

# Prognostički i prediktivni biljezi adenokarcinoma pluća.

---

**Anđelić, Toni**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:527876>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Toni Anđelić**

**PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI  
BILJEZI ADENOKARCINOMA PLUĆA**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Toni Anđelić**

**PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI  
BILJEZI ADENOKARCINOMA PLUĆA**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Branko Dmitrović, dr. med.

Rad ima 24 lista, 4 tablice i 2 slike.

Zahvaljujem svomu mentoru prof. dr. sc. Branku Dmitroviću na pomoći pri izradi ovog završnog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji koji su mi davali podršku tijekom školovanja i završetka studija.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Karcinom pluća .....	1
1.2. Adenokarcinom pluća .....	2
1.2.1. WHO klasifikacija adenokarcinoma .....	2
1.2.2. IASLC/ATS/ERS klasifikacija adenokarcinoma pluća .....	4
1.3. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR).....	5
1.3.1. EGFR mutacija.....	6
1.4. Anaplastična limfomna kinaza (ALK) .....	6
1.4.1. EML4-ALK.....	7
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	8
3. ISPITANICI I METODE .....	9
3.1. Ustroj studije .....	9
3.2. Ispitanici.....	9
3.3. Metode .....	9
3.3.1. Molekularna analiza (EGFR) .....	9
3.3.1. Imunohistokemijska analiza (ALK).....	10
3.4. Statističke metode .....	11
4. REZULTATI.....	12
5. RASPRAVA .....	14
6. ZAKLJUČAK .....	17
7. SAŽETAK .....	18
8. SUMMARY .....	19
9. LITERATURA.....	20
10. ŽIVOTOPIS .....	24

# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom pluća

Karcinom pluća je zloćudni tumor epitelnih stanica pluća. Razvija se iz epitela alveola ili epitela traheobronhalnog sustava. U bronhima se razvija u 95 % slučajeva, a u alveolama u 3 – 5 % slučajeva. Karcinomi pluća su vrlo invazivni i brzo se šire na druge organe. Metastaze najčešće nalazimo u jetri i mozgu, a zatim u kostima, bubrezima i nadbubrežnoj žlijezdi. Plućni karcinom ima vrlo lošu prognozu (ukupno petogodišnje preživljavanje je 10 – 15 %), raste polagano i podmuklo, često bez simptoma i rezultati liječenja su skromni (1, 2).

U Hrvatskoj karcinom pluća predstavlja najučestaliji oblik maligne bolesti u muškaraca, a treći je po učestalosti u žena (nakon raka dojke i raka debelog crijeva). U Hrvatskoj se svake godine dijagnosticira više od 2500 novih bolesnika s karcinomom pluća, od čega 85 % čine bolesnici s karcinomom pluća nemalih stanica. Incidencija karcinoma pluća u Hrvatskoj je 57,1/100 000 stanovnika (muškarci : žene = 94,6 : 22,3) (3, 4). U proteklih 100 godina karcinom pluća je od rijetke bolesti postao globalni zdravstveni problem zbog popularnosti pušenja cigareta (5).

Plućni karcinomi se manifestiraju različitim simptomima:

- zbog podražaja bronha (najčešće kašalj, otežano disanje, bol u prsima)
- zbog lokalnog širenja:
  - opstrukcija bronha (atelektaza, pneumonija)
  - zahvaćanje poplućnice (pleuralni izljev i dispneja)
- zbog udaljenih metastaza (simptomi oštećenja jetre, simptomi zahvaćanja mozga, itd.)
- opći simptomi zloćudnih tumora (opća slabost, mučnina, gubitak mišićne mase, povišena temperatura, itd.)
- paraneoplastični sindromi (zbog lučenja različitih vazoaktivnih i hormonima nalik tvori) (1, 2).

Etiologija nije u potpunosti jasna, ali su poznati rizični čimbenici koji mogu uzrokovati napredak bolesti. Rizični čimbenici su:

- pušenje cigareta
- izloženost azbestu, ugljikovodicima, arsenu, kromu, beriliju, niklu
- zračenje

- genska predispozicija
- manjkavost prehrane, nedostatak vitamina A, C.

Kada je udruženo nekoliko rizičnih čimbenika, povećava se učestalost bolesti (2). Pušenje se smatra najvažnijim faktorom u razvoju karcinoma pluća. Procjenjuje se da je više od 90 % smrti od raka pluća kod muškaraca i 75 – 80 % smrtnih slučajeva od raka pluća kod žena u Sjedinjenim Američkim Državama svake godine uzrokovano pušenjem cigareta (5).

Karcinom pluća dijelimo u dvije skupine na temelju histološke klasifikacije:

- karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC) (80 %)
  - adenokarcinom (40 %)
  - karcinom pločastih stanica (25 – 30 %)
  - karcinom velikih stanica (10 – 15 %)
- karcinom malih stanica (SCLC) (20 %) (6).

## **1.2. Adenokarcinom pluća**

Adenokarcinom pluća je maligni epitelni tumor sa žljezdanom diferencijacijom ili sekrecijom mucina. Spada u skupinu karcinoma nemalih stanica i najčešće se javlja kod žena i nepušača. Nastaje većinom u perifernim dijelovima pluća (7, 8).

### **1.2.1. WHO klasifikacija adenokarcinoma**

Podtipovi adenokarcinoma prema SZO-u iz 2004. godine su:

- mješoviti
- bronhioalveolarni
- papilarni
- acinarni
- solidni.

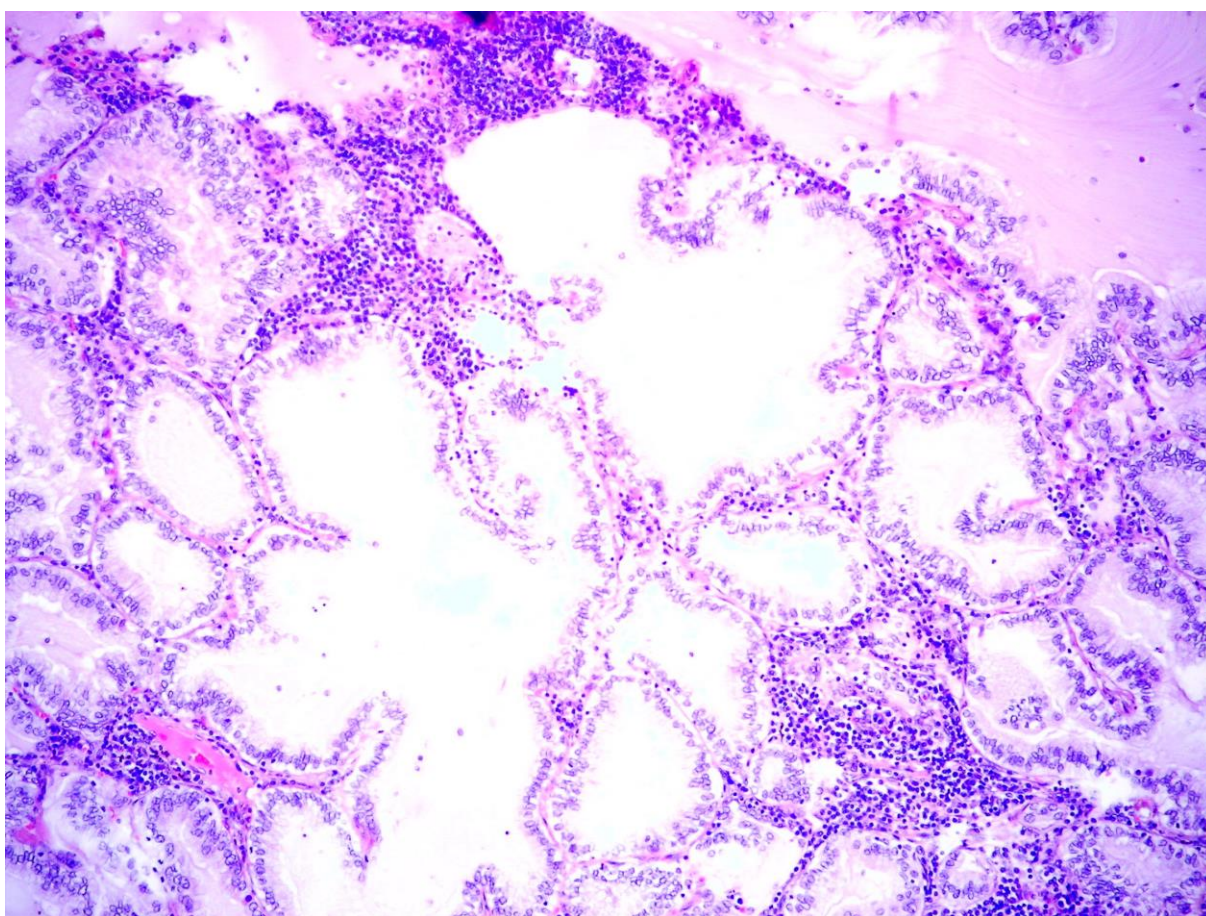
Mješoviti tip adenokarcinoma predstavlja najčešći podtip adenokarcinoma (oko 80 %). U tom podtipu adenokarcinoma se susreću različiti stupnjevi diferencijacije i citološke atipije.



Acinarni adenokarcinom karakteriziraju acinusi i kanalići obloženi kubičnim i cilindričnim epitelom koji može proizvoditi mucine. Nalikuju na bronhijalne žlijezde i obložne epitelne stanice bronha, uključujući Clara stanice.

Papilarni adenokarcinom karakterizira formiranje papila sa sekundarnim i tercijarnim papilarnim strukturama koje zamjenjuju temeljnu arhitekturu pluća. Može biti prisutna nekroza i invazija pluća.

Bronhioalveolarni adenokarcinom je isključen iz ove definicije zato što ima jednostavnu papilarnu strukturu unutar netaknutih alveolarnih prostora.



*Slika 1. Adenokarcinom pluća: žljezdani prostori imitiraju alveolarne, a obloženi su jednorednim atipičnim cilindričnim do kubičnim epitelom svijetlih citoplazmi. Hematoksilin, eozin,  $\times 100$ . (Izvor: Zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek, arhivski materijal).*

Postoje tri tipa bronhioalveolarnog adenokarcinoma: mucinozni, nemucinozni i mješoviti. U tom se tumoru opaža rast neoplastičnih stanica uz postojeće alveolarne strukture bez stromalne, pleuralne ili vaskularne invazije. Nemucinozni tip pokazuje diferencijaciju Clara

stanice i/ili pneumocita tipa II. Clara stanice se mogu prepoznati kao cilindrične stanice s citoplazmatskim tračcima i blijedom eozinofilnom citoplazmom. Pneumociti tip II su kubične stanice s finim citoplazmatskim vakuolama pjenaste citoplazme. Mogu biti prisutne intranuklearne eozinofilne inkluzije.

Mucinozni tip adenokarcinoma je po definiciji niskog stupnja zloćudnosti. Građen je od visokih cilindričnih stanica s bazalno orijentiranim jezgrama i blijedom citoplazmom, koje ponekad nalikuju na vrčaste stanice, s različitim količinama citoplazmatskog mucina. Tipično pokazuje sekreciju mucina s nakupljanjem sluzi u okolnim alveolarnim prostorima. Citološka atipija je općenito minimalna. Rijetko postoji i mješoviti tip bronhioalveolarnog adenokarcinoma.

Solidni adenokarcinom s produkcijom sluzi građen je od tumorskih stanica koji tvore solidne nakupine i sadržavaju mucine koji se nalaze u barem 5 stanica u svakom od dva velika vidna polja mikroskopskog povećanja (8).

### **1.2.2. IASLC/ATS/ERS klasifikacija adenokarcinoma pluća**

Internacionalna asocijacija za proučavanje karcinoma pluća (IASLC), Američko torakalno društvo (ATS) i Europsko respiratorno društvo (ERS) su značajno promijenili patološku klasifikaciju adenokarcinoma pluća. Napravili su novu klasifikaciju koja se bavi mnogim aspektima koji izravno utječu na kliničku praksu i otvaraju nove pristupe za buduća istraživanja. Novu klasifikaciju su temeljili na brojnim novim dostignućima iz medicinske onkologije, radiologije i molekularne biologije.

Glavne promjene u novoj klasifikaciji IASLC/ATS/ERS:

- ukinut je pojam bronhioalveolarni adenokarcinom (BAC)
- ne postoji više mješoviti tip adenokarcinoma
- klasifikacija adenokarcinoma vrši se prema prevladavajućem podtipu u tumoru
- uvođenje pojma adenokarcinom in situ (AIS) i minimalno invazivni adenokarcinom (MIA)
- uvođenje mikropapilarnog adenokarcinoma kao osnovnog podtipa
- uvođenje lepidnog predominantnog tipa i lepidnog rasta kao novih pojmova
- ukinut je pojam karcinom izgleda prstena pečatnjaka (9).

Adenokarcinom in situ (AIS) je tumor veličine  $\leq 3$  cm i bio je poznat kao bronhioalveolarni adenokarcinom (BAC). Nema invazije strome, pleure i vaskularnih prostora. Odsutne su

papile, mikropapile i intraalveolarne nakupine tumorskih stanica. Gotovo su svi in situ adenokarcinomi nemucinozni, ali rijetko mogu biti i mucinozni.

Minimalno invazivni adenokarcinom (MIA) je tumor veličine  $\leq 3$  mm. Nema invazije krvnih i limfnih žila ili pleure, a nekroza tumora isto tako mora biti odsutna. Gotovo su svi nemucinoznog tipa, ali se može naći i mucinozni tip. Pokazuje pretežito lepidni tip rasta i invaziju  $\leq 5$  mm. Može biti prisutno više fokusa invazije i oni se ne zbrajaju. Na invazivnu komponentu ukazuje prisustvo drugih histoloških tipova (papilarni, mikropapilarni, acinarni i/ili solidni) i jasna infiltracija miofibroblastne strome stanicama tumora.

Lepidni predominantni tip invazivnog adenokarcinoma mora imati barem jedan fokus  $\geq 5$  mm. Prisutna je nekroza i invazija pleure, limfnih i vaskularnih prostora. Pokazuje proliferaciju pneumocita tipa II ili Clara stanice duž alveolarnih septi (9, 10).

### **1.3. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)**

EGFR je član porodice receptora protein-tirozin-kinaze u kojem i pripadaju ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4. EGFR je prvi put identificiran kao 170-kDa protein na membrani A431 epidermoidnih stanica, a drugi članovi porodice su otkriveni pretraživanjem cDNA biblioteke vezane za EGFR molekulu. Ti se receptori normalno eksprimiraju u različitim tkivima epitelnog, mezenhinskog i neuralnog podrijetla. EGFR je prekomjerno eksprimiran u različitim vrstama raka, uključujući rak pluća, glave i vrata, debelog crijeva, gušterače, dojke, jajnika, mokraćnog mjehura, bubrega, kao i gliome mozga (11, 12).

Protein EGFR se sastoji od tri regije: izvanstanične domene, transmembranske domene i unutarstanične domene. Izvanstanična domena je bogata cisteinom i na N-kraju se veže ligand. Ligandi koji se vežu na EGFR su epidermalni faktor rasta (EGF), transformirajući faktor rasta alfa (TGF- $\alpha$ ), amfiregulin (AR), betacelulin (BTC) i epiregulin (EPG). Unutarstaničnu domenu čini tirozin-kinazna domena (oko 50 % citoplazmatskog područja), jukstamembranska domena koja se sastoji od 38 aminokiselina i karboksilna terminalna regija koja se sastoji od 225 aminokiselina. EGFR se nalazi na kromosomu 7 i obuhvaća 110 kb DNA koji su podijeljeni u 28 egzona (11, 13).

Vežanje liganda (npr. EGF) za izvanstaničnu domenu tih receptora potiče stvaranje homodimera s drugim EGFR ili heterodimera s drugim članovima ErbB porodice (ErbB2, ErbB3 i ErbB4). Homodimerizacija i heterodimerizacija uzrokuju autofosforilaciju receptora jer se dva polipeptidna lanca uzajamno fosforiliraju. Dolazi do aktivacije tirozin-kinaze koja

aktivira unutarstanične signalne kaskade kao što su Ras/Raf/mitogen-aktivirajuća protein-kinaza (MAPK), fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K/Akt/mTOR) i put signalnog prijenosa i aktivatora transkripcije (STAT).

Aktivacija tih puteva dovodi do proliferacije stanice, produženog preživljavanja stanica, adhezije, migracije i angiogeneze. Inhibicija ključnih posrednika u nizvodnim signalnim putevima bi trebala dovesti do kliničkih učinaka u liječenju raka pluća (11, 12, 14).

### **1.3.1. EGFR mutacija**

EGFR mutacije su češće kod žena i nepušača. Osobe između 60 i 70 godina imaju veću vjerojatnost za EGFR mutaciju i rijetko se nađe u mlađoj populaciji (15). EGFR mutacija je najčešće prisutna u papilarnom, acinarnom i lepidnom podtipu adenokarcinoma, a rijetko je pronađena u solidnom i mucinoznom tipu adenokarcinoma. EGFR mutacije se rijetko nađu u karcinomu pločastih stanica, karcinomu malih stanica ili drugih malignih epitelnih stanica (11, 16).

Aktivne mutacije se odvijaju na domeni tirozin-kinaza. Najčešće mutacije su delecije egzona 19 (del19) do koje dovode do gubitka aminokiselinske sekvence leucin-arginin-glutamin-alanin na poziciji 747-750 i točkaste mutacije na egzonu 21 na kodonu 858 (L858R) do koje dolazi do supstitucije arginina za leucin. Čine više od 90 % svih EGFR mutacija. Te su dvije mutacije povezane s najboljim odgovorom na ciljanu terapiju inhibitora tirozin-kinaze.

Oko 10 % mutacija EGFR-a čini točkasta mutacija na egzonu 18 na kodonu 719 (G719X) do koje dolazi do zamjene glicina serinom, alaninom ili cisteinom i insercija i točkasta mutacija na egzonu 20 (11, 17).

## **1.4. Anaplastična limfomna kinaza (ALK)**

ALK je jedan od članova obitelji inzulinskog receptora koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 2 i kodira transmembransku receptorsku tirozin-kinazu. Normalno se nalazi samo u živčanom sustavu. Konstitutivna aktivacija ALK, mutacija ili amplifikacija gena ALK su povezane s kancerogenezom i progresijom određenih karcinoma kao što su NSCLC, rak dojke i neuroblastomi (18, 19).

Ljudski ALK gen kodira 176 kDa protein koji prolazi kroz posttranslacijsku modifikaciju poput N-glikolizacije. ALK receptor je jednostrani transmembranski protein koji se sastoji od

izvanstaničnog područja, transmembranske domene i unutarstaničnog područja. Izvanstanično područje se sastoji od 1030 aminokiselina koji sadrži N-terminalni signalni peptid, dva meprina, proteina A-5, receptorske proteinske tirozin-fosfataze mu (MAM) domene i domene lipoproteina niske gustoće a (LDL-A). MAM domena se sastoji od približno 160 aminokiselina i smatra se da sudjeluje u interakcijama stanica - stanica, dok je funkcija LDL-A domene nepoznata. Transmembranska domena povezuje izvanstanično područje i unutarstanično područje. Unutarstanično područje se sastoji od jukstamembranske domene i domene tirozin-kinaze. Funkcija jukstamembranske domene je nepoznata, a domena tirozin-kinaza sadrži tri mjesta autofosforilacije na tirozinu 1278, 1282 i 1283 čija fosforilacija regulira aktivnost kinaze ALK-a.

Transdukcija signala ALK je započeta vezanjem liganda koji izazivaju dimerizaciju i transfosforilaciju. Midkine (MK) i pleiotrophin (PTN) su čimbenici rasta koji se smatraju ALK ligandama koji mogu djelovati kao autokrini ili parakrini signalni molekuli. MK i PTN se izražavaju tijekom razvoja živčanog sustava i visoko su izraženi u nekim slučajevima gdje djeluju kao angiogeni čimbenici koji potiču invaziju i metastaziranje. MK je heparin vezujući faktor rasta s molekulskom masom od 130 kDa koji regulira razvoj pluća, bubrega, kostiju i živčanog sustava. Potiče fosforilaciju ALK i aktivira transdukciju signala PI3K i MAP kinaze. PTN je 18 kDa protein koji djeluje kao faktor rasta i utječe na proliferaciju fibroblasta i endotelnih stanica. Veže se na izvanstaničnu regiju ALK i tako inducira njegovu fosforilaciju i aktivaciju nizvodnog efektor, kao što je PI3K. ALK receptor potiče aktivaciju višestrukih puteva prijenosa signala. Glavne puteve koje aktivira ALK su Ras/ERK, JAK/STAT i PI3K/AKT koje su uključene u proliferaciju, migraciju i stanično preživljavanje (18).

#### **1.4.1. EML4-ALK**

Promjena u ALK genu može biti posljedica fuzije u kojem nastaje fuzijski gen koji je onkogen i javlja se u približno 2 – 5 % slučajeva NSCLC. Obično se nalazi kod mladih i nepušača te kod bolesnika s acinarnim tipom adenokarcinoma i bolesnika s adenokarcinomom stanica oblika prstena pečatnjaka. Fuzijski gen EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4)-ALK nastaje kao rezultat inverzije kromosoma 2p. To dovodi do konstitutivne aktivacije ALK kinazne domene, a posljedica toga je aktivacija nizvodnih signalnih puteva PI3K/AKT, Ras/ERK i JAK/STAT. EML4-ALK je nađen i u raku dojke i kolorektalnom raku. Kromosomska inverzija se ne događa uvijek na istom mjestu i identificirane su mnoge varijante EML4-ALK (20, 21).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Utvrditi broj dijagnosticiranih adenokarcinoma pluća u istraživanom 14-mjesečnom razdoblju
2. Utvrditi broj adenokarcinoma pluća s pozitivnim ALK mutacijama
3. Utvrditi broj adenokarcinoma pluća s pozitivnim EGFR mutacijama.

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Ustroj studije**

Istraživanje je provedeno kao retrospektivna studija.

### **3.2. Ispitanici**

Iz arhiva Laboratorija za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek u istraživanom razdoblju (1. veljače 2016. - 30. travnja 2017.) izdvojeni su nalazi ispitanika s dijagnozom adenokarcinoma pluća kod kojih je provedeno testiranje na ALK i EGFR mutacije.

Svi će se pronađeni bolesnici voditi pod šifrom broja biopsije. Nigdje se neće spominjati ime bolesnika, niti će obrada materijala na bilo koji način utjecati na dijagnozu i liječenje bolesnika čiji će se materijali koristiti u istraživanju.

Iz nalaza su prikupljeni podaci o dobi i spolu ispitanika, vrsti uzoraka, radi li se o primarnom ili sekundarnom tumoru, statusu EGFR mutacije i statusu ALK mutacije. Materijali iz kojih se izoliralo tumorsko tkivo za analizu mutacija bili su parafinski blokovi i citološki razmazi.

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1. Molekularna analiza (EGFR)**

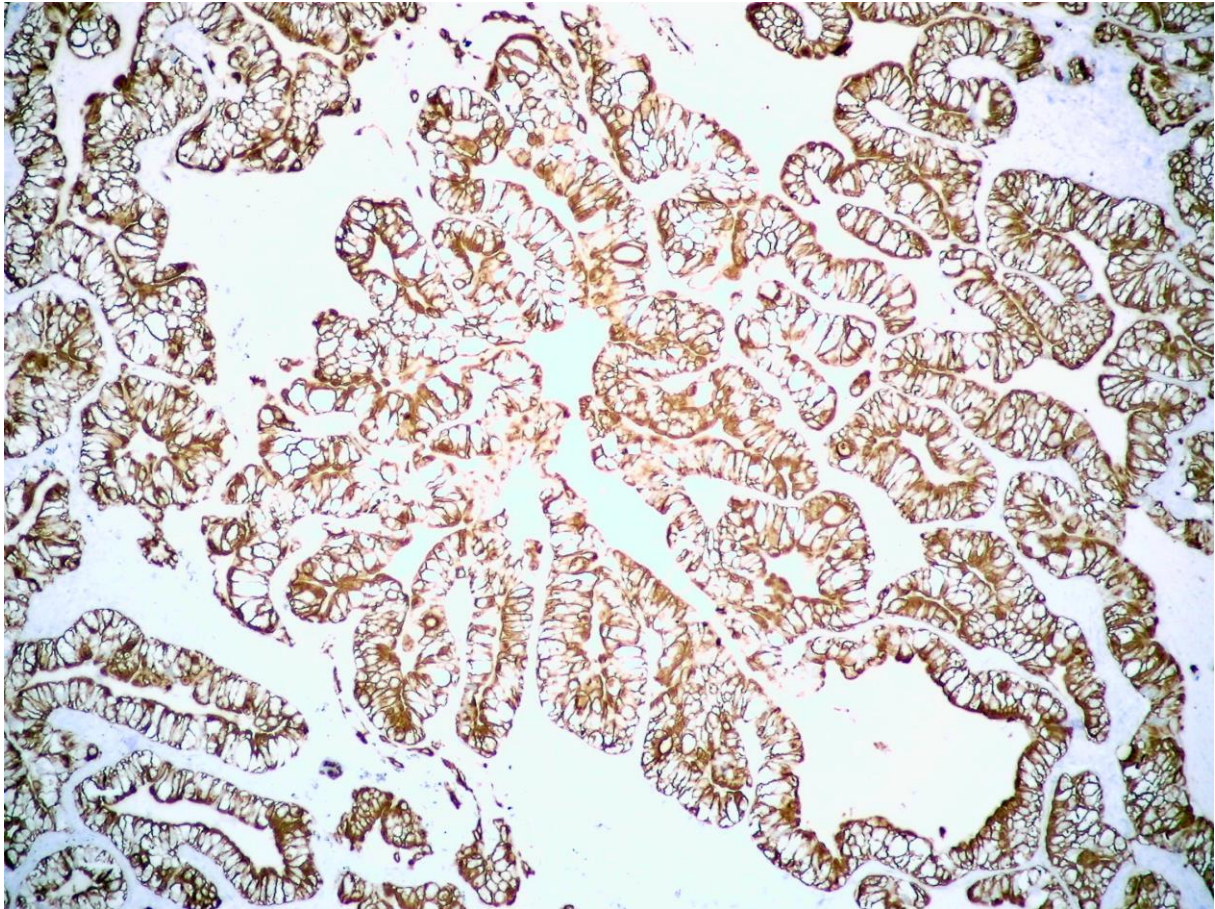
Lančana reakcija polimeraze (PCR) omogućava proizvodnju goleme količine DNA iz samo jedne početne molekule DNA. PCR reakcija započinje zagrijavanjem kalupa na visoku temperaturu (primjerice 95°C) da bi se razdvojila dva lanca DNA, a zatim je hladimo kako bi se početnice (najčešće oligonukleotidi od 15 do 20 baza) vezale na svaki od tih lanaca. DNA-polimeraza sintetizira nove lance DNA što dovodi do stvaranja dviju novih dvolančanih molekula DNA (14). Real-time PCR je vrsta PCR-a koja omogućava kvantifikaciju PCR produkta za vrijeme procesa umnažanja, u stvarnom vremenu. Za razliku od standardnog PCR-a nije potrebna gel elektroforeza, a metoda je brža i preciznija (22).

Prisustvo EGFR mutacije se određivalo na aparatu Cobas Z480 analyzer analizom koja se temelji na Real time-PCR-u. Molekularna se analiza radila na tkivnim i citološkim uzorcima. Histološki uzorci su dobiveni biopsijom, fiksirani formalinom i uklopljeni u parafin, a

citološki uzorci su dobiveni razmazom citološke punkcije. Iz parafinskih blokova dobiveni su rezovi 3 - 5  $\mu\text{m}$  iz kojih se nakon označavanja izolirala DNA.

Ispitivale su se sljedeće mutacije u genu EGFR: točkaste mutacije (G719A, G719C, G719S) u egzonu 18, delecija i složene mutacije u egzonu 19, S768I, T790M i insercija u egzonu 20 i L858R u egzonu 21.

### 3.3.1. Imunohistokemijska analiza (ALK)



*Slika 2. ALK pozitivni tumor (smeđe bojenje tumorskih stanica). Slučaj 7. (515/2017) Anti-ALK (D5F3), hematoksilin,  $\times 100$ . (Izvor: Zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek, arhivski materijal).*

Imunohistokemija je imunokemijska metoda kojom dokazujemo prisutnost te lokalizaciju određenog antigena u tkivu. Parafinske blokove režemo na tanke rezove debljine 4  $\mu\text{m}$ . Postoji direktna i indirektna metoda. Kod direktne metode primarno protutijelo bude direktno obilježeno npr. enzimom i nakon toga se veže na traženi antigen u tkivu. Kod indirektna metode dodajemo primarno protutijelo koje se veže na traženi antigen u tkivu i zatim ispiremo



primarno protutijelo. Uronimo rez u otopinu sekundarnog protutijela koje može biti obilježeno npr. enzimom. Većinom se radi indirektna metoda jer je proizvodnja sekundarnih protutijela znatno jeftinija od proizvodnje primarnih protutijela (23, 24).

Pozitiviteti ALK (klona D5F3) su se određivali imunohistokemijskom metodom na Ventana BenchMark Ultra platformi. Korištena su monoklonalna primarna zečja protutijela koja se vežu na ALK u parafinskim rezovima. Koristili su se OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit prema preporukama proizvođača za vizualizaciju vezanog primarnog protutijela.

#### **3.4. Statističke metode**

Korištene su samo osnovne metode deskriptivne statistike. Numerički podaci prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom.

## 4. REZULTATI

Od 1. veljače 2016. do 30. travnja 2017. u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek utvrđeno je 55 dijagnosticiranih adenokarcinoma pluća. Nakon izvršene dijagnostike napravljeno je testiranje na EGFR mutaciju kod svih ispitanika i na ALK mutaciju kod 19 ispitanika.

U istraživanom razdoblju pregledano je i analizirano 36 citoloških uzoraka i 19 histoloških uzoraka (Tablica 1).

*Tablica 1. Raspodjela prema vrsti analiziranog uzorka*

<b>Vrsta uzorka</b>	<b>Broj (%) uzoraka</b>
Citološki uzorci	36 (65)
Histološki uzorci	19 (35)
<b>Ukupno</b>	<b>55 (100)</b>

Istraživano razdoblje obuhvatilo je 50 primarnih tumora pluća i 5 sekundarnih tumora pluća (metastaza) (Tablica 2).

*Tablica 2. Raspodjela uzoraka prema sijelu tumora (primarni/metastatski)*

<b>Sijelo tumora</b>	<b>Broj (%)</b>
Primarni tumor	50 (91)
Sekundarni tumor	5 (9)
<b>Ukupno</b>	<b>55 (100)</b>

Provedeno je 55 testiranja na EGFR mutaciju, kod 32 oboljela muškarca i 23 žene. Središnja vrijednost (medijan) dobi ispitanika je 63 (interkvartilni raspon od 47 do 78), a ispitanica 61 godina (interkvartilni raspon od 50 do 78 godina). Omjer muškaraca i žena je 1,4 : 1 (Tablica 3).

*Tablica 3. Raspodjela EGFR testiranih uzoraka prema dobi i spolu*

<b>Spol</b>	<b>Broj (%) ispitanika</b>	<b>Medijan (raspon) dobi</b>
Muškarci	32 (58)	63 (47 - 78)
Žene	23 (42)	61 (50 - 78)
<b>Ukupno</b>	<b>55 (100)</b>	<b>62 (47 - 78)</b>

Samo je jedna ispitanica bila pozitivna na EGFR mutaciju (2 % ispitanih uzoraka).

Provedeno je 19 testiranja na ALK mutaciju, u 13 oboljelih muškaraca i 6 žena. Središnja vrijednost (medijan) dobi ispitanika je 62 (interkvartilni raspon od 50 do 75), a ispitanica 55,5 godina (interkvartilni raspon od 50 do 78). Odnos muškaraca i žena je 2,2 : 1 (Tablica 4).

*Tablica 4. Raspodjela ALK testiranih uzoraka prema dobi i spolu*

<b>Spol</b>	<b>Broj (%) ispitanika</b>	<b>Medijan (raspon) dobi</b>
Muškarci	13 (68)	62 (50 - 75)
Žene	6 (32)	55,5 (50 - 78)
<b>Ukupno</b>	<b>19 (100)</b>	<b>60 (50 - 78)</b>

Samo je jedna ispitanica bila pozitivna na ALK mutaciju (5 % ispitanih uzoraka).

## 5. RASPRAVA

Analiza EGFR mutacija provedena je na 36 (65 %) citoloških uzoraka i 19 (35 %) histoloških uzoraka. Analiza ALK mutacije provedena je samo na histološkim uzorcima (19 slučajeva). Ispitivanje ALK mutacije nije bilo moguće provesti na citološkim uzorcima zbog gubitka većine materijala tijekom prethodnog testiranja na prisutnost EGFR mutacija.

Analize mutacija provedene su uglavnom na tkivu primarnog tumora (50 (91 %) slučajeva), a rjeđe na metastatskom tumorskom tkivu (5 (9 %) slučajeva). Opravdano je pitanje treba li testirati EGFR i ALK mutacije i na tkivu primarnog i na tkivu metastatskog tumora, budući da u evoluciji tumorskog tkiva dolazi do promjena u karakteristikama tumorskih stanica i genotipu, pa teoretski primarni tumor bez primjerice EGFR mutacija može steći neke od tih mutacija u metastatskom tkivu (ili obrnuto), što naravno mijenja mogućnost odgovora oboljelog na terapiju (25 – 27).

Prisutnost EGFR mutacija u tumorskom tkivu provedena je u 55 oboljelih ispitanika kojima je postavljena dijagnoza adenokarcinoma pluća. U skupini ispitanika bila su 32 (58 %) muškarca i 23 (42 %) žene. Odnos muškaraca i žena je 1,4 : 1. Od 55 ispitivanja na EGFR mutaciju imali smo samo jedan pozitivan nalaz. Radilo se o ispitanici koja ima 66 godina, uzorak je bio citološki, primarnog tumora. Nalaz odgovara podacima iz literature gdje su EGFR mutacije češće kod žena od 60 do 70 godina (15). Zbog jednog pozitivnog nalaza bilo je teško odrediti je li EGFR mutacija češća kod žena ili kod muškaraca i u kojoj dobi najčešće nalazimo prisutnost mutacije.

Ukupna učestalost EGFR mutacija je oko 30 % među azijskim pacijentima, a među bijelcima je oko 7 % (28). Iznenaduje mali udio EGFR mutacija u istraživanom materijalu KBC-a Osijek (svega 1/55 ispitanika ili 1,8 %). Mogućnost pogreške u analitici isključena je vanjskim vrednovanjem kvalitete rada i stjecanjem certifikata laboratorija ovlaštenog za dijagnosticiranje EGFR i ALK mutacija, a gotovo polovina uzoraka retestirana je u molekularnim laboratorijima KBC-a Zagreb i KBC-a Split s istim rezultatima.

3 – 7 % plućnih tumora pozitivno je na ALK mutacije (29). Mutacija ALK je bila ispitivana na tumorskom tkivu 19 oboljelih od adenokarcinoma pluća. Bilo je 13 (68 %) muškaraca i 6 (28 %) žena. Odnos muškaraca i žena je 2,2 : 1. Bio je samo jedan pozitivan nalaz na ALK mutaciju (1/19 slučajeva ili 5,3 %). Radi se o ispitanici koja ima 78 godina i imala je primaran tumor. ALK mutacija je najčešće prisutna kod mladih i kod žena (30). Postotak odgovara

rezultatima drugih studija, ali je broj izvršenih analiza suviše mali za bilo kakve pouzdane zaključke.

Važnost je analize EGFR i ALK mutacija u (ne)mogućnosti primjene lijekova, u prvom redu inhibitora tirozin-kinaze. Inhibitori tirozin-kinaze (TKI) su male molekule koje mogu biti reverzibilne ili ireverzibilne. Vežu se za ATP-vezujuću regiju domene tirozin-kinaze i tako sprječavaju autofosforilaciju i aktivaciju nizvodnih signalnih puteva. Reverzibilni inhibitori tipa I i II se natječu s ATP molekulama koje prepoznaju kinaznu aktivnu konformaciju. Ireverzibilni inhibitori se kovalentno vežu na aktivno mjesto kinaze tako što specifično reagiraju s nukleofilnim cisteinskim ostatkom. Imaju dugotrajni klinički učinak i smanjenu potrebu za čestim doziranjem, iako može ugroziti specifičnost i podnošljivost (12).

Prvu liniju terapije čine gefitinib i erlotinib. Gefitinib i erlotinib su male molekule anilino kinazolina koje djeluju selektivno i spadaju u skupinu reverzibilnih inhibitora. Štetni učinci koji prate TKI su kožni osipi, povećanje serumskih transaminaza, dispneja, alveolitis, bol u kostima i intersticijska pneumonija (12, 31). TKI u usporedbi sa standardnom kemoterapijom pokazuju produljeno preživljavanje bez napretka bolesti, povišen postotak objektivnog odgovora, bolju kvalitetu života i smanjen toksičan učinak (32).

Uzrok progresije bolesti može biti pojava rezistencije na TKI unatoč dobrim početnim odgovorima na terapiju. Najčešći mehanizam rezistencije je točkasta mutacije na egzonu 20 gdje dolazi do zamjene metionina za treonin na poziciju 790 (T790M). Nađen je u 50 % bolesnika i povećava afinitet vezanja ATP-a na EGFR protein pa time i povećava razinu fosforilacije. Ostali mehanizmi rezistencije su HER-2 amplifikacija (oko 13 %), MET amplifikacija (5 – 11 %), transformacija u karcinom malih stanica (3 – 14 %) i PI3K mutacija (0 – 5 %). HER-2 amplifikacija potiče preživljavanje i rast stanica tako što stimulira nizvodni signalni put PI3K/mTOR (31). Heterodimerizacija MET i ERBB3 dovodi do kontinuirane aktivacije PI3K/AKT signalnog puta. Mehanizam transformacije NSCLC u SCLC je nepoznat (33). PI3K mutacije se često koegzistiraju s EGFR/KRAS mutacijama i insercija na egzonu 20 pokazuje rezistenciju na TKI (34, 35).

Crizotinib je TKI koji inhibira aktivnost tirozin-kinaze kroz kompetitivno vezanje na ATP-vezujuće mjesto na kinaznoj domeni i pokazuje učinak na ALK, ROS1 i MET. Stopa odgovora na crizotinib je visoka (oko 60 %), ali postoji mogućnost stjecanja rezistencije na crizotinib. U 97 % slučajeva su se pojavile nuspojave, a to su mučnina, proljev, povraćanje, periferni edem i nuspojave vezane uz vidni sustav (18, 36). Alectinib je selektivniji ALK

inhibitor od crizotiniba, ali ne pokazuje učinak na ROS1 i MET. Ceritinib je druga generacija ALK-TKI i koriste ga pacijenti koji su netolerantni na crizotinib ili je bolest napredovala nakon terapije crizotinibom (37, 38).

Mehanizmi rezistencije na terapiju crizotiniba su sekundarne mutacije u domeni tirozin-kinaze, ALK amplifikacije, aktivacija EGFR i KRAS mutacija. Najčešća sekundarna mutacija u domeni tirozin-kinaze je L1196M mutacija gdje dolazi do zamjene leucina metioninom na položaju 1196, a ostale sekundarne mutacije su G1269A, C1156Y, S1206Y, I1171T, G1202R itd. (37, 39).

Nakon više desetljeća borbe protiv raka pluća zračenjem i primjenom općih citostatika, ohrabruje pojava selektivnih „pametnih“ lijekova za bolesnike oboljele od adenokarcinoma pluća.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- utvrđeno je 55 dijagnosticiranih adenokarcinoma pluća u istraživanom razdoblju
- samo je jedan pozitivan nalaz na ALK mutaciju od 19 ispitanika (5,3 %)
- od 55 ispitanika testiranih na EGFR mutaciju samo je jedan pozitivan (1,8 %).

## 7. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Utvrditi broj adenokarcinoma od 1. veljače 2016. do 30. travnja 2017., broj adenokarcinoma s pozitivnim ALK mutacijama i broj adenokarcinoma s pozitivnim EGFR mutacijama.

**USTROJ STUDIJE:** Retrospektivna studija.

**ISPITANICI I METODE:** U istraživanje su uključeni ispitanici s dijagnozom adenokarcinoma pluća (32 muškaraca i 23 žene) kod kojih je provedeno testiranje na ALK i EGFR mutaciju u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek. ALK mutacija se utvrđivala imunohistokemijom, a EGFR mutacija molekularnom analizom (PCR-om).

**REZULTATI:** Dijagnosticirano je 55 adenokarcinoma pluća na 36 citoloških uzoraka i 19 histoloških uzoraka. Tumorsko tkivo izolirano je u 50 slučajeva iz primarnog tumora i u 5 slučajeva iz metastaza. EGFR testiranja provedena su i na citološkim i na histološkim uzorcima. Utvrđen je samo jedan pozitivan nalaz EGFR mutacija u tumorskom tkivu (1/55 slučajeva ili 1,8 %). ALK testiranje provedeno je samo na histološkim uzorcima (13 muškaraca i 6 žena). Utvrđen je samo jedan nalaz pozitivne ALK mutacije (1/19 slučajeva ili 5,3 %).

**ZAKLJUČAK:** U populaciji bolesnika s dijagnozom adenokarcinoma pluća testiranih na EGFR i ALK mutacije u KBC-u Osijek, utvrđen je iznenađujuće mali udio bolesnika s EGFR mutacijama i uobičajeni udio bolesnika a ALK mutacijama. U tumačenju rezultata neophodan je oprez zbog malog broja ispitanika.

**KLJUČNE RIJEČI:** Adenokarcinom, ALK, EGFR, EML4-ALK, TKI



## 8. SUMMARY

### **Prognostic and predictive markers in the lung adenocarcinoma**

**Objective:** The aim of this study was to determine the number of adenocarcinoma in the researched period, the number of adenocarcinoma with positive ALK mutations and the number of adenocarcinoma with positive EGFR mutation.

**Study design:** A retrospective study

**Material and Methods:** The study included participants with a diagnosis of lung adenocarcinoma (32 men and 23 women), tested for ALK and EGFR mutations at the Molecular diagnostic laboratory of the Clinical institute for pathology and judicial medicine of Clinical Hospital Centre Osijek. ALK mutation was determined by immunohistochemistry and EGFR mutation by molecular analysis (PCR).

**Results:** There were 55 diagnosed lungs adenocarcinoma on 36 cytological samples and 19 histological samples. Tumour tissue was isolated in 50 cases of primary tumour and in 5 cases of metastasis. EGFR testing was also performed on cytological and histological samples. In tumour tissue there was only one positive finding of EGFR mutations (1/55 cases or 1.8%). ALK testing was performed only on histological samples (13 men and 6 women). There was only one positive finding of ALK mutation (1/19 cases or 5.3%).

**Conclusions:** In the population of patients with diagnosed lungs adenocarcinoma tested on EGFR and ALK mutation in Clinical Hospital Centre Osijek and it was found surprisingly small part of patients with EGFR mutations and the usual proportion of patients with ALK mutations. We need to be cautious with the interpreting of the results because of the small number of participants.

**Key words:** adenocarcinoma, ALK, EGFR, EML4-ALK, TKI

## 9. LITERATURA

1. Jukić J. Patologija za studente viših medicinskih škola. 4. dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 1999. str. 127-129.
2. Grbac I, Bašić-Grbac M, Ostojić J. Rak pluća. *Medicus*. 2001;10(2):179-190.
3. Onkologija.hr. Rak pluća-statistika. Dostupno na adresi:<http://www.onkologija.hr/rak-pluca-statistika/>. Datum pristupa: 16.08.2017.
4. Samaržija M, Gugić D, Radić J, Vrdoljak E, Jakopović M, Boban M, i sur. Kliničke upute za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od karcinoma pluća nemalih stanica. *Liječ Vjesn*. 2011;133:361-365.
5. Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. Epidemiology of lung cancer. *Semin Intervent Radiol*. 2013;30(2):93-98.
6. Cybermed. Vrsta raka pluća. Dostupno na adresi:[http://www.cybermed.hr/centri\\_a\\_z/rak\\_pluca/vrste\\_raka\\_pluca/](http://www.cybermed.hr/centri_a_z/rak_pluca/vrste_raka_pluca/). Datum pristupa:16.08.2017.
7. Abeceda Zdravlja. Pluća-rak. Dostupno na adresi:<https://abeceda-zdravlja.com/pluc-rak>. Datum pristupa:16.08.2017.
8. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Haris CC. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 1. izd. Lyon. IARCPress; 2004. str. 35-44.
9. Zugazagoitia J, Enguita AB, Nunez JA, Iglesias L, Ponce S. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects. *J Thorac Dis*. 2014;6(5):526-536.
10. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, i sur. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Dis*. 2011;6(2):244-285.
11. Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*. 2010;1(7):497-514.

12. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):15-31.
13. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):52.
14. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
15. Hong S, Fang W, Hu Z, Zhou T, Yan Y, Qin T, i sur. A large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese Han population. *Sci Rep*. 2014;4:7268.
16. Chen Z, Liu X, Zhao J, Yang H, Teng X. Correlation of EGFR mutation and histological subtype according to the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):8039-8045.
17. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009;28:24-31.
18. Garcia-Regalado A, Gonzalez-De la Rosa CH. A role of anaplastic lymphoma kinase in human cancers. *Oncology & Hematology Review*. 2013;9(2):149-53.
19. Wu K, House L, Liu W, Cho WC. Personalized targeted therapy for lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9):11471-11496.
20. Khoo C, Rogers TM, Fellowes A, Bell A, Fox S. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(2):126-141.
21. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(10):1773-1780.
22. Difference Between. Difference Between PCR and Real-time PCR. Dostupno na adresi: <http://www.differencebetween.com/difference-between-pcr-and-vs-real-time-pcr/>. Datum pristupa: 20.08.2017.

23. Immunohistochemistry.us. Immunohistochemistry (IHC) Principle. Dostupno na adresi: <http://www.immunohistochemistry.us/IHC-principle.html>. Datum pristupa: 20.08.2017.
24. Agarscientific. Immunohistochemistry-direct, indirect and sandwiches. Dostupno na adresi: <http://www.agarscientific.net/immunohistochemistry-direct-indirect-and-sandwiches/>. Datum pristupa:20.08.2017.
25. Daniele L, Cassoni P, Bacillo E, Cappia S, Righi L, Volante M, i sur. Epidermal growth factor receptor gene in primary tumor and metastatic sites from non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(6):684-688.
26. Rao C, Hu Q, Ma J, Li J, Zhang C, Shen L i sur. Comparison of the epidermal growth factor receptor protein expression between primary non-small cell lung cancer and paired lymph node metastases:implications for targeted nuclide radiotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29(1):7
27. Turnpenny PD, Ellard S. Emeryjeve osnove medicinske genetike. 14. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 22-26.
28. Zhou W, Christiani DC. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer*. 2011;30(5):287-292.
29. Sullivan I, Planchard D. ALK inhibitors in non-small cell: the latest evidence and developments. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(1):32-47.
30. Wang Y, Wang S, Xu S, Qu J, Liu B. Clinicopathologic features of patients with non-small cell lung cancer harboring the EML4-ALK fusion gene: a meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(10):110617.
31. Fenton M. Current and future therapeutics for patients with non-small cell lung cancer and know activating mutations in epidermal growth factor receptor. *Oncology & Hematology Review*. 2015;11(2):128-34.
32. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, i sur. Gefitinb or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947-957.

33. Stewart EL, Tan SZ, Liu G, Tsao MS. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(1):67-81.
34. Wang L, Hu H, Pan Y, Wang R, Li Y, Shen L, et al. PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS wildtype subgroup. *PloS One.* 2014;9(2):e88291.
35. Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, Rekhtman N, Lau C, Reva BA, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(2):220-229.
36. Rao A, Colebatch AJ, Kelleher FC. New Molecular Targets in Lung Adenocarcinoma. *Oncology & Hematology Review.* 2013;9(2):122-8.
37. Isozaki H, Takigawa N, Kiura K. Mechanisms of Acquired Resistance to ALK Inhibitors and the Rationale for Treating ALK-positive Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2015;30(7):763-783.
38. Awad MM, Shaw AT. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: crizotinib and beyond. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2014;12(7):429-439.
39. Weise AM, Gadgeel S. New options in the management of intractable ALK(+) metastatic non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl).* 2014;5:35-42.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Toni Anđelić

**Datum i mjesto rođenja:** 3. kolovoza 1995., Osijek

**Adresa stanovanja:** Ante Kovačića 13, Tenja

**E-mail:** toni.tenja1@gmail.com

**Kontakt:** 0976499209

### OBRAZOVANJE

2002. - 2010. Osnovna škola Tenja

2010. - 2014. I. gimnazija Osijek

2014. - 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike u Osijeku