeljina	1	0.3
KB Zenica	3	1.0
OB Bijeljina	2	0.7
OB Doboj	1	0.3
OB Gradiška	1	0.3
SKB Mostar	18	6.0
UKC Banja Luka	215	71.9
UKC Sarajevo	10	3.3
UKC Tuzla	46	15.4
Ukupno	299	100.0

5.4. Analiza pacijenata u odnosu na godinu u kojoj je rađena analiza

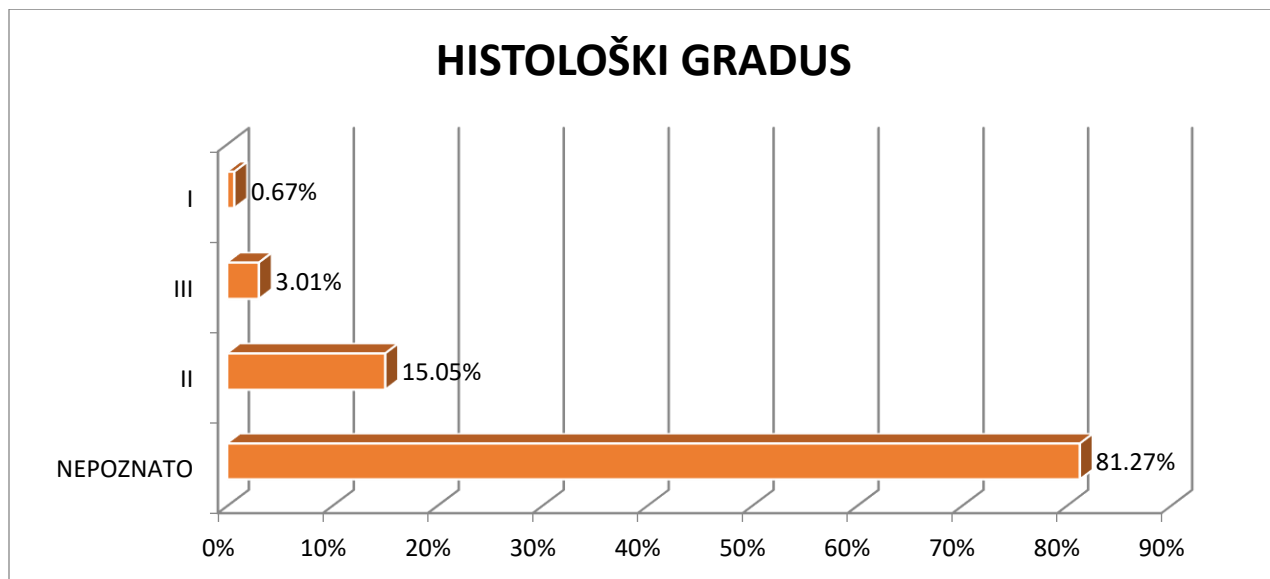
Najveći broj uzoraka je analiziran tokom 2016. godine (23.7%), a najmanji tokom 2014. godine (10%) (tabela 5).

Tabela 5. Analizirani broj uzoraka za period 2013.-2018. godine

Godina	N	%
2013.	52	17.4
2014.	30	10.0
2015.	59	19.7
2016.	71	23.7
2017.	53	17.7
2018.	34	11.4
Ukupno	299	100.0

5.5. Analiza pacijenata u odnosu na histološki gradus tumora

Kod najvećeg broja pacijenata nije bilo podataka o histološkom gradusu bolesti, kod 81,27 %. Kod onih gdje je podatak o gradusu bio poznat, najčešće je riječ o gradusu II (15 %), zatim 3% gradus III i samo 0,67% gradus I (Slika 7).



Slika 7. Prikaz histološkog gradusa u ispitivanim uzorcima

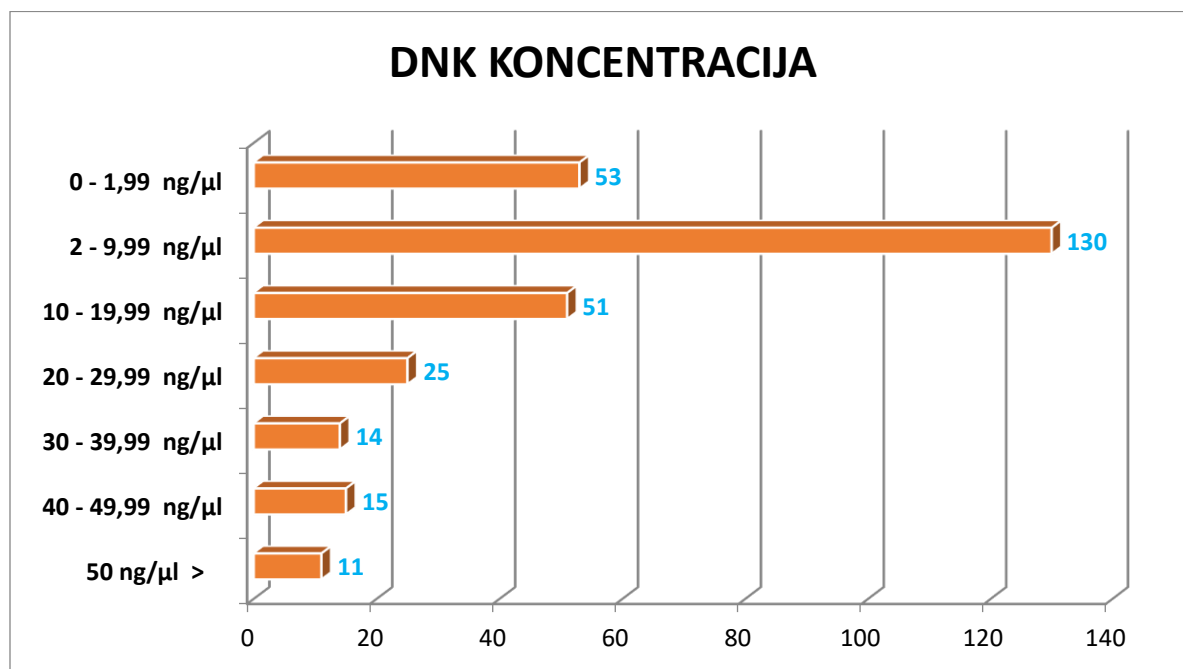
5.6. Analiza pacijenata u odnosu na vrstu analiziranog materijala.

U analiziranom uzorku najčešći materijal je bio biopsijski uzorak (biopsija promjene u sluznici bronha) u 171 slučaja (57,2%), zatim resekcija dijela pluća (pulektomija, lobektomija ili atipična resekcija pluća) u 87 slučaja (29,1%). Najmanji broj uzoraka koji su analizirani su citološki uzorci 16 slučaja (5,4%) (tabela 6).

Tabela 6. Distribucija prema vrsti analiziranih uzoraka

Vrsta uzorka	N	%
Biopsija	171	57.2
Citologija	16	5.4
Resekat	87	29.1
Metastaza	25	8.4
Ukupno	299	100.0

DNK koncentracija testiranih uzoraka je većinom bila iznad 2 ng/μl, kod 246 od ukupno 299 uzoraka. Koncentracija ispod 2 ng/μl je bila kod 53 uzorka. Najveći broj uzoraka je u rasponu od 2 do 9,99 ng/μl, njih 130, a najmanje sa DNK koontcentracijom iznad 50 ng/μl. (Slika 8,tabela 7).



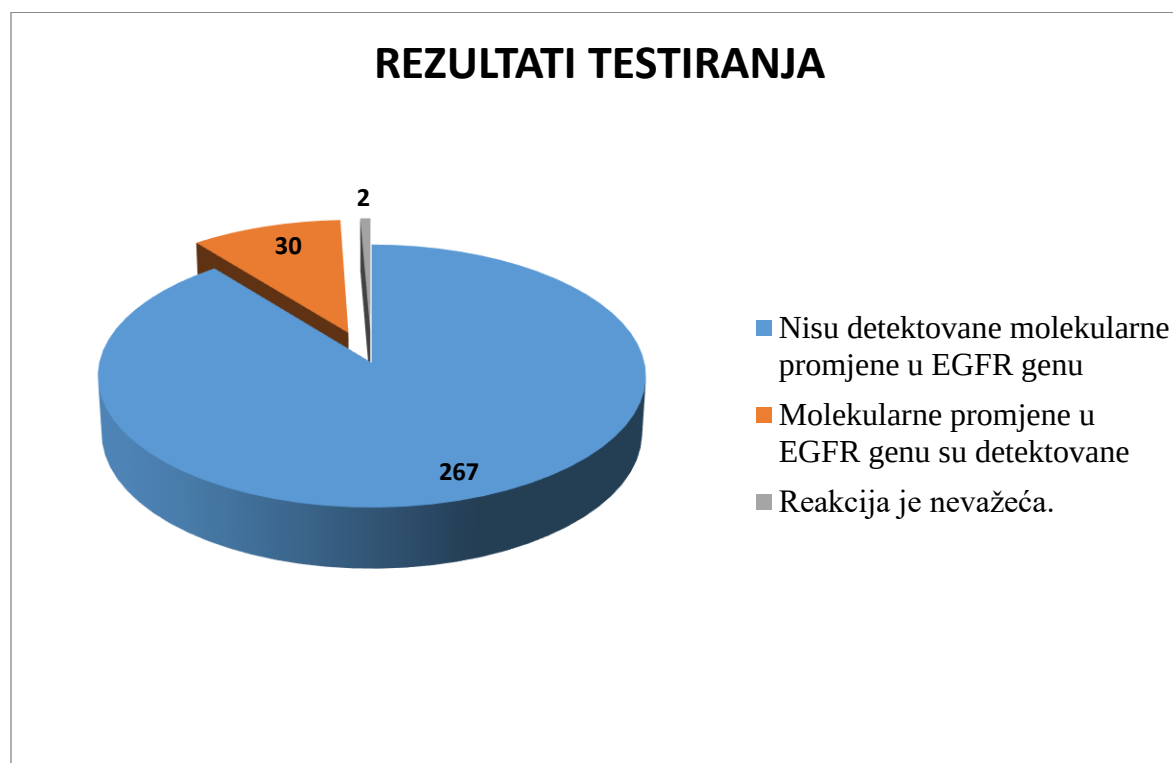
Slika 8. DNK koncentracije testiranih uzoraka

Tabela 7. DNK koncentracija (ng/μl)

N	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
297	0.00	88.40	13.0881	6.5800	16.13271

5.7. Analiza prisustva i tipa molekularnih promjena u EGFR genu u uzorcima nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom

Rezultati testiranja pokazuju da kod 267 uzoraka pacijenata (89,3% slučajeva) nisu detektovane promjene u EGFR genu. Kod 30 uzoraka pacijenata (10 % slučajeva) je detektovana neka od promjena u EGFR genu, dok je kod 2 uzorka pacijenata (0.7% slučajeva) reakcija bila nevažeca (Slika 9).



Slika 9. Prisustvo promjena u EFGR genu u ispitivanim uzorcima pacijenata

Najčešće promjene u EGFR genu su detektovane na egzonu 19. to kod 13 pacijenata (4.3% slučajeva od ukupnog broja uzoraka pacijenata), zatim na egzonu 21. kod 12 pacijenata (4.0% slučajeva od ukupnog broja uzoraka pacijenata), a na egzonu 20. kod 3 pacijenta (1% slučajeva od ukupnog broja uzoraka pacijenata) (Tabela 8).

Tabela 8. Prisustvo promjene na pojedinim egzonima u EGFR genu

Prisustvo promjene	N	%
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 18.	1	0.3
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 19 i egzonu 20.	1	0.3
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 19.	13	4.3
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 20.	3	1.0
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 21.	12	4.0
Nisu detektovane promjene u EGFR genu	267	89.3
Reakcija je nevažeca	2	0.7
Ukupno	299	100.0

5.8. Analiza uticaja pola i dobi pacijenata na prisustvo i tip promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom.

U tabeli 9. je prikazano prisustvo promjene u EGFR genu na pojedinim egzonima u odnosu na pol ispitanika, gdje se može uočiti da su kod žena češće detektovane promjene u EGFR genu na egzonima 19, 20 i 21.

Tabela 9. Prisustvo promjene u EGFR genu na pojedinim egzonima u odnosu na pol ispitanika

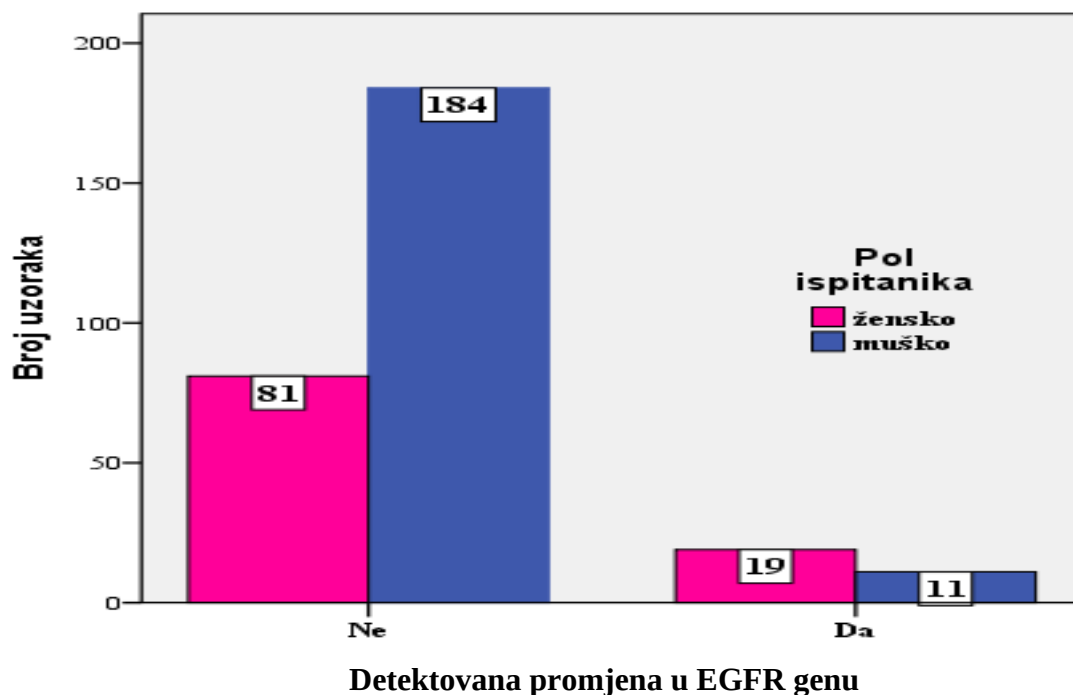
Prisustvo promjene	Pol ispitanika		Ukupno
	žensko	muško	
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 18.	1	0	1
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 19 i egzonu 20.	0	1	1
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 19.	7	6	13
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 20.	3	0	3
Promjena u EGFR genu je detektovana na egzonu 21.	8	4	12
Nisu detektovane promjene u EGFR genu	81	184	265
Reakcija je nevažeca	1	1	2
Ukupno	101	196	297

Prema tipu promjene u EGFR genu, najčešće se uočava delecija (prisutne kod 7 žena i 6 muškaraca), L858R (kod 8 žena i 3 muškarca), te insercija prisutna kod 3 žene (tabela 10).

Tabela 10. Tip promjene u EGFR genu u odnosu na pol ispitanika

Tip promjene	Pol ispitanika		Ukupno
	žensko	muško	
Delecija	7	6	13
Delecija; T790M	0	1	1
G719X	1	0	1
Insercija	3	0	3
L858R	8	4	12
Nedostajući podaci	82	185	267
Ukupno	101	196	297

Posmatrajući samo važeca reakcije možemo uočiti da je promjena u EGFR genu detektovana kod 19 žena i 11 muškaraca (ukupno 30 uzoraka pacijenata) (Slika 10).



Slika 10. Prusustvo promjene u EGFR genu u odnosu na pol ispitanika

Primjenom χ^2 testa, uz korekciju prema Yates-u, dobijena je visoko statistički značajna razlika ($\chi^2 = 11.492$, $p = 0.001$) u broju detektovanih promjena u EGFR genu, u odnosu na pol pacijenta. Promjene u EGFR genu su češće detektovane kod žena.

Tabela 11. prikazuje prisustvo promjene u EGFR genu u odnosu na starost ispitanika. Nisu analizirana 2 uzorka sa nevažećom reakcijom. Možemo uočiti da je prosječna starost pacijenata sa detektovanom promjenom u EGFR genu 63 godine.

Tabela 11. Detektovana promjena u EGFR genu u odnosu na starost pacijenata

Detektovana promjena u EGFR genu	N	Najmlađi	Najstariji	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
Ne	267	44	80	61.65	61.00	7.468
Da	30	49	78	63.07	61.50	7.843
Ukupno	297	44	80	61.79	61.00	7.505

Primjenom Independent Samples t testa nije dobijena statistički značajna razlika ($t = -0.982$, $p = 0.327$) starosti pacijenata kod kojih jeste, u odnosu na pacijente kod kojih nije detektovana promjena u EGFR genu.

Analizirali smo međusobni odnos starosti ispitanika kod kojih je detektovana promjena u EGFR genu, u odnosu na pol (tabela 12).

Tabela 12. Starost ispitanika kod kojih je detektovana promjena u EGFR genu, u odnosu na pol

Pol ispitanika	N	Najmlađi	Najstariji	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
Žensko	19	50	78	62.84	62.00	7.537
Muško	11	49	77	63.45	61.00	8.710
Ukupno	30	49	78	63.07	61.50	7.843

Testirajući pacijente kod kojih je detektovana promjena u EGFR genu, primjenom Mann-Whitney-evog U testa nije dobijena statistički značajna razlika ($z = -0.366$, $p = 0.714$, $r = 0.0668$) starosti pacijenata ženskog ($N = 19$, $Md = 62$) i muškog ($N = 11$, $Md = 61$) pola.

Prosječna starost ispitanika ženskog pola kod kojih je detektovana promjena u EGFR genu iznosi 62 godine, a kod kojih nije detektovana promjena je 60 godina (tabela 13).

Tabela 13. Starost ispitanika ženskog pola i prisustvo promjene u EGFR genu

Detektovana promjena u EGFR genu	N	Najmlađa	Najstarija	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
Ne	81	45	78	60.47	60.00	7.025
Da	19	50	78	62.84	62.00	7.537
Ukupno	100	45	78	60.92	60.00	7.147

Primjenom Mann-Whittney-evog U testa kod ispitanika ženskog pola nije dobijena statistički značajna razlika ($z = -1.139$, $p = 0.255$, $r = 0.1139$) starosti pacijenata kod kojih je detektovana ($N = 19$, $Md = 62$) i kod kojih nije detektovana ($N = 81$, $Md = 60$) promjena u EGFR genu.

Prosječna starost ispitanika muškog pola kod koga je detektovana promjena u EGFR genu je 63 godine, a kod ispitanika kod kojih nije detektovana promjena u genu je 62 godine (tabela 14).

Tabela 14. Starost ispitanika muškog pola i prisustvo promjene u EGFR genu

Detektovana promjena u EGFR genu	N	Najmlađi	Nastariji	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
Ne	184	44	80	62.17	62.00	7.652
Da	11	49	77	63.45	61.00	8.710
Ukupno	195	44	80	62.25	62.00	7.696

Primjenom Mann-Whittney-evog U testa kod ispitanika muškog pola nije dobijena statistički značajna = 0.0316 razlika ($z = -0.441$, $p = 0.659$, r) starosti pacijenata kod kojih je detektovana ($N = 11$, $Md = 61$) i kod kojih nije detektovana ($N = 184$, $Md = 62$) promjena u EGFR genu.

5.9. Analiza uticaja vrste uzorka (citološki, bioptički uzorci, metastaze i resekcioni uzorci) na prisustvo promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom

Tabela 15. prikazuje prisustvo promjena u EGFR genu u odnosu na vrstu uzorka. Nisu analizirana 2 uzorka sa nevažećom reakcijom. Uočavamo da je promjena u genu najčešće bila prisutna u biopsijama i resekatima (Slika 11).

Tabela 15. Vrsta uzorka i prisustvo promjene u EGFR genu

Vrsta uzorka	Detektovana promjena u EGFR genu		Ukupno
	Ne	Da	
biopsija	156	14	170
citologija	15	1	16
resekat	73	13	86
metastaza	23	2	25
Ukupno	267	30	297

Primjenom Fisher-ovog testa nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 1.000$) detektovane promjene u EGFR genu, u odnosu na uzorke uzimane biopsijom i citologijom.

Primjenom χ^2 testa, uz korekciju prema Yates-u, nije dobijena statistički značajna razlika ($\chi^2 = 2.183$, $p = 0.401$) detektovane promjene u EGFR genu, u odnosu na uzorke uzimane biopsijom i resektom.

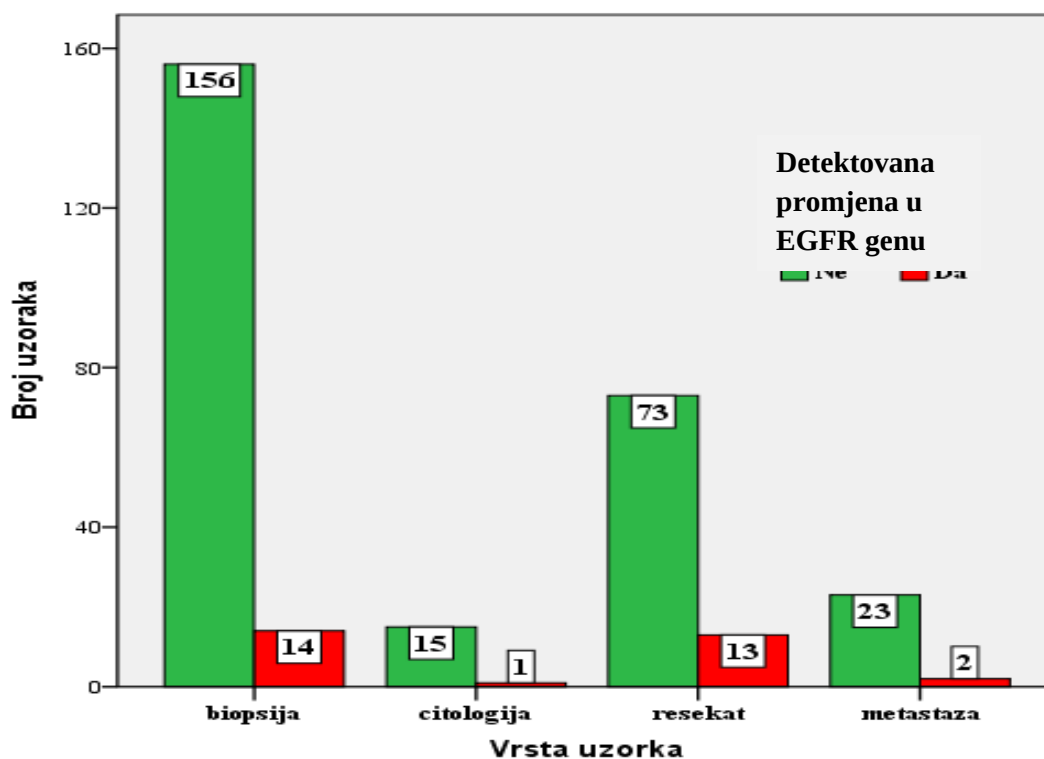
Takođe, nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 1.000$) pri detekciji promjene u EGFR genu, u odnosu na uzorke uzimane biopsijom i metastaze.

Nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 0.691$) primjenom Fisher-ovog testa testirajući detektovane promjene EGFR genu na uzorcima uzimanim citologijom i resektom.

Na uzorcima uzimanim citologijom i metastaze testirajući detektovane promjene u EGFR genu primjenom Fisher-ovog testa nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 1.000$).

Primjenom Fisher-ovog testa nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 0.514$) detektovane promjene u EGFR genu, u odnosu na uzorke uzimane resektom i metastaze.

Dakle, možemo zaključiti da su svi uzorci koji su korišćeni u našem istraživanju pouzdani u pogledu genetskog testiranja sa ciljem utvrđivanja promjena u EGFR genu.



Slika 11. Odnos vrste uzorka i promjene u EGFR genu

5.10. Analiza uticaja kvaliteta i kvantiteta (količina DNK) na prisustvo i tip promjena u EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom

Uočena je najviša vrijednost DNK koncentracije (ng/μl) u metastazama, zatim u resekatima, a znatno niže vrijednosti DNK u biopsijama i citološkim uzorcima (Tabela 16).

Tabela 16. Vrsta uzorka i DNK koncentracija (ng/μl)

Vrsta uzorka	N	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
biopsija	170	0.00	50.30	7.9442	4.0000	10.19376
citologija	16	0.00	51.00	7.1125	2.0000	13.06884
resekat	86	1.01	88.40	20.5563	14.9500	18.32452
metastaza	25	1.83	85.00	26.2004	16.3000	24.33169
Ukupno	297	0.00	88.40	13.0881	6.5800	16.13271

Primjenom Kruskal Wallis-ovog testa dobijena je visoko statistički značajna razlika ($\chi^2 = 70.104$, $p = 0.000$) DNK koncentracije (ng/μl), u odnosu na vrstu uzorka.

Dodatnom primjenom Mann-Whitney-evog U testa dobijena je visoko statistički značajna razlika ($z = -7.515$, $p = 0.000$, $r = 0.4697$) u DNK koncentraciji (ng/μl) kod uzoraka uzimanim biopsijom ($N = 170$, $Md = 4.00$), u odnosu na uzorke uzimane resektom ($N = 86$, $Md = 14.95$). Dobijena je i visoko statistički značajna razlika ($z = -4.284$, $p = 0.000$, $r = 0.3068$) u DNK koncentraciji (ng/μl) kod uzoraka uzimanim biopsijom ($N = 170$, $Md = 4.00$), u odnosu na uzorke metastaze ($N = 25$, $Md = 16.30$).

Visoko statistički značajna razlika ($z = -4.178$, $p = 0.000$, $r = 0.4137$) u DNK koncentraciji (ng/μl) dobijena je i kod uzoraka uzimanim citologijom ($N = 16$, $Md = 2.00$), u odnosu na uzorke resekata ($N = 86$, $Md = 14.95$).

Izmjerena DNK koncentracija (ng/μl) takođe je visoko statistički značajno različita ($z = -3.398$, $p = 0.001$, $r = 0.5307$) kod uzoraka uzimanim citologijom ($N = 16$, $Md = 2.00$), u odnosu na uzorke metastaze ($N = 25$, $Md = 16.30$).

Nije dobijena statistički značajna razlika ($z = -1.824$, $p = 0.068$, $r = 0.1337$) u DNK koncentraciji (ng/μl) kod uzoraka uzimanim biopsijom ($N = 170$, $Md = 4.00$) u odnosu na uzorke uzimane citologijom ($N = 16$, $Md = 2.00$).

Statistički značajna razlika ($z = -0.477$, $p = 0.634$, $r = 0.4697$) u DNK koncentraciji (ng/μl) nije dobijena kod uzoraka uzimanim resektom ($N = 86$, $Md = 14.95$, $r = 0.1438$) u odnosu na uzorke metastaze ($N = 25$, $Md = 16.30$).

Tabela 17. prikazuje vrijednosti koncentracije DNK (ng/μl) u uzorcima u kojima jeste ili nije detektovana promjena u EGFR genu.

Tabela 17. Detektovane promjene u EGFR genu i DNK koncentracija (ng/μl)

Detektovana promjena u EGFR genu	N	Minimum	Maksimum	Srednja vrijednost	Mediana	Standardna devijacija
Ne	265	0.00	88.40	12.7966	6.4800	15.89851
Da	30	0.00	85.50	16.2428	9.2950	18.41618
Ukupno	295	0.00	88.40	13.1471	6.7000	16.17137

Primjenom Mann-Whitney-evog U testa nije dobijena statistički značajna razlika ($z = -1.076$, $p = 0.282$, $r = 0.0626$) u DNK koncentraciji (ng/ μ l) kod uzoraka kod kojih nije detektovana promjena u EGFR genu ($N = 265$, $Md = 6.48$), u odnosu na uzorke kod kojih je detektovana promjena u EGFR genu ($N = 30$, $Md = 9.295$).

5.11. Analiza uticaja postupanja sa uzorkom u različitim zdravstvenim ustanovama na prisustvo promjena na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom

Tabela 18. prikazuje prisustvo ili odsustvo promjena u EGFR genu s obzirom na zdravstvenu ustanovu iz koje se šalje uzorak na analizu. Može se uočiti da je u uzorcima koji su analizirani iz UKCRS Banjaluka najveći broj detektovanih promjena u EGFR genu.

Tabela 18. Prisustvo promjena u EGFR genu i zdravstvene ustanove iz kojih su se slali uzorci pacijenata na analizu

Ustanova - uzorak	Detektovana promjena u EGFR genu			Ukupno
	Ne	Da	Reakcija nevažeca	
Institut za patologiju, Beograd	1	0	0	1
IZPBV Sremska Kamenica	1	0	0	1
JZU Sveti Vračevi, Bijeljina	1	0	0	1
KB Zenica	3	0	0	3
OB Bijeljina	1	1	0	2
OB Doboj	0	1	0	1
OB Gradiška	1	0	0	1
SKB Mostar	17	1	0	18
UKCRS Banja Luka	189	24	2	215
UKC Sarajevo	8	2	0	10
UKC Tuzla	45	1	0	46
Ukupno	267	30	2	299

Analizirali smo prisustvo ili odsustvo promjene u EGFR genu, s obzirom na entitet iz kojeg su se uzorci slali na analizu. U uzorcima koji su se slali na analizu iz Republike Srpske promjena u EGFR genu je detektovana kod 26 uzoraka pacijenata, a iz Federacije BiH kod 4 uzorka pacijenata (tabela 19).

Tabela 19. Prisustvo promjene u EGFR genu i entitet iz kojeg su se slali uzorci pacijenata na analizu

Entitet	Detektovana promjena u EGFR genu		Ukupno
	Ne	Da	
Republika Srpska	195	26	221
Federacija BiH	72	4	76
Ukupno	267	30	297

Primjenom Fisher-ovog testa nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 0.125$) detektovane promjene u EGFR genu, u odnosu na entitet u kome je uziman uzorak.

6. DISKUSIJA

Karcinom pluća je glavni uzrok smrti u cijelom svijetu, sa najvećom stopom smrtnosti u odnosu na ostale karcinome, sa 19,4%. Duvanski dim se smatra najvećim uzročnikom, te je učestalost izraženija u razvijenim zemljama [3,4]. U našoj studiji, s obzirom da nismo imali podatke o pušačkim navikama posmatranih pacijenata, taj podatak nismo upoređivali sa ostalim studijama i izvještajima. Od svih tipova karcinoma pluća, najzastupljeniji je non-small cell lung cancer (NSCLC), koga nalazimo kod oko 80% oboljelih od karcinoma pluća. Nedavni napredak u liječenju je postignut upravo kod ove vrste karcinoma pluća [77, 110]. Identifikacija mutacija epidermalnog faktora rasta u NSCLC, utrla je put personalizovanoj terapiji kod karcinoma pluća sa inhibitorima EGFR-tirozin kinaze (TKIs) [111]. Molekularnim testiranjem je omogućen pravilan izbor pacijenata kojima je time pružena mogućnost za ciljanu terapiju. Time je došlo do povećanja ukupnog preživljavanja pacijenata sa adenokarcinomom pluća [112].

Dominantan pol među testiranim pacijentima, sa dijagnozom adenokarcinoma je bio muški (66%), što je suprotno navodima većine sličnih studija. Nasuprot tom podatku, dominantan pol pacijenata sa dokazanim projenama u EGFR genu je ženski (63%), što je u skladu sa ostalim navosima u literaturi [97, 112, 113].

Životna dob pacijenata se kretala između 44 i 80 godina, prosječne starosti 61 godina, što je u skladu sa podacima iz literature koji navode da od karcinoma pluća obolijevaju osobe starosti od 44 do 89 godina [114]. Najviše testiranih pacijenata, gotovo polovina, je bilo starosti od 60-69 godina (45%). Prosječna starost pacijenata sa detektovanom promjenom u EGFR genu 63 godine.

Iz gradova i opština Republike Srpske je uzeto 218 uzoraka (72.9%), a iz Federacije Bosne i Hercegovine 32 (10.7%) uzorka. U uzorcima koji su analizirani iz UKCRS Banjaluka najveći broj detektovanih promjena u EGFR genu. Analizirali smo prisustvo ili odsustvo promjene u EGFR genu, s obzirom na entitet iz kojeg su se uzorci slali na analizu. U uzorcima koji su se slali na analizu iz Republike Srpske promjena u EGFR genu je detektovana kod 26 uzoraka

pacijenata, a iz Federacije BiH kod 4 uzorka pacijenata. Nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 0.125$) detektovane promjene u EGFR genu, u odnosu na entitet u kome je uziman uzorak. Ova analiza nam ukazuje da je postupanje sa uzorcima na kojima se radi testiranje adekvatno u svim zdravstvenim ustanovama, i da nije uticalo na rezultate testiranja.

Kod najvećeg broja pacijenata (81,27 % slučajeva) nije bilo podataka o histološkom gradusu bolesti. Kod onih gdje je podatak o gradusu bio poznat, najčešće je riječ o gradusu II (15 %), zatim kod 3% slučajeva gradus III i samo 0,67% gradus I. Fibla i saradnici u svojoj studiji su uočili da je najčešće bio prisutan gradus I, odnosno gradus IA i to kod pacijenata ženskog pola. [115].

Učestalost mutacija epidermalnog faktora rasta varira od 20% do 40% kod indijskih pacijenata [113], te 10% kod pacijenata iz Evrope i Australije i 30% kod bolesnika iz Japana i Tajvana [106]. Rezultati studije potvrđuju rezultate testiranja evropskih pacijenata. U našem istraživanju kod 267 uzoraka pacijenata (89,3% slučajeva) nisu detektovane promjene u EGFR genu. Kod 30 uzoraka pacijenata (10 % slučajeva) je detektovana neka od promjena u EGFR genu, dok je kod 2 uzorka pacijenata (0.7% slučajeva) reakcija bila nevažeca. Kimura i saradnici su ispitivali mutacije u EGFR genu kod 24 pacijenta sa non-small cell lung cancer (NSCLC). Prosječna satrost ispitanika je 62 godine, a mutacije na EGFR genu su uočene kod tri pacijenta (12.5%), što je u skalu sa našim rezultatima [116].

Inamura navodi da su najčešće uočene promjene u EGFR genu u početnim stadijumima razvoja adenokarcinoma pluća, odnosno u stadijumu atipične adenomatozne hiperplazije, adenokarcinoma in situ, te minimalno invazivnog adenokarcinoma [117].

Najčešće promjene u EGFR genu su detektovane na egzonu 19. i to kod 13 pacijenata (4.3% slučajeva od ukupnog broja uzoraka pacijenata), zatim na egzonu 21. kod 12 pacijenata (4.0% slučajeva od ukupnog broja uzoraka pacijenata), a na egzonu 20. kod 3 pacijenta (1% slučajeva od ukupnog broja uzoraka pacijenata), što je u skladu sa navodima ostalih studija [118, 119, 120]. Kod žena češće detektovane promjene u EGFR genu na egzonima 19, 20 i 21. Beau-Faller sa saradnicima je radio multicentričnu studiju mutacija na EGFR genu kod 10117 pacijenta oboljelih od NSCLC. Autori su ispitivali učestalost mutacija na EGFR genu na egzonu 18. i 20.,

te su utvrdili da su opisane mutacije prisutne kod 102 pacijenta (10%), što se razlikuje u odnosu na naš rezultat vezan za mutaciju na egzonu 20. koju smo uočili kod tri pacijenta, odnosno 1% [121].

Prema tipu promjene u EGFR genu, najčešće se uočava delecija (prisutne kod 7 žena i 6 muškaraca), L858R (kod 8 žena i 3 muškarca), te insercija prisutna kod 3 žene. Zhou i saradnici su u svojoj studiji ustanovili da je od 219 pacijenata sa adenokarcinomom pluća EGFR mutacija bila prisutna kod 111 pacijenata (50.7%), uključujući 61 pacijenta sa L858R mutacijama 55%), 40 pacijenata sa 19-Del (36%), 5 pacijenata sa L861Q (4.5%), 3 pacijenta sa G719X (2.7%) i 2 pacijenta sa 20-Ins (1.8%). EGFR mutacije su bile prisutne kod 70.5% žena, u odnosu na muškarce. Autori su takođe uočili da pacijenti sa mutacijom 19-Del or L858R imaju bolju prognozu u liječenju, u odnosu na druge tipove promjena na EGFR genu [122].

Testirani su pacijenti sa teritorije BiH, te su uzorci bili iz raznih centara. Najviše uzoraka je bilo iz Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (UKCRS) Banja Luka, 215 uzoraka (72%), zatim iz Univerzitetskog kliničkog centra (UKC) Tuzla 46 uzoraka (15,4%), iz Sveučilišne kliničke bolnice (SKB) Mostar 18 uzoraka (6%), te iz Univerzitetskog kliničkog centra Sarajevo (UKCS) 10 uzoraka (3,3%). Iz ostalih centara iz Republike Srpske i Federacije BiH je bilo 1 do 3 uzorka za testiranje.

Posmatrajući rezultate testiranja i ustanove iz kojih su uzorci, EGFR mutacije su najčešće detektovane kod pacijenata iz UKCRS, 24 od ukupno 30 detektovanih mutacija (80%), zatim iz UKC Sarajeva 7%, SKB Mostar 4% i po 3% iz UKC Tuzla, JZU Sveti Vračevi Bijeljina, te iz Opšte bolnice Doboj.

Mnoge studije su se, tokom svog istraživanja, bavile procjenom količine i kvaliteta uzoraka za EGFR testiranja, jer se smatra da su presudni za izvođenje pouzdane analize. Nekoliko članaka je pokazalo adekvatnost uzoraka citologije FNA za testiranje EGFR mutacija, ali ih nisu upoređivali sa uparenim hirurškim uzorcima [123, 124]. Za razliku od našeg istraživanja, mnogobrojne studije ukazuju na praktičnost i pouzdanosti utvrđivanja promjena u EGFR genu analizom citoloških uzoraka [125].

Analizirajući promjene u EGFR genu kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća, Kobayashi sa saradnicima navodi da je detekcija EGFR mutacija u uzorcima seruma pomoću COBAS ver2, može biti jednako pouzdana kao i u uzorcima plazme, dok biopsije tkiva ostaju zlatni standard [126].

Iako se citološki uzorci rutinski koriste u dijagnostici karcinoma pluća, ipak se preporučuje status molekularnog testiranja EGFR mutacija temeljiti na osnovu nalaza iz uzoraka biopsije ili resekcije, a ne na uzorcima citologije [119]. Takvo mišljenje je istaknuto i u nekoliko studija (Smouse i saradnici) [127]. Veliki problem kod citoloških, pa i bioptičkih uzoraka jeste niska celularnost.

Procentualnu zastupljenost tumorskih ćelija smo povećavali selektivnim struganjem sa pločice citološkog uzorka, odnosno mikrodisekcijom tumora u FFPE bioptičkih, pa i resekcionih uzoraka. Time smo smanjili broj zapaljenskih i stromalnih ćelija, kao i nekroze.

U analiziranom uzorku najčešći materijal je bio bioptički uzorak (biopsija promjene u sluznici bronha) u 57,2% slučajeva, zatim resekcija dijela pluća (pulektomija, lobektomija ili atipična resekcija pluća) u 29,1% slučajeva. Najmanji broj uzoraka koji su analizirani su citološki uzorci 16 slučajeva (5,4%). Uočavamo da je promjena u genu najčešće bila prisutna u biopsijama i resekatima. Analiza uticaja vrste uzorka kod naših ispitanika (citološki, bioptički uzorci, metastaze i resekcionni uzorci) na prisustvo promjena na EGFR genu, ukazuje da nema statistički značajne razlike između vrsta uzoraka i promjena u EGFRF genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom.

Dakle, možemo zaključiti da su svi uzorci koji su korišćeni u našem istraživanju pouzdani u pogledu genetskog testiranja sa ciljem utvrđivanja promjena u EGFR genu.

DNK koncentracija testiranih uzoraka je većinom bila iznad 2 ng/μl, kod 246 od ukupno 299 uzoraka. Koncentracija ispod 2 ng/μl je bila kod 53 uzorka. Najveći broj uzoraka je u rasponu od 2 do 9,99 ng/μl, njih 130, a najmanje sa DNK koncentracijom iznad 50 ng/μl.

Uočena je najviša vrijednost DNK koncentracije (ng/μl) u metastazama, zatim u resekatima, a znatno niže vrijednosti DNK u biopsijama i citološkim uzorcima.

U analizi naših ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika DNK koncentracije ($\text{ng}/\mu\text{l}$), u odnosu na vrstu uzorka i to kod uzoraka uzimanim biopsijom, u odnosu na uzorke uzimane resektom, kao i u odnosu na uzorke metastaze. Takođe, utvrđena je statistički značajna razlika kod uzoraka uzimanim citologijom, u odnosu na uzorke resekata, te na uzorke uzimane citologijom. Nema značajne razlike u DNK koncentraciji u uzorcima dobijenim biopsijom, u odnosu na uzorke uzimane citologijom, kao ni kod uzoraka uzimanih resektom, u odnosu na uzorke metastaze. Ovi rezultati ukazuju na to da što se tiče koncentracije DNA isti je u sitnim biopsijskim uzorcima i citološkim materijalima. Svakako najoptimalniji uzorak se dobija resekcijom tumora pluća ili resekcijom metastaze.

Bolje razumijevanje mehanizma tumorogeneze adenokarcinoma pluća može omogućiti razvoj efikasnih preventivnih, skrining i terapijskih strategija.

7. ZAKLJUČCI

1. Molekularne promjene na EGFR genu u našem istraživanju su verifikovane u 10% slučajeva:
Najčešće je bila promjena na egzonu 19 u 43,3% slučajeva;
Najčešći tip genetski promjena u EGFR genu u istraživanju je bila delecija u 43,3% slučajeva i mutacija L858R u 40% slučajeva.
2. Genetske promjene na EGFR genu kod pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog karcinoma sa adenodiferencijacijom se statistički značajno češće sreću kod žena ($\chi^2 = 11.492$, $p = 0.001$);
U našem istraživanju nije utvrđen uticaj starosti na prisustvo genetskih promjena u EGFR genu ($t = -0.982$, $p = 0.327$);
3. Najveći broj detektovanih genetskih promjena u EGFR genu je bio u sitnim biopsijskim materijalima 46,7% i resektima (različite vrste resekcije tumora pluća) u 43,3% slučajeva.
Statistički značajna razlika nije utvrđena u pogledu prisustva ili odsustva promjena u EGFR genu s obzirom na vrstu uzorka (biopsija, resekcija, metastaza i citološki uzorci).
4. Količina DNK je statistički značajno veća u materijalima koji su dobijeni resekcijom ili metastazektomijom u odnosu na materijale koji su dobijeni biopsijom i u citološkim materijalima;
Po koncentraciji DNK razlika nije utvrđena u materijalima koji su dobijeni biopsijom i citologijom.
5. Analiza prisustva genetskih promjena na EGFR genu je rađena na uzorcima iz jedanaest zdravstvenih ustanova iz Republike Srpske i Federacije Bosne i Hercegovine. Najveći broj testiranih uzoraka je iz UKC RS 72% uzoraka. I najveći broj promjena na EGFR

genu je detektovan u materijalima iz UKC RS 80% ukupno detektovanih genetskih promjena u EGFR genu.

6. S obzirom na prisustvo ili odsustvo genetskih promjena na EGFR genu nije dokazana statistički značajna razlika sobzirom na entitet (Republika Srpska ili Federacija Bosne i Hercegovine) i s obzirom na zdravstvenu ustanovu iz koje je dostavljen materijal na analizu.
7. Na osnovu navedenog možemo zaključiti da su postupanja sa materijalima slična u svim zdravstvenim ustanovama i u ovom istraživanju nisu uticala na rezultate testiranja.

8. LITERATURA

1. World Health Organization. "Tobacco." www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/. Date last updated: May 2017
2. Sadeghi-Gandomani H, Asgari-Tarazoj A, Ghonchen M, Yousefi SM, Delaram M, Salehiniya H. Lung cancer in the world: the incidence, mortality rate and risk factors. *World Cancer Research Journal WCRJ* 2017; 4 (3): e911
3. Amin M.B., Edge S.B., Greene F.L., et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Ed. New York: Springer ; 2017
4. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. *Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC; Lyon, France: 2004.
5. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. 2011 Dec; 32(4): 605-44.
6. Pear R. Tobacco smoking and longevity. *Science*. 1938;87(2253):216–217
7. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950;2(4682):739–748.
8. Wynder EL, Graham EA. Etiologic factors in bronchiogenic carcinoma with special reference to industrial exposures; report of eight hundred fifty-seven proved cases. *Am J Arch Ind Hyg Occup Med*. 1951;4(3):221–235.
9. Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F, et al. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. *J Thorac Dis* 2016; 8: 1094-1102
10. Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*. 1997 Aug 1;146 (3):223-30.
11. Voorrips L, Goldbohm A, Brants H, et al. A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Apr;9(4):357-65.
12. The American Cancer Society medical and editorial content team, Last Medical Review: February 18, 2016 Last Revised: February 22, 2016

13. Ganie FA, Wani ML, Lone H, Wani SN, Hussain SA. Carcinoma lung: Clinical presentation, diagnosis, and its surgical management Department of Cardiovascular Thoracic Surgery, Sher-i-Kashmir Institute of Medical Sciences, Soura, Srinagar, Jammu and Kashmir, India, Decembar 2013.
14. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck R. Lung Cancer: Diagnosis and Management Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, Pennsylvania, Januar 2007.
15. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP Evidenced-based clinical practice guidelines (2nd Edition). Chest 2007;132;149–60
16. Hamilton W, Sharp D. Diagnosis of lung cancer in primary care: a structured review. Fam Pract 2004; 21:605– 611
17. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. Chest. 2003 Jan;123(1 Suppl):97S-104S
18. Yellin A, Rosen A, Reichert N, et al. Superior vena cava syndrome. Am Rev Respir Dis 1990; 141:1114–1118
19. Dasan A, Kalanayak V, Deepashri B. Solitary Fibular Metastasis from Hilar Adenocarcinoma of Lung. J Postgrad Med Edu Res 2015;49(2):79-82
20. Pretreatment evaluation of non-small-cell lung cancer. The American Thoracic Society and The European Respiratory Society. Amer J Respir Crit Care Med 1997;156:320–332
21. Silvestri GA, Tanoue LT, Margolis ML, Barker J, Detterbeck F. The Noninvasive Staging of Non-small Cell Lung Cancer, January 2003, Volume 123, Issue 1, Supplement, Pages 147S–156S
22. Gefter WB. Magnetic resonance imaging in the evaluation of lung cancer. Semin Roentgen 1990;25:73–84.
23. Khalil A, Majlath M, Gounant V, Hess A, Laissy JP, Debray MP. Contribution of magnetic resonance imaging in lung cancer imaging. Diagn Interv Imaging. 2016 Oct; 97(10):991-1002. Epub 2016 Sep 29.

24. Khiewvan B, Ziai P, Houshmand S, Salavati A, Ziai P, Alavi A. The role of PET/CT as a prognosticator and outcome predictor in lung cancer. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(3):317-30
25. N. Hollings, P. Shaw. Diagnostic imaging of lung cancer. *ERS Journals Ltd* 2002; 19: 722–742.
26. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2015.
27. Thomas KW, Gould MK, Tumor, Node, Metastasis (TNM) staging system for lung cancer; UpToDate; Oct 15, 2019.
28. UyBico SJ, Wu CC, Suh RD, Le NH, Brown K, Krishnam MS. Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls :Aug 31 2010.
29. <https://radiologyassistant.nl/chest/lung-cancer-tnm-8th-edition>
30. NCCN Guidelines Version 7.2019. Non-Small Cell Lung Cancer. July 2012.
31. Eri Z. Patologija respiratornog sistema. Medicinski fakultet Novi Sad. Simbol, 2002;110-4.
32. Byrd RB, Miller WE, Carr DT, Payne WS, Woolner LB. The roentgenographic appearance of squamous cell carcinoma of the bronchus. *Mayo Clin Proc* 1968. 43: 327-332.
33. Shure D . Radiographically occult endobronchial obstruction in bronchogenic carcinoma. *Am J Med*, 1991, 91: 19-22.
34. Fraser RS, Müller NL, Colman N, Pare PD. Pulmonary carcinoma. In: Fraser's and Pare's Diagnosis of Diseases of the Chest, WB Saunders: Philadelphia 1999; pp. 1069-1228
35. Curran WJ Jr . Therapy of limited stage small cell lung cancer. *Cancer Treat Res* 2001. 105: 229-252
36. Brambilla E, Moro D, Veale D, Brichon PY, Stoeber P, Paramelle B, Brambilla C . Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: a new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Hum Pathol* 1992; 23: 993-1003

37. Ashley DJ, Davies HD. Mixed glandular and squamous-cell carcinoma of the bronchus. *Thorax* 1967. 22: 431-436. 85. Ashmore PG. Papilloma of the bronchus - case report. *J Thorac Surg* 1954. 27: 293-294.
38. Fishback NF, Travis WD, Moran CA, Guinee DGJr, McCarthy WF, Koss MN . Pleomorphic (spindle/giant cell) carcinoma of the lung. A clinicopathologic correlation of 78 cases. *Cancer* 1994. 73: 2936- 2945
39. Beasley MB, Thunnissen FB, Brambilla E, Hasleton P, Steele R, Hammar SP, Colby TV, Sheppard M, Shimosato Y, Koss MN, Falk R, Travis WD. Pulmonary atypical carcinoid: predictors of survival in 106 cases. *Hum Pathol* 2000. 31: 1255-1265
40. Kodama T, Shimosato Y, Koide T, Watanabe S, Yoneyama T. Endobronchial polypoid adenocarcinoma of the lung. Histological and ultrastructural studies of five cases. *Am J Surg Pathol* 1984. 8: 845-854.
41. Koss M, Travis W, Moran C, Hochholzer L. Pseudomesotheliomatous adenocarcinoma: a reappraisal. *Semin Diagn Pathol* 1992. 9: 117-12.
42. Colby TV, Koss M, Travis WD. Tumors of the Lower Respiratory Tract. 3rd ed. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC 1995.
43. Funai K, Yokose T, Ishii G, Araki K, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A . Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 2003. 27: 978-984.
44. Kumar V, abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition - 8th Edition. Jun 2009.
45. Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evi-dence-based clinical practice guidelines (2nd edition).*Chest* 2007;132:131S–148S.
46. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer=American Thoracic Society=European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:668–684
47. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC; 2011.

48. Mäkinen, Johanna, Lung adenocarcinoma. Histopathological features and their association with patient outcome University of Oulu Graduate School; University of Oulu, Finland, 2017.
49. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* (2005) 97(5):339–46.
50. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med* (2010) 134(1):66–72.
51. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, et al. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* (2014) 20(12):3087–93.
52. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front. Oncol* 2017. 7:193.
53. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353:133-144.
54. Mazieres J, Zalcman G, Crino L, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 2015; 33:992-999.
55. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371:1963-1971.
56. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, et al. Response to cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 2013; 3:630-635
57. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30:863-870.
58. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323:561-565.
59. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol* 2008; 26:1472-1478.

60. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol* 2015;10:768-777
61. Ali G, Proietti A, Pelliccioni S, et al. ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical approach and fluorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1449-1458
62. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17:984-993.
63. Lindeman NI, Philip T, Cagle Dara L et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology *J Thorac Oncol*; 2018 Mar;13(3):323-358
64. Shim HS, Choi YL, Kim L, et al. Molecular Testing of Lung Cancers; The Korean Cardiopulmonary Pathology Study Group and The Korean Molecular Pathology Study Group; *J Pathol Transl Med*. 2017 May; 51(3): 242–254.
65. Wood K, Hensing T, Malik R, Salgia R. Prognostic and predictive value in KRAS in non-small-cell lung cancer: a review. *JAMA Oncol*. 2016;2:805–12
66. Shim HS, Kenudson M, Zheng Z, et al. Unique genetic and survival characteristics of invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Oncol*. 2015;10:1156–62
67. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring *BRAF* mutations. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2046–51.
68. Mazieres J, Peters S, Lepage B, et al. Lung cancer that harbors an *HER2* mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*. 2013;31:1997–2003
69. Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and Genomic Profiling of Non–Small-Cell Lung Cancer: Implications for Current and Future Therapies; *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10; 31 (8): 1039-1049.

70. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012.; CA Cancer J Clin. 2012 Jul-Aug; 62(4):220-41.
71. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. Lancet Oncol. Februar 2011; 12(2):175-80.
72. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med. 2010; 362:2380–2388.
73. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2010;363:1693–1703.
74. Parikh PM, Ranade AA, Govind B, Ghadyalpatil N, Singh R, Bharath R, *et al.* Lung cancer in India: Current status and promising strategies. South Asian J Cancer 2016; 5:93-5.
75. Shiau CJ, Babwah JP, Santos GC, Sykes JR, Boerner SL, Geddie WR, et al. Sample Features Associated with Success Rates in Population-Based EGFR Mutation Testing. Journal of Thoracic Oncology. Juli 2014; 9: 947–956
76. Smouse JH, Cibas ES, Janne PA, Joshi VA, Zou KH, Lindeman NI. EGFR mutation are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer. Cancer. 2009 Feb 25;117(1):67-72.
77. Santos G, Saieg MA, Geddie W, Leighl N. *EGFR* gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma: controversies and opportunities. Cancer Cytopathol 2011; 119: 80–91.
78. Pang B, Dettmer M, Ong CW, Dhewar AN, Gupta S, Lim GL et al. The positive impact of cytological specimens for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: a single South East Asian laboratory's analysis of 670 cases. Cytopathology 2012; 23: 229–236.
79. Ellis PM, Blaise N, Soulieres D, Ionescu DN, Kashyap M, Liu G et al. A systematic review and Canadian consensus recommendations on the use of biomarkers in the treatment of non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2011; 6: 1379–1391.
80. Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, Galli A, Russo A, Cesario A et al. EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on EGFR Oncogenic Mutation. Int J Med Sci 2013; 10(3): 320–330.

81. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thoracic Oncol* 2011; 6: 244–28
82. Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(18):5646–5661
83. Tsao AS, Tang XM, Sabloff B, Xiao L, Shigematsu H, Roth J, Spitz M, Hong WK, Gazdar A, Wistuba I. Clinicopathologic characteristics of the *EGFR* gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006;1:231–239
84. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 20; 26(6):983-94.
85. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM et al. European EGFR Workshop Group. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol*. 2010 Oct; 5(10):1706-13.
86. Travis W, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A. et al. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology. Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 May; 137(5): 668–684.
87. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med*. 2012;366:883–892.
88. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) *Nucleic Acids Res*. 1989;17:2503–2516
89. Santos G. Standardizing preanalytical variables for molecular cytopathology. *Cancer Cytopathol* 2013;121:341-43
90. Jain D, Ramachandrappa VS, Singh V, Malik PS, Madan K, Faruq M, *et al.* Use of exfoliative specimens and fine-needle aspiration smears for mutation testing in lung adenocarcinoma. *Acta Cytol* 2017;61:455-61

91. Ofiara LM, Navasakulpong A, Beaudoin S, Gonzales AV. Optimizing tissue sampling for the diagnosis, subtyping, and molecular analysis of lung cancer. *Front Oncol.* 2014 Sep 22;4:253
92. Allegrini S, Antona J, Mezzapelle R, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, et al. Epidermal growth factor receptor gene analysis with a highly sensitive molecular assay in routine cytologic specimens of lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2012 Sep;138(3):377-81
93. Mok TS, Carbone DP, Hirsch FR. International Association for the Study of Lung Cancer, Aurora, CO, U.S.A. IASLC ATLAS OF EGFR TESTING IN LUNG CANCER. *J Thorac Oncol.* 2016 Jul;11(7):946-63
94. Heymann JJ, Bulman WA, Maxfield RA, et al. Molecular testing guidelines for lung adenocarcinoma: Utility of cell blocks and concordance between fine-needle aspiration cytology and histology samples. *Cytojournal.* 2014; 11: 12.
95. Nalwa A, Walia R, Singh V, Madan K, Mathur S, Iyer V, *et al.* Comparison of conventional smear and liquid-based cytology preparation in diagnosis of lung cancer by bronchial wash and transbronchial needle aspiration. *J Cytol* 2018;35:94-8.
96. Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, Galli A, Russo A, Cesario A et al. EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on EGFR Oncogenic Mutation. *Int J Med Sci* 2013; 10(3): 320–330
97. Parikh PM, Ranade AA, Govind B, Ghadyalpatil N, Singh R, Bharath R, *et al.* Lung cancer in India: Current status and promising strategies. *South Asian J Cancer* 2016; 5:93-5
98. Mok TS, Carbone DP, Hirsch FR. Colorado: Iaslc atlas of EGFR testing in lung cancer. International Association for the Study of Lung Cancer publication, 2017
99. Parikh PM, Ranade AA, Govind B, Ghadyalpatil N, Singh R, Bharath R, *et al.* Lung cancer in India: Current status and promising strategies. *South Asian J Cancer* 2016; 5:93-5
100. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chang JY, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 2018 Jul;16(7):807-821

101. Wu YL, Saijo N, Thongprasert S, Yang JC, Han B, Margono B, et al. Efficacy according to blind independent central review: Post-hoc analyses from the phase III, randomized, multicenter, IPASS study of first-line gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in Asian patients with EGFR mutation-positive advanced NSCLC. *Lung Cancer*. 2017 Feb;104:119-125
102. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*. 2013 Sep;108(3):370-7.
103. Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 1;23(31):8081-92.
104. Hu H, Pan Y, Li Y, Wang L, Wang R, Zhang Y et al. Oncogenic mutations are associated with histological subtypes but do not have an independent prognostic value in lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014 Aug 13;7:1423-37.
105. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73
106. Bruce E. Johnson and Pasi A. Jänne. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2005 Sep 1;65(17):7525-9.
107. Erić-Marinković J, Dotlić R, Janošević S, Kocev N, Gajić M, Ille T, Stanisavljević D, Babić D. Statistika za istraživače u oblasti medicinskih nauka, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2001.
108. Lovrić M, Komić J, Stević S. Statistička analiza – metodi i primjena, II izmijenjeno i dopunjeno izdanje, JU Narodna i univerzitetska biblioteka Republike Srpske, Banja Luka, 2017.
109. Preradović Lj, Đajić V. Analitičko-statističke tehnike u savremenim istraživanjima, Arhitektonsko-građevinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, Banja Luka, 2011.
110. Gazdar AF. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:1018-1020.
111. A Chougule, S Basak, Epidermal growth factor receptor T790M testing in progressed lung cancer: A review of sensitive methods for analysis of tissue and liquid biopsy samples. Review article, 2017 Dec; 54: 45-54.

112. Veldore VH, Rao RM, Kakara S, Pattanayak S, Tejaswi R, Sahoo R, *et al.* Epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung carcinomas: A retrospective analysis of 1036 lung cancer specimens from a network of tertiary cancer care centers in India. *Indian J Cancer* 2013;50:87-93
113. Suqin Y, Zhuang Y, ZHUANG Y, Zhou Y, *et al.* A comparison of epidermal growth factor receptor mutation testing methods in different tissue types in non-small cell lung cancer. 2016 Jan;72(1):1-11
114. Khode R, Larsen DA, Culbreath BC; Comparative Study of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Analysis on Cytology Smears and Surgical Pathology Specimens From Primary and Metastatic Lung Carcinomas; Original Article; Published online January 30, 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)
115. Fibla J, Molins L, Quero F *et al.* Perioperative outcome of lung cancer surgery in women: results from a Spanish nationwide prospective cohort study *J Thorac Dis.* 2019 Apr; 11(4): 1475–1484
116. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T. *et al.* High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci*; July 2006: vol. 97: 642–648
117. Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr; 19(4): 1259.
118. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol.* 2008;21:S16-S22.
119. Otani H, Toyooka S, Soh J, *et al.* Detection of EGFR gene mutations using the wash fluid of CT-guided biopsy needle in NSCLC patients. *J Thorac Oncol.* 2008;3:472-476.
120. Billah S, Stewart J, Staerckel G, Chen S, Gong Y, Guo M. EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma: molecular testing by using cytology specimens. *Cancer (Cancer Cytopathol).* 2011; 119:111-117
121. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert A. *et al.* Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicenter observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Annals of Oncology* 2014.25: 126–131

122. Zhou X, Cai L, Liu J et al. Analyzing EGFR mutations and their association with clinicopathological characteristics and prognosis of patients with lung adenocarcinoma. *Oncology Letters* 16: 362-370, 2018
123. Fathi AT, Brahmer JR. Chemotherapy for advanced stage nonsmall cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;20:210-216.
124. Krawczyk P, Ramlau R, Chorostowska-Wynimko J et al. The efficacy of EGFR gene mutation testing in various samples from non-small cell lung cancer patients: a multicenter retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol* (2015) 141:61–68.
125. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples *J Clin Pathol* 2013;66:79–89
126. Kobayashi K, Naoki K, Manabe T et al. Comparison of detection methods of *EGFR* T790M mutations using plasma, serum, and tumor tissue in EGFR-TKI-resistant non-small cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy* 2018;11 3335–3343
127. Smouse JH, Cibas ES, Janne PA, Joshi VA, Zou KH, Lindeman NI. EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer. *Cancer (Cancer Cytopathol)*. 2009;117:67-72

Изјава 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

**Изјављујем да је
мастер/магистарски рад**

Наслов рада Утицај квалитета узорка на резултат тестирања рецептора епидермалног фактора раста код аденокарцинома плућа

Наслов рада на енглеском језику Influence of sample quality on the result of testing receptors epidermal growth factor in lung adenocarcinoma

- ☐ резултат сопственог истраживачког рада,
- ☐ да мастер/магистарски рад, у цјелини или у дијеловима, није био предложен за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- ☐ да су резултати коректно наведени и
- ☐ да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци, мај 2020. године

Потпис кандидата



**Изјава којом се овлашћује Медицински факултет/ Академија умјетности
Универзитета у Бањој Луци да мастер/магистарски рад учини јавно доступним**

Овлашћујем Медицински факултет/ Академију умјетности Универзитета у Бањој Луци да мој мастер/магистарски рад, под насловом

Утицај квалитета узорка на резултат тестирања рецептора епидермалног фактора раста
код аденокарцинома плућа

који је моје ауторско дјело, учини јавно доступним.

Мастер/магистарски рад са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Мој мастер/магистарски рад, похрањен у д и г и т а л н и р е п о з и т о р и ј у м Универзитета у Бањој Луци, могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - дијелити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - дијелити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Бањој Луци, мај 2020. године

Потпис кандидата



**Изјава о идентичности штампане и електронске верзије
мастер/магистарског рада**

Име и презиме аутора Гордана Каталина

Наслов рада Утицај квалитета узорка на резултат тестирања рецептора епидермалног фактора раста код аденокарцинома плућа

Ментор Prof. dr Vesna Gajanin

Изјављујем да је штампана верзија мог мастер/магистарског рада идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, мај 2020. године

Потпис кандидата

Каталина Гордана