

Učestalost i tip mutacija u EGRF genu u patohistološkim i citološkim uzorcima karcinoma pluća

Kos, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:135276>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI**

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

**UČESTALOST I TIP MUTACIJE U EGFR GENU U
PATOHIŠTOLOŠKIM I CITOLOŠKIM UZORCIMA
KARCINOMA PLUĆA**

MATEA KOS

Split, srpanj, 2024.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI**

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

**UČESTALOST I TIP MUTACIJE U EGFR GENU U
PATOHIŠTOLOŠKIM I CITOLOŠKIM UZORCIMA
KARCINOMA PLUĆA**

Mentor: doc.dr.sc. Čedna Tomasović-Lončarić

Komentor: Livia Slišković, mag.forens.

MATEA KOS

1003075792

Split, srpanj, 2024.

Rad je izrađen u Kliničkoj bolnici Dubrava, Zagreb

pod nadzorom doc.dr.sc. Čedna Tomasović-Lončarić; Livia Slišković, mag. forens.

u vremenskom razdoblju od siječnja, 2024. do srpnja, 2024. godine.

Datum predaje diplomskog rada: _____

Datum prihvaćanja rada: _____

Datum usmenog polaganja: _____

Povjerenstvo: 1. doc.dr.sc. Snježana Štambuk _____

2. doc.dr.sc. Nenad Vuletić _____

3. doc.dr.sc. Čedna Tomasović-Lončarić _____

SADRŽAJ

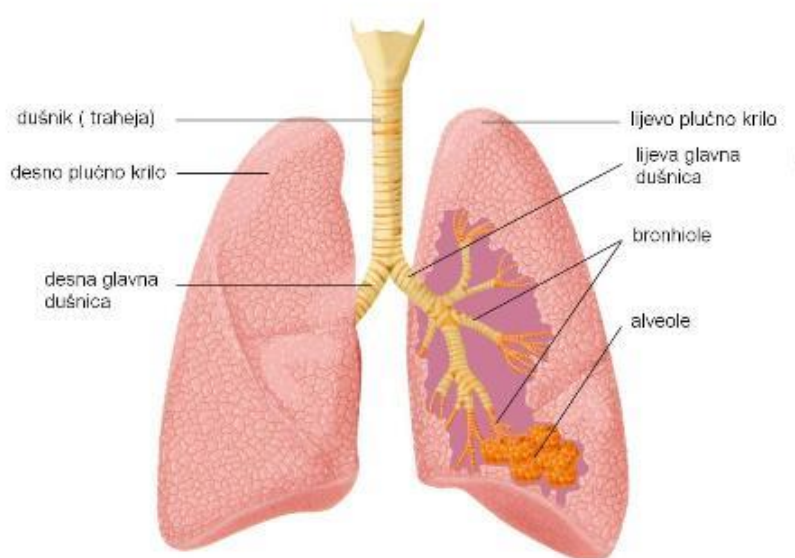
1. UVOD.....	1
1.1. Pluća	1
1.2. Karcinom pluća.....	2
1.3. Rizični faktori.....	2
1.4. Klinički simptomi	3
1.5. Epidemiologija.....	3
1.6. Dijagnostika karcinoma pluća	4
1.7. Histološka podjela karcinoma pluća.....	5
1.7.1. Adenokarcinom pluća	6
1.7.2. Adenokarcinom pluća <i>in situ</i>	7
1.7.3. Invazivni adenokarcinom	8
1.7.4. Minimalno invazivni adenokarcinom.....	8
1.7.5. Koloidni adenokarcinom pluća.....	8
1.7.6. Fetalni adenokarcinom pluća	9
1.7.7. Adenokarcinom pluća enteričkog tipa.....	9
1.7.8. TNM klasifikacija karcinoma pluća	10
1.8. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)	12
1.9.1. EGFR mutacije adenokarcinoma pluća	13
1.9. Liječenje	15
1.9.1. Pametni lijekovi	16
1.9.2. Prva generacija lijekova	16
1.9.3. Druga generacija lijekova.....	17
1.9.4. Treća generacija lijekova.....	17
1.9.5. Četvrta generacija lijekova.....	18
2. CILJ RADA.....	19
3. IZVORI PODATAKA I METODE	20
3.1 Ustroj studije i ispitanici	20
3.2 Metode analize	20
3.2.1. Patohistološki uzorci.....	20
3.2.2. Citološki uzorci	23
3.2.3. Molekularna analiza EGFR gena	24
3.2.3.1. Priprema patohistoloških i citoloških uzoraka za molekularnu analizu	25
3.2.3.2. Prikaz rezultata	26
3.2.4. Statističke metode	28
4. REZULTATI.....	29

5.	RASPRAVA.....	39
6.	ZAKLJUČAK.....	43
7.	LITERATURA.....	45
8.	SAŽETAK.....	52
9.	ABSTRACT.....	53
10.	ŽIVOTOPIS.....	54
	Izjava o akademskoj čestitosti.....	55

1. UVOD

1.1. Pluća

Respiratorni sustav ljudskog organizma je građen od nosa, ždrijela, grkljana, dušnika, dvije dušnice te pluća (1) (Slika 1). Njegova glavna uloga u organizmu je unošenje kisika i izbacivanje ugljikovog dioksida. Izmjena ovih dvaju plinova se vrši u milijunima alveola u plućima i kapilarama koje ih okružuju (2). Pluća čine glavni dišni organ čovjeka, spužvaste su građe i pri rođenju su svijetlo ružičaste boje, no tijekom života, taloženjem različitih tvari, pluća odraslog čovjeka poprime sivu boju (3). Nalaze se u šupljini prsnog koša te su građena od dva plućna krila; lijevo plućno krilo koje ima dva režnja i desno plućno krilo koje ima tri režnja (1). Čovjek svakodnevno udahne oko 8 000 litara zraka, dok istovremeno 10 000 litara krvi prođe kroz pluća čovjeka. Zahvaljujući elastičnoj građi, pluća su sklona stezanju i negativni tlak prsne šupljine sprječava njihov kolaps (3).



Slika 1. Anatomski prikaz respiratornog sustava (izvor: <https://www.onkologija.hr/rak-pluca/>)

1.2. Karcinom pluća

Karcinom pluća nastaje malignom transformacijom epitela bronha i bronhiola (4). Tri činjenice upućuju na gensku osnovu raka: karcinogeni uzrokuju mutacije DNK, često tumori pokazuju specifične abnormalnosti kromosoma te u rijetkim slučajevima raka se nasljeđuje predispozicija za nastanak istog. Brojna molekularno-genetička istraživanja su dokazala vezu između karcinoma i mutacije, i to pomoću identifikacije ciljanih gena koji postanu mutirani i koji su uključeni u malignu transformaciju. Te gene čine onkogeni i tumor-supresorski geni. Onkogeni pretežno imaju funkciju u aktivaciji stanične diobe, te se aktiviraju nakon stimulacije faktorima rasta. Mutacije koje pojačavaju aktivnost ili ekspresiju onkogenima mogu uzrokovati malignu transformaciju. Tumor-supresorski geni, u suprotnosti sa onkogenima, su geni koji normalno kodiraju proteine za sprječavanje stanične proliferacije, a mutacijama dolazi do njihove inaktivacije i nastanka tumora (5). Karcinom pluća se u 95% slučajeva razvija u bronhima, dok se u alveolama razvija u svega 3-5% slučajeva (6).

1.3. Rizični faktori

Najznačajniji rizični faktori koji pogoduju nastajanju karcinoma pluća su: pušenje, industrijsko onečišćenje zraka te plućna fibroza (4). Uz navedene čimbenike, studije prikazuju i druge uzroke, kao što su pasivno pušenje, izloženost radonu i drugim ionizirajućim zračenjima, izloženost azbestu, kronične pulmološke bolesti (tuberkuloza, kronična opstruktivna plućna bolest), te genetsku predispoziciju. Istraživanja su pokazala da izloženost radonu ili azbestu u kombinaciji sa pušenjem, znatno povećava rizik od nastanka karcinoma pluća (7).

1.4. Klinički simptomi

Simptomi karcinoma pluća nastaju zbog pritiska na bronhe i druge anatomske strukture te lokalne iritacije. Velika većina pacijenata (80-90%) je već razvila simptome u vrijeme dijagnoze. Svi klinički simptomi, znakovi i abnormalnosti u laboratorijskim testovima se mogu podijeliti u četiri skupine: simptomi vezani uz primarni tumor (uporan kašalj, zaduha, iskašljavanje krvi (hemoptiza), simptomi vezani uz širenje tumora (bol u prsištu, promuklost), sustavno djelovanje tumora (gubitak apetita, mršavljenje, mučnina, povišena temperatura, umor), te paraneoplastični simptomi (neurološki simptomi, neuroendokrini simptomi) (4,7).

1.5. Epidemiologija

Karcinom pluća jedan je od najčešće dijagnosticiranih vrsta karcinoma, kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj. U Europi je 2018. godine karcinom pluća dijagnosticiran kod više od 470 000 osoba te se prema učestalosti nalazi na drugom mjestu u muškaraca (nakon karcinoma prostate) i na trećem mjestu kod žena (nakon karcinoma dojke i karcinoma debelog crijeva). Prema posljednjim podacima Registra za rak Republike Hrvatske, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2019. godine, ukupan broj novo dijagnosticiranih osoba oboljelih od karcinoma bio je 25 352, od toga broja 17% muškaraca oboljelo je od karcinoma traheje, bronha i pluća dok je kod žena broj upola manji, odnosno 9%. Time je karcinom traheje, bronha i pluća kod muškaraca na drugom mjestu (nakon raka prostate), a kod žena na trećem mjestu (nakon raka dojke i debelog crijeva) po učestalosti primarnog mjesta tumora novo dijagnosticiranih karcinoma u Hrvatskoj. Navedeni podatci prikazuju istu incidenciju svih vrsta karcinoma u Republici Hrvatskoj i Europi (8,9).

1.6. Dijagnostika karcinoma pluća

Dijagnostika karcinoma pluća počinje od početka prvih kliničkih simptoma (kašalj, zaduha, bol u prsištu), kada obiteljski liječnik pacijenta šalje na pulmološki pregled kod specijalista pulmologa. Inicijalno se radi RTG pluća i srca gdje mogu biti prisutne promjene koje upućuju na rak pluća (tzv. „sjene na plućima“, izljev ili povećani limfni čvorovi), no ukoliko te promjene nisu prisutne ono ne isključuje bolest, te je potrebno učiniti kompjutoriziranu tomografiju (CT), magnetsku rezonanciju (MR) ili pozitronsku emisijsku tomografiju (PET) za pouzdaniju dijagnostiku (18). Ako se ustanovi neka promjena na plućima, za naknadnu patohistološku dijagnostiku karcinoma pluća potrebna je biopsija tkiva koja se izvodi nešto invazivnijom metodom, bronhoskopijom.

Bronhoskopija je jedna od najčešćih i najstarijih dijagnostičkih metoda pri čemu se savitljivim bronhoskopom, pod općom ili lokalnom anestezijom, kroz usta ili nos, ulazi u bronhalno stablo i uzima uzorak koji se potom šalje na patološku i/ili citološku obradu (19).

Biopsiju tumora, osim bronhoskopijom, možemo dobiti i CT-om vođenom biopsijom pluća iglom. Ova se dijagnostička metoda izvodi tijekom CT snimanja, pod lokalnom anestezijom, gdje se tankom iglom ulazi u pluća i uzima uzorak (8).

Endobronhalni ultrazvuk (eng. EBUS- Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration) je također invazivna pulmološka metoda koja se u praksi koristi za utvrđivanje je li se karcinom proširio na obližnje limfne čvorove (8,20).

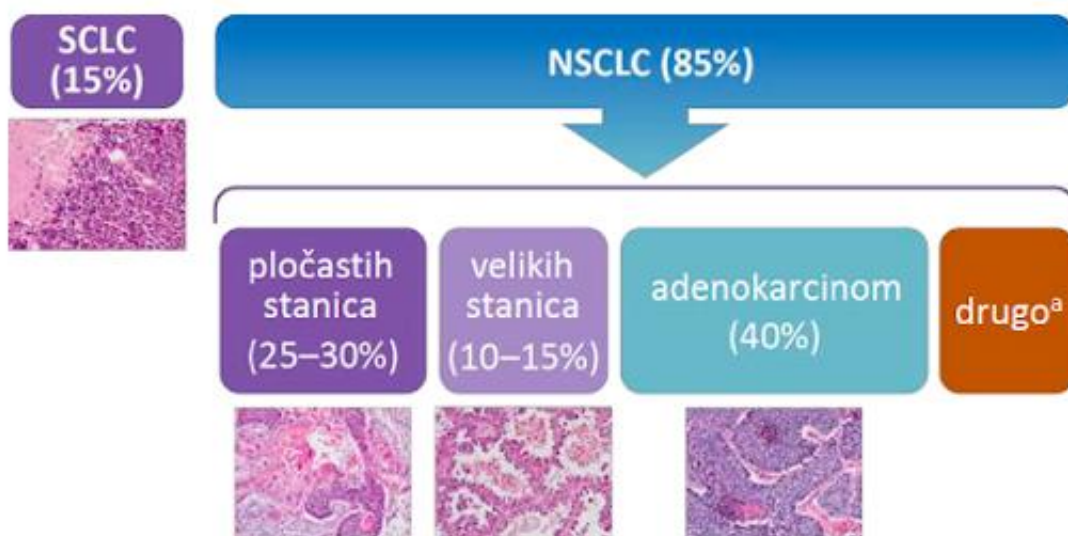
1.7. Histološka podjela karcinoma pluća

Tumori pluća mogu biti benigni ili maligni (karcinom pluća nemalih stanica i karcinom pluća malih stanica), a oni su ujedno i znatno češći. Morfološkom analizom biopsija ili citoloških uzoraka, patolog ili citolog određuju tip karcinoma, te se na temelju nalaza, pacijentu propisuje adekvatna terapija.

Karcinom pluća histološki se može podijeliti na dvije velike skupine:

- karcinom pluća nemalih stanica (eng. *non-small cell lung carcinoma*- NSCLC) i
- karcinom pluća malih stanica (eng. *small-cell lung carcinoma*- SCLC).

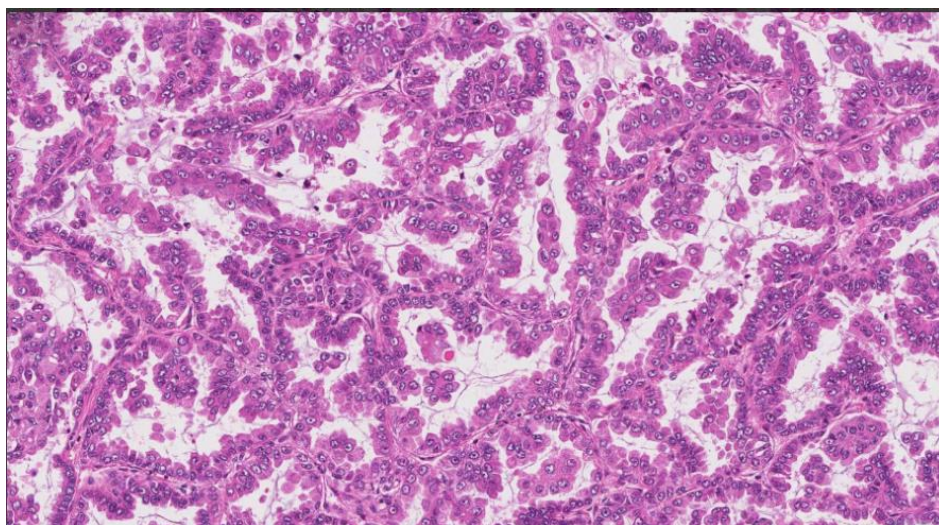
NSCLC predstavlja najčešći oblik karcinoma pluća u svijetu (80-85%). NSCLC se dijeli na sljedeće podtipove: adenokarcinom (40%), planocelularni karcinom ili karcinom pločastih stanica (25-30%) te karcinom velikih stanica (10-15%) (10) (Slika 2).



Slika 2. Grafički prikaz podjele karcinoma pluća (izvor: <https://www.abc-doctors.com/karcinomi-pluca-1-dio>)

1.7.1. Adenokarcinom pluća

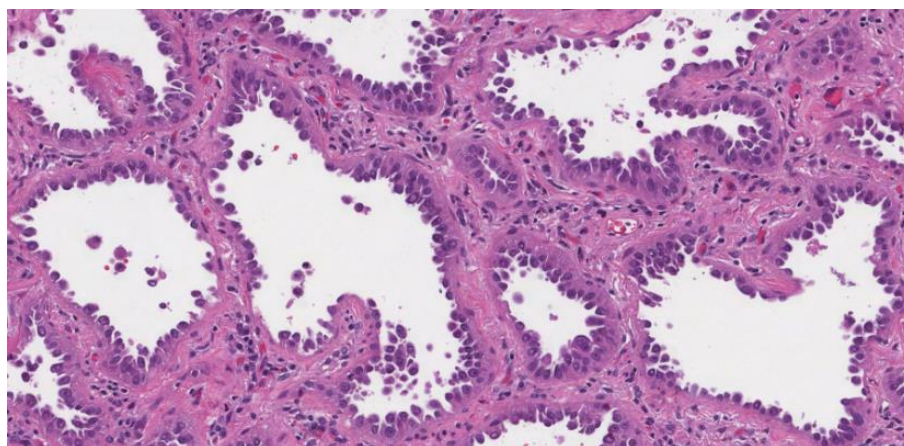
Adenokarcinom ili karcinom žlijezdanih stanica, predstavlja najčešći histološki podtip karcinoma pluća nemalih stanica u svijetu. To je maligni epitelni tumor sa žlijezdanom diferencijacijom i/ili proizvodnjom mucina (11). Ovaj tip NSCLC-a brzo raste i metastazira te bolesnici često imaju lošu prognozu. Većina adenokarcinoma nastaje u perifernim dijelovima pluća dok manji dio raste endobronhalno. Ovaj tip karcinoma se najčešće javlja kod žena, mlađih osoba i nepušača. Mikroskopski, adenokarcinom se očituje stanicama koje mogu biti stupičastog ili kuboidnog oblika i promjenjive veličine. Jezgre mogu biti hiperkromne, okruglog ili ovalnog izgleda različite veličine, dok su citoplazme vrlo obilne (21) (Slika 3.) Adenokarcinom pluća se dijeli na podtipove: adenokarcinom pluća *in situ*, invazivni i minimalno invazivni adenokarcinom pluća, koloidni karcinom pluća, fetalni adenokarcinom pluća i adenokarcinom pluća enteričnog tipa (7).



Slika 3. Histološki prikaz stanica adenokarcinoma pluća (izvor: <https://www.pathologyatlas.ca/galleries/thorax/lung/adenocarcinoma-of-the-lung/#foobox-1/1/adenocarcinoma-lung-papillary-med-mag.jpg>)

1.7.2. Adenokarcinom pluća *in situ*

Adenokarcinom *in situ* čini 10% svih adenokarcinoma pluća a definira se kao adenokarcinom koji sadrži lepidni uzorak promjera ≤ 3 cm, što znači da tumorske stanice rastu duž unutarne ovojnice alveola (4). Ovaj podtip adenokarcinoma čini morfološki upečatljiva lezija jedinstvena za pluća. Na niskom mikroskopskom povećanju tumorske stanice izgledaju kao normalni pneumociti. Epitelne stanice ovog tumora mogu biti kockastog ili stupastog oblika te mogu činiti velike nakupine koje se često nalaze u alveolarnim kanalima zajedno s makrofagima (Slika 4). Također, tumorske stanice mogu nalikovati na Clara stanice ili pneumocite tipa II (12). Tumori su veličine ≤ 20 mm ali mogu biti i do 30 mm. Podtipovi adenokarcinoma *in situ* su: ne mucinozni i mucinozni tumori pluća (7).



Slika 4. Histološki prikaz stanica adenokarcinoma pluća *in situ* (izvor: <https://www.pathologyatlas.ca/galleries/thorax/lung/adenocarcinoma-in-situ-of-the-lung/>)

1.7.3. Invazivni adenokarcinom

Većina adenokarcinoma pluća je invazivna. Sadrže mješavinu histoloških podtipova, dok manji broj invazivnih adenokarcinoma ima samo jedan obrazac rasta. Preko 80% resekiranih adenokarcinoma ima najmanje dva a često i tri pojedinačna tipa, dok ih manje od 10% nema lepidnu komponentu. U histopatološkoj dijagnostici navode se vrsta tumora te približan postotak prisutnih podtipova tumora. Podtipove čine lepidni, acinarni, papilarni, mikropapilarni i solidni tumori s proizvodnjom mucina. Tumorske stanice mogu biti kockastog ili stupičastog oblika s velikim istaknutim jezgrama. Ovi tumori pokazuju imunohistokemijsku ekspresiju markera pneumocita povezanih sa adenokarcinomom pluća (npr. TTF-1, napsin A) ili histokemijskom metodom za ekspresiju mucina (npr. PAS) u više od 5 tumorskih stanica (7).

1.7.4. Minimalno invazivni adenokarcinom

Minimalno invazivni adenokarcinom ili MIA čini pojedinačni, diskretni i ograničeni adenokarcinom do 5 mm ili manji s prevladavajućim lepidnim uzorkom i stromalnom invazijom. Kod ovog podtipa adenokarcinoma moguće je više žarišnih lezija, ali pojedinačna lezija ne smije biti veća od 0,5 cm. Žarišna lezija mora imati nelipidnu strukturu ili pojedinačne tumorske stanice koje infiltriraju miofibroblastičnu stromu. MIA je obično ne mucinoznog tipa, dok rijetko može biti mucinozni ili mješovitog tipa. Dijagnoza minimalno invazivnog adenokarcinoma se ne može razmatrati u slučajevima tumorske nekroze ili kod invazije limfnih ili krvnih žila ili pleure (12,7).

1.7.5. Koloidni adenokarcinom pluća

Koloidni adenokarcinom pluća je invazivni adenokarcinom kod kojeg je prisutna velika količina ekstracelularnog mucina koji širi alveole i samim time ih uništavaju te na taj način potpuno uklanjaju plućni parenhim. Koloidni tumori se najčešće javljaju u perifernom parenhimu pluća. Histološki, tumorske stanice su kubičnog ili stupastog oblika i mogu se naći

u tzv. bazenima mucina zajedno sa ostacima alevolarnih stijenki i fibroznog tkiva. Ovi tumori su rijetki i uz potpunu resekciju tvorbe, bolesnici imaju dobru stopu preživljenja (7,21).

1.7.6. Fetalni adenokarcinom pluća

Ovaj rijedak podtip adenokarcinoma pluća, uglavnom se nalazi na periferiji pluća te se često otkrije slučajno. Veličina tumora je 10-120 mm te se često dijagnosticira kod teških pušača. Tumori su čvrsti, bijelo-sivi ili žučkastosmeđe boje, oštih i lobularnih rubova (22). Ovaj se karcinom dijeli na fetalni adenokarcinom visokog i niskog stupnja. U niskom stupnju, pacijenti u ranoj fazi i ne metastaziranim karcinomom u limfne čvorove imaju dobru prognozu, dok pacijenti sa fetalnim karcinomom visokog stupnja imaju stopu preživljavanja 44% (21).

1.7.7. Adenokarcinom pluća enteričkog tipa

Adenokarcinom enteričkog tipa je dobio naziv zbog sličnosti sa kolorektalnim adenokarcinomom. Tumori su veličine 10-115 mm, dobro su ograničeni, bijele do sive boje, često sa žučkastim pjegama i većinom se nalazi u periferiji pluća. Bolest se najčešće dijagnosticira kod starijih muškaraca pušača sa već uznapredovalom bolesti. Bitno je isključiti metastazu kolorektalnog karcinoma u pluća, pomoću imunohistokemijskih markera (7).

1.7.8. TNM klasifikacija karcinoma pluća

Ova klasifikacija se odnosi na karcinome pluća, uključujući karcinom pluća nemalih stanica, karcinom pluća malih stanica i bronhopumonarne karcinoidne tumore, te se ne odnosi na sarkome i druge rijetke tumore. Ovu podjelu karcinoma pluća preporuča i Unija za međunarodnu kontrolu raka (*engl. Union for International Cancer Control, UICC*) te ona ujedno i predstavlja najčešće korišteni sustav za određivanje proširenosti tumora.

TNM sustav sastoji se od kategorije T koja označava prisutnost i područje primarnog tumora, kategorije N koja označava regionalne limfne čvorove te proširenost karcinoma na iste (medijastinalni, hilarni, lobularni, i supraklavikularni limfni čvorovi) te kategorije M koja označava udaljene metastaze karcinoma pluća. Svakom od slova pridodaje se broj koji u slučaju primarnog tumora označava veličinu ili lokalnu proširenost primarnog tumora, a u slučaju regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza broj označava njihovu prisutnost ili odsutnost (Tablica 1) .

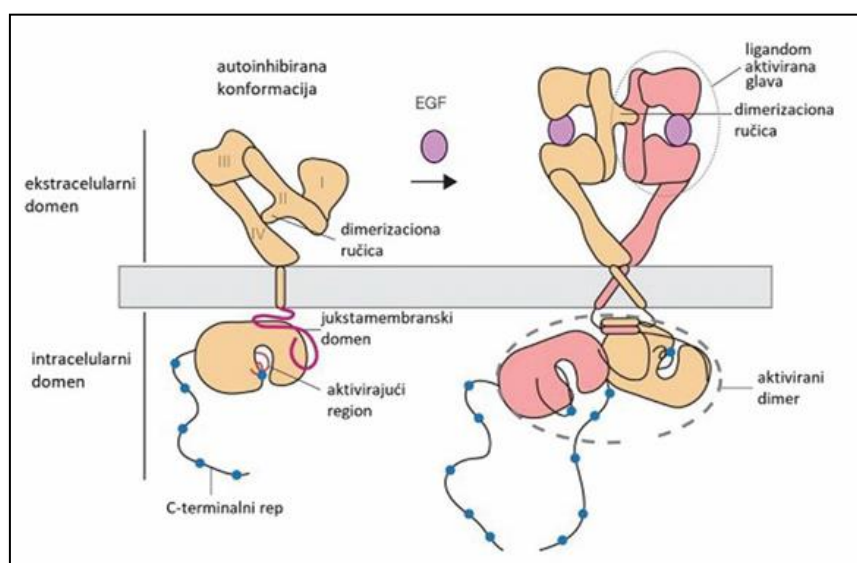
Za sve tri kategorije T, N i M su potrebne određene dijagnostičke metode: klinički pregled, endoskopija, neke radiološke metode i/ili kirurški odstranjen tumor (7,8). Stadij I-II predstavljaju rani stadij NSCLC-a, stadij III predstavlja lokalno uznapredovali NSCLC a stadij IV predstavlja metastatski stadij NSCLC-a.

Tablica 1 TNM klasifikacija karcinoma pluća (izvor: WHO Classification of Tumours Editoria Bord. Thoracic tumours.: International Agency for Research on Cancer. Lyon; 2021.)

STADIJ IA (T1-N0-M0)	Tumor nije veći od 3 cm i nije proširen na obližnje limfne čvorove
STADIJ IB (T2a-N0-M0)	Tumor je veličine 3-4 cm i nije proširen na obližnje limfne čvorove
STADIJ IIA (T2b-N0-M0)	Tumor je veličine 4-5 cm i nije proširen na obližnje limfne čvorove
STADIJ IIB (T1/2-N1-M0)	Tumor nije veći od 5 cm ali se proširio na obližnje limfne čvorove
STADIJ IIB (T3-N0-M0)	Tumor je veličine 5-7 cm (ili ima više tumora u istom režnju), nije proširen na obližnje limfne čvorove (može biti proširen na druge dijelove pluća ili okolna područja izvan pluća)
STADIJ IIIA (T1/2-N2-M0)	Tumor nije veći od 5 cm ali je proširen na limfne čvorove, ali ne i druge dijelove tijela
STADIJ IIIA (T3-N1-M0)	Tumor je veličine 5-7 cm ili postoji više tumora u istom režnju, proširen je na obližnje limfne čvorove te može biti i proširen na druge dijelove pluća ili okolna područja izvan pluća)
STADIJ IIIA (T4-N0/1-M0)	Tumor je veći od 7 cm i proširen je na tkiva i organe udaljene od pluća (srce, dušnik ili jednjak), ali se nije proširio na druge dijelove tijela; može biti više tumora u različitim režnjevima istog plućnog krila; može ali ne mora biti proširen na obližnje limfne čvorove
STADIJ IIIB (T1/2-N3-M0)	Tumor nije veći od 5 cm, proširen je na udaljenije limfne čvorove, ali nije proširen na bilo koji drugi dio tijela
STADIJ IIIB (T3-N2-M0)	Tumor je veličine 5-7 cm, može biti više od jednog tumora u istom plućnom režnju; proširen je na obližnje limfne čvorove te može biti proširen na druge dijelove pluća i obližnje strukture
STADIJ IIIB (T4-N2-M0)	Tumor je veći od 7 cm te je proširen na tkiva i strukture udaljene od pluća (srce, dušnik ili jednjak); nije proširen u drugi dio tijela; proširen je na udaljenije limfne čvorove; moguće je više tumora u različitim režnjevima pluća
STADIJ IV (bilo koji T- bilo koji N- M1)	Tumor je bilo koje veličine, nalazi se u oba plućna krila, može ali i ne mora biti proširen na limfne čvorove, proširen je na drugi dio tijela; može uzrokovati nakupljanje tekućine oko pluća ili srca

1.8. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)

EGFR ili receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *Epidermal growth factor receptor*; *HER-1/II erbB1*) je transmembranski glikoprotein koji predstavlja jedan od četiri erbB obitelji receptora tirozin kinaze (HER2/erbB2, HER3/erbB3, HER4/erbB4), s molekulskom težinom u rasponu od 170-185 kDa (15). Ovaj protein je građen od izvanstanične receptorske domene, transmembranske regije i unutarstanične domene s funkcijom tirozin kinaze. Domena tirozin kinaze EGFR-a građena je od 2 reznja, N-reznja i C-reznja, koji su međusobno odvojeni rascjepom za vezanje ATP-a. N-režanj EGFR kinaze uglavnom se sastoji od β -lanaca i regulatornih α C-heliksa, dok je veći C-režanj uglavnom α -helikalni i sadrži aktivacijsku petlju (A-petlja) (6). Ova domena sadrži tirozinske ostatke koji su mjesta fosforilacije sa ulogom u signalnoj transdukciji koja slijedi nakon aktivacije receptora. Izvanstaničnu regiju EGFR-a čine dvije homologne ligand-vezujuće domene (I i III) i dvije domene koje su bogate cisteinom (II i IV) (Slika 5) (14).



Slika 5 Grafički prikaz strukture pojedinačnog EGFR proteina (lijevo) i aktiviranog dimera (desno) (izvor: [Drljača J. et al. • MD-Medical Data 2019;11\(1\): 035-041](#))

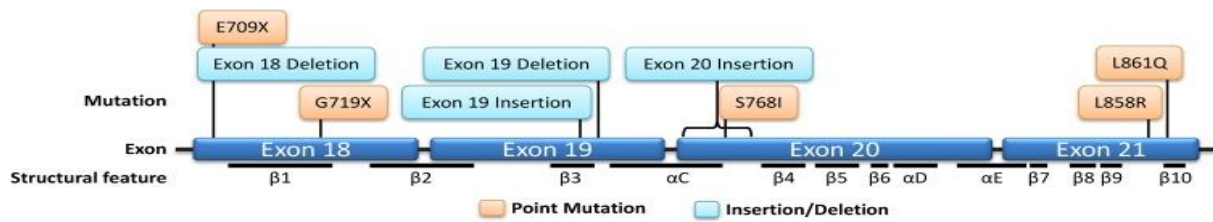
Receptor EGFR prelazi iz neaktivnog oblika monomera u dimer vezanjem za ligande putem izvanstanične domene pri čemu se može vezati na srodne ligande kao što su epidermalni faktor rasta (EGF), transformirajući faktor rasta alfa ($TGF\alpha$) ili betacelulin (BTC) (15). Vezanje liganada dovodi do autofosforilacije receptorske tirozin kinaze koja aktivira signalne

unutarstanične puteve (npr. RAS-RAF/MaPK i PI3K/AKT/Mtor) a koji su uključeni u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije, migracije, genske ekspresije i apoptoze. EGFR je prisutan u niskim razinama u normalnim zdravim stanicama (40 000 do 100 000 receptora po stanici) no može biti prekomjerno izražen u nizu tumorskih stanica, uključujući rak dojke NSCLC, rak bubrega, rak jajnika i rak kolona. Takva prekomjerna ekspresija proizvodi intenzivno stvaranje signala i aktivaciju nizvodnih signalnih putova, što rezultira stanicama koje imaju agresivniji rast i karakteristike invazivnosti. Stimulacija ovih signalnih puteva također utječe na veću pokretljivost, adheziju i metastaziranje tumorskih stanica (16). Kod tumora pluća nemalih stanica EGFR je prekomjerno izražen u 40-80% slučajeva te je samim time povezan sa visokom stopom metastaza, slabijom diferencijacijom tumora i visokom stopom rasta tumora (17).

1.8.1. EGFR mutacije adenokarcinoma pluća

Mutacije receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) drugi su najčešći onkogeni pokretači karcinoma pluća nemalih stanica (NSCLC) (13). Aktivirajuće mutacije u genu receptora faktora rasta (EGFR) najčešće se javljaju u karcinomima pluća, posebno u nemalim stanicama karcinoma pluća (NSCLC), no mogu biti prisutne i u nekim drugim karcinomima kao što su karcinom debelog crijeva ili dojke. Ove mutacije pojavljuju se u 10-20% pacijenata bijele rase i 40-50% pacijenata azijskog porijekla s dijagnosticiranim rakom pluća nemalih stanica (17), a češće se javljaju kod žena koje ne konzumiraju cigarete (35). Dvije najčešće i često nazivane „klasične“ mutacije su delecija 747-749 u egzonu 19 i točkasta mutacija L858R u egzonu 21 te one čine 85-90% svih EGFR mutacija. Ostale mutacije su tzv. „rijetke“ mutacije u NSCLC-u koje uključuju točkaste mutacije (npr. E709, G719X, S768I, L861Q), insercije i delecije u egzonima 18-25, te složene mutacije čiji klinički značaj još nije u potpunosti jasan (Slika 6) (14,17).

Točkasta mutacija L858R u egzonu 21 najčešće je detektirana mutacija u EGFR genu. U ovoj mutaciji dolazi do transverzije timina u guanin što rezultira supstitucijom leucina argininom u egzonu 21 na kodonu 858 (36).



Slika 6 . Prikaz položaja EGFR mutacija i strukturne značajke EGFR gena. Narančasti okviri označavaju točkaste mutacije, plavi okviri prikazuju mutacije insercije i delecije (Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7083237/>)

Druga najčešće detektirana mutacija u mutacijama EGFR gena u karcinomu pluća je delecija u egzonu 19 (del747-750) zbog koje dolazi do eliminacije leucin-arginin-glutamat-alanin sekvence u tirozin kinaza domeni EGFR gena (17, 36).

Treba napomenuti da mutacije EGFR-a nisu prisutne u svim slučajevima navedenih karcinoma. Njihova prisutnost varira ovisno o populaciji, etničkoj grupi i drugim čimbenicima. Stoga je testiranje EGFR biomarkera važno u identifikaciji pacijenata koji mogu imati koristi od ciljane terapije usmjerene na EGFR signalizaciju.

1.9. Liječenje

Liječenje karcinoma pluća ima različit pristup. Liječenje ovisi o stadiju i vrsti karcinoma, općem zdravstvenom stanju te preferencijama samog pacijenta, a najčešće je kombinacija operacije, radioterapije i kemoterapije. Nova saznanja o molekularnim svojstvima pojedinih karcinoma posljedično dovode do promjena u pristupu liječenja karcinoma iz godine u godinu. Karcinom nemalih stanica se liječi kirurški te je indiciran u 20-30% pacijenata, ukoliko je tumor lokaliziran ili proširen na okolna tkiva a najčešće se radi lobektomija (23), odnosno uklanjanje jednog režnja pluća. Osim toga, moguća je klinasta ili segmentalna resekcija, kojom se uklanja vrlo mali dio pluća. Također se kirurški može ukloniti čitavo plućno krilo što se naziva pulmektomija (8).

Ako pacijent ne može pristupiti operaciji ili je već operiran ali je karcinom zahvatio limfne čvorove liječi se kemoterapijom baziranoj na platini (24). Kemoterapija djeluje na tumorske stanice tako da sprječava njihov rast i dijeljenje. Istovremeno djeluje i uništava i tumorske i zdrave stanice, te samim time, ima cijeli niz loših nuspojava (8).

Imunoterapija je jedan od novijih metoda liječenja onkoloških bolesti. Za razliku od kemoterapije, koje uništavaju tumorske i zdrave stanice, imunoterapija potiče imunološki sustav pacijenta da uništi stanice tumora (25).

Radioterapija upotrebljava ionizirajuće zračenje kojim uništava DNK stanica karcinoma te time uzrokuje smrt stanice. Radioterapija se može primijeniti u liječenju NSCLC-a ranog stadija, nakon kemoterapije ili istovremeno (8).

1.9.1. Pametni lijekovi

Sve do nedavno, uobičajeni pristup liječenju karcinoma pluća bila je kemoterapija bazirana na platini. Liječenje je davalo skromne rezultate te je kod većine pacijenata došlo do progresije bolesti u razdoblju nakon tri do pet mjeseci. Razvoj novih lijekova u proteklom desetljeću pokazalo se izazovnim. Nakon brojnih istraživanja identificirano je nekoliko onkogenih pokretača same bolesti koji se mogu aktivno ciljati. Ciljana terapija ili pametni lijekovi, kako se još nazivaju, djeluju precizno na promjene na stanicama karcinoma koje uzorkuju njihov rast, diobu i širenje. Tumori sa mutacijom EGFR gena ovise o aktivnosti EGFR-a za stimulaciju signalnih putova, te je moguće liječenje takvih tumora oralnim putem sa inhibitorima tirozin kinaze (TKI) koji blokiraju signalizaciju EGFR-a. Brojna istraživanja pokazala su da ciljana terapija NSCLC-a s pozitivnim EGFR mutacijama ima bolji ishod od klasične kemoterapije te se trenutno smatra kao prva linija liječenja NSCLC-a (26). Ciljana terapija na tumorske stanice djeluje znatno selektivnije te je time omogućila manju toksičnost i bolju učinkovitost u usporedbi sa standardnom kemoterapijom na bazi platine (27). Različite karakteristike razvijenih inhibitora tirozin kinaze te period njihovog otkrića, doveli su do kategorizacije lijekova u tri generacije, dok je četvrta generacija u razvitku.

1.9.2. Prva generacija lijekova

Gefitinib (Iressa) i Erlotinib (Tarceva) čine EGFR inhibitore tirozin kinaze (engl. Tyrosine kinase inhibitors - TKI) prve generacije. Oni se reverzibilno vežu na kinaznu domenu EGFR-a i snažno inhibiraju receptor kada je aktiviran uobičajenim mutacijama – delecijom u egzonu 19 ili supstitucijom egzona 19, L858R (29). Ovi lijekovi djeluju na način da prekidaju signalizaciju EGFR-a inhibirajući vezanje ATP-a za EGFR te posljedično dolazi do inhibicije aktivacije EGFR-a i stanične proliferacije (30). Nažalost, većina pacijenata s vremenom razvije rezistenciju na navedene lijekove. Postoje tri glavne kategorije stečene rezistencije: ciljna alteracija zbog pojave tercijarnih EGFR mutacija (npr. T790M mutacija u egzonu 20); aktivacija drugih signalnih putova koji zaobilaze inhibiciju EGFR-a, i histološke promjene koje uključuju prijelaz iz epitela u mezenhim ili prijelaz u histološke značajke malih stanica (31).

1.9.3. Druga generacija lijekova

EGFR TKI druge generacije djeluju istovremenom i ireverzibilnom inhibicijom više ErbB receptora. Afatinib (Gilotrif) je lijek druge generacije koji djeluje kao ireverzibilni inhibitor kovalentno se vežući za receptor pri čemu uzrokuje jaču inhibiciju, manju toksičnost lijeka te dulje preživljenje pacijenta (14). Afatinib je odobren za liječenje NSCLC-a s pozitivnom EGFR mutacijom (najčešće L858R ili delecija u egzonu 19), a također se koristi i u liječenju karcinoma skvamoznih stanica pluća nakon neuspjele prve linije kemoterapije. Kao i Afatinib, Dakomitinib (Vizimpro) također ireverzibilno inhibira EGFR, HER2 i ErbB4, iako je snažniji u inhibiciji EGFR od ostalih članova HER obitelji. Ovaj lijek također se primjenjuje pri liječenju NSCLC-a s pozitivnim EGFR mutacijama L858R ili delecije u egzonu 19 (29).

1.9.4. Treća generacija lijekova

Trećoj generaciji EGFR TKI pripada lijek Osimertinib (Tagrisso), oralni lijek koji selektivno i ciljano djeluje na određene EGFR mutacije, te se primjenjuje u odraslih bolesnika s rakom pluća nemalih stanica (engl. non-small cell lung cancer, NSCLC) stadija IB - IIIA kojima je tumor pozitivan na deleciju egzona 19 ili supstituciju egzona 21 (L858R). Također se koristi kod liječenja odraslih bolesnika s lokalno uznapredovalim ili metastatskim NSCLC-om pozitivnim na sekundarnu mutaciju T790M EGFR za koju je dokazano da je jedna od značajnijih uzroka razvoja stečene rezistencije prilikom primjene prethodnih generacija lijekova (31,33).

Osimertinib se pokazao boljim lijekom od kemoterapije na bazi platine u drugoj liniji liječenja pacijenata s T790M pozitivnim NSCLC-om. Ovaj lijek se pokazao superiornijim u usporedbi s Gefitinibom ili Erlotinibom te se samim time stopa preživljenja pacijenata znatno povećala (29). Uz Osimertinib, u trećoj generaciji EGFR TKI lijekova pripadaju Olmutinib, Nazartinib, Avitinib i drugi, no unatoč razvitku ovih drugih oblika, Osimertinib je još uvijek prvi izbor u liječenju NSCLC-a (31).

1.9.5. Četvrta generacija lijekova

Nova istraživanja omogućuju bolje razumijevanje i identifikaciju specifičnih mehanizama otpornosti na EGFR-TKI te se s vremenom pojavljuju novi načini liječenja za prevladavanje tih mehanizama otpornosti. C797S mutacija, koja se može pojaviti u prisutnosti ili odsutnosti T790M mutacije čini najčešći mehanizam otpornosti EGFR-a na lijek Osimetrinib (33). Stoga su EGFR-TKI četvrte generacije u razvoju kako bi prevladale ove rezistentne mutacije. Brigatinib se pokazao kao potencijalni novi lijek za tzv. triple-mutant EGFR, odnosno, tri rezistentne mutacije T790M/C797S/L858R. Preliminarni podatci studija prikazuju obećavajuće rezultate s terapijama četvrte generacije EGFR-TKI, no, kliničke podatke istraživanja tek je potrebno objaviti (33).

2. CILJ RADA

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

- utvrditi učestalost i tip mutacija EGFR gena u pacijenata sa dijagnosticiranim karcinomom pluća u istraživanom periodu
- procijeniti rizične faktore za razvoj karcinoma pluća na temelju provedene statističke analize podataka o spolu, dobi, te pušačkom statusu

3. IZVORI PODATAKA I METODE

3.1 Ustroj studije i ispitanici

U ovu retrospektivnu studiju je uključen 251 pacijent kojima je dijagnosticiran karcinom pluća na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava u razdoblju od 01. siječnja 2021. godine do 01. travnja 2023. godine. Podatci o ispitanicima prikupljeni su iz računalne baze podataka Issa na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju. Prikupljeni podatci uključuju spol i dob ispitanika, vrstu biološkog uzorka, tip karcinoma te pušački status pacijenta. Od ukupnog broja zaprimljenih uzoraka, 103 je bilo od ženskih osoba, dok je 148 bilo od muškaraca. Najmlađi pacijent imao je 33 godine, dok je najstariji imao 89 godine, a prosječna dob testiranih osoba bila je 67 godina. Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava (2023/1605-01, 16. svibanj 2023.god) te Etičko povjerenstvo Sveučilišnog odjela za forenzične znanosti (KL:025-03/23-03/17, UR: 2181-227-102/01-3, 16. svibanj 2023.god).

3.2. Metode analize

3.2.1. Patohistološki uzorci

Patohistološke uzorke čine male bronhoskopske biopsije te intraoperativne biopsije karcinoma pluća. Nakon preuzimanja biopsija pluća, u laboratoriju uzorci prolaze fiksaciju u 4% pufiriranom formalinu (najmanje 24 h), a zatim se dalje pripremaju u uređaju Histokinet, odnosno automatskom tkivnom procesoru (Tissue-Tek VIP® 6 AI, Sakura, Japan) po protokolu histološkog laboratorija Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava (Tablica 2). U uređaju se uzorci dehidriraju kroz seriju alkohola uzlazne koncentracije te infiltriraju ksilolom, a zatim se uklapaju u parafinski blok. Blokovi se režu na rotacijskom mikrotomu (HistoCore BIOCUT, Leica Biosystems) u rezove debljine 5 µm. Potom slijedi deparafinizacija kroz ksilol i seriju alkohola opadajuće koncentracije (Tablica 3). Presjeci tkiva zatim su postavljeni na predmetna stakalca (Avantor, VWR, 631-1553, 76x26 mm, 1,0 mm) i obojani klasičnom hemtoksilin-eozin metodom (Slika 7).

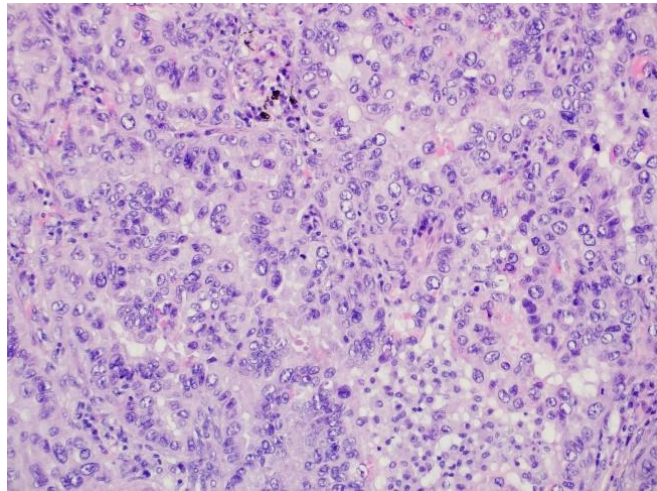
Tablica 2 Protokol procesuiranja tkiva u histokinetu
(prema : Klinički zavod za patologiju i citologiju, KB Dubrava)

Kemikalija	Vrijeme	Temp. (°C)
1. Formalin	3 min	45
2. 70% alkohol	1 h	37
3. 70% alkohol	1 h	37
4. 96% alkohol	1 h	37
5. 96% alkohol	1 h	37
6. 96% alkohol	1,30 h	37
7. 100% alkohol	1,30 h	37
8. 100% alkohol	1,30 h	37
9. Ksilen	1,30 h	37
10. Ksilen	1,30 h	37
11. Parafin	1,30 h	63
12. Parafin	1,30 h	63
13. Parafin	10 min	63
14. Parafin	~ min (do vađenja biopsija iz histokineta)	63

Tablica 3 Protokol bojanja hematoksilin-eozin metodom
(prema: Klinički zavod za patologiju i citologiju, KB Dubrava)

Kemikalija	Vrijeme	Kemikalija	Vrijeme
Supstitucija ksilola	3 min	Ispiranje u vodi	10 urona
Supstitucija ksilola	3 min	Kiseli alkohol	1 uron
Supstitucija ksilola	3 min	Ispiranje u vodi	10 urona
Supstitucija ksilola	3 min	Eozin	1 min
100% alkohol	1 min	Ispiranje u vodi	10 urona
96% alkohol	1 min	70% alkohol	2 min
70% alkohol	1 min	96% alkohol	2 min
Hematoksilin	3 min	100% alkohol	2 min
Ispiranje u vodi	10 urona	Ksilen	3 min
Scott otopina	1 min	Ksilen	3 min
		Sušenje preparata	2 min

Nakon što pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX, Njemačka), pregleda preparate pod povećanjem od najmanje 10x do 100x, liječnik patolog može odrediti dodatna histološka ili imunohistokemijska bojanja. Najčešće su to TTF-1 i p40 te prediktivni markeri za karcinom pluća: PDL-1 SP263, ALK D5F3 i ROS-1 (SP384) (Ventana Benchmark Ultra, Roche Diagnostics). Nakon što patolog diferencira adenokarcinom pluća u uzorku, određuje dodatno molekularno-genetičko testiranje na EGFR mutaciju. Za molekularnu dijagnostiku potreban je određeni parafinski tumorski blok koji ima najveći broj tumorskih stanica. Na hematoksilin-eozin stakalcu patolog označava određeni dio tumora sa najvećim tumorskim udjelom te se taj rez koristi za daljnju molekularnu analizu.



Slika 7 Adenokarcinom pluća. Hematoksilin-eozin obojenje, x200

(Izvor: Zavod za patologiju i citologiju, KB Dubrava, Zagreb; arhivski materijal)

3.2.2 Citološki uzorci

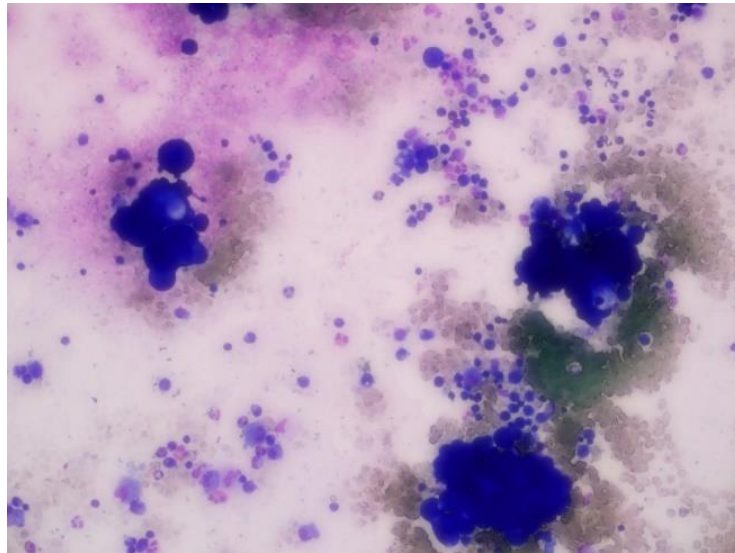
Najčešći citološki uzorci upućeni na molekularnu analizu karcinoma pluća su bris bronha četkicom, pleularni izljev te punkcije limfnih čvorova. Nakon punkcije ili brisa bronha četkicom, liječnik uzorak stavlja na predmetna stakalca, od pleularnog izljeva ili punkcije se napravi razmaz, dok se kod brisa bronha četkicom, kružnim pokretima uzorak sa četkice stavlja na predmetno stakalce (Avantor, VWR, 631-1553, 76x26 mm, 1,0 mm). Svi uzorci na stakalcu se nakon zaprimanja u laboratorij fiksiraju na zraku i zatim bojaju May-Grünwald Giemsa (MGG) metodom (Slika 8) čiji je protokol prikazan u tablici 4.

Tablica 4 Protokol bojanja prema May-Grünwald Giemsa metodi

Kemikalija	Vrijeme
1. Fiksiranje preparata na zraku	1 h
2. May-Grünwald	3-5 min (ovisno o debljini razmaza)
3. Destilirana voda	10 urona
4. Destilirana voda	10 urona
5. Otopina Giemse 5%	10-15 min (ovisno o debljini razmaza)
6. Destilirana voda	10 urona
7. Destilirana voda	10 urona
8. Brisanje stakala s donje strane 80% alkoholom	
9. Sušenje stakalaca	
10. Označavanje stakalaca voodootpornim markerom	

Nakon što pregleda tako pripremljene uzorke pod svjetlosnim mikroskopom, pod povećanjem od najmanje 10x do 60x (Olympus BX, Njemačka), osim klasičnih bojanja, liječnik citolog može tražiti i dodatna imunocitokemijska bojanja za identifikaciju slabo diferenciranih i nediferenciranih malignih tumora. Najčešće su to TTF-1 i p40 te prediktivni biomarkeri za karcinome pluća: PD-L1 22C3 (Dako Autostainer Lien 48+, Sakura), ALK D5F3 i ROS-1

(SP384) (Ventana Benchmark Ultra, Roche Diagnostics). Ukoliko liječnik citolog pomoću MGG i imunocitokemijskih metoda potvrdi dijagnozu adenokarcinoma pluća, označava područje na stakalcu sa najviše tumorskih stanica te ga šalje na molekularnu analizu kako bi se utvrdilo je li uzorak pozitivan na neku od EGFR mutacija. Obzirom na rezultat molekularnog testiranja, odnosno prisutnost ili odsutnost mutacije, pacijentu se propisuje adekvatna terapija.



Slika 8. Adenokarcinom pluća. May-Grünwald Giemsa metoda, x 200

(Izvor: Zavod za patologiju i citologiju, KB Dubrava, Zagreb; arhivski materijal)

3.2.3 Molekularna analiza EGFR gena

Detekcija mutacija receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) preporučuje se u svih bolesnika s uznapredovalim karcinomom pluća nemalih stanica zbog dokazane učinkovitosti standardne terapije inhibitorima tirozin kinaze u pacijenata s mutiranim EGFR-om. U svrhu utvrđivanja prisutnosti mutacije u uzorcima uklopljenim u parafinske blokove (FFPE uzorci) ili citološkim razmazima koristi se Idylla™ EGFR Mutation Test (Biocartis, Belgija). To je in vitro dijagnostički test za kvalitativnu detekciju EGFR točkastih mutacija u egzonu 18 (G719A/C/S), egzonu 21 (L858R, L861Q), egzonu 20 (T790M, S768I), deleciju u egzonu 19 te insercije u egzonu 20. Test se provodi na uređaju Idylla™ (Biocartis, Belgija). Idylla™ je

potpuno automatiziran i brz sustav za detekciju ciljanih mutacija koristeći jednokratnu patronu specifičnu za testiranje (Slika 9). Sustav Idylla™ pokriva cijeli proces analize DNK, uključujući lizu stanice, ekstrakciju DNK, amplifikaciju (PCR reakciju), detekciju u stvarnom vremenu te analizu podataka. Čitav proces analize u samom uređaju odvija se unutar 150 minuta. U samoj patroni testa nalaze se svi potrebni reagensi za PCR reakciju, uključujući i unutarnju kontrolu. Za molekularnu analizu je potrebno najmanje 10% tumorskih stanica u citološkom razmazu ili parafinskom bloku.



Slika 9. Biocartis EGFR test

(izvor: <https://www.biocartis.com/en/meet-idylla/idylla-oncology-tests/idylla-egfr-mutation-test>)

3.2.3.1. Priprema patohistoloških i citoloških uzoraka za molekularnu analizu

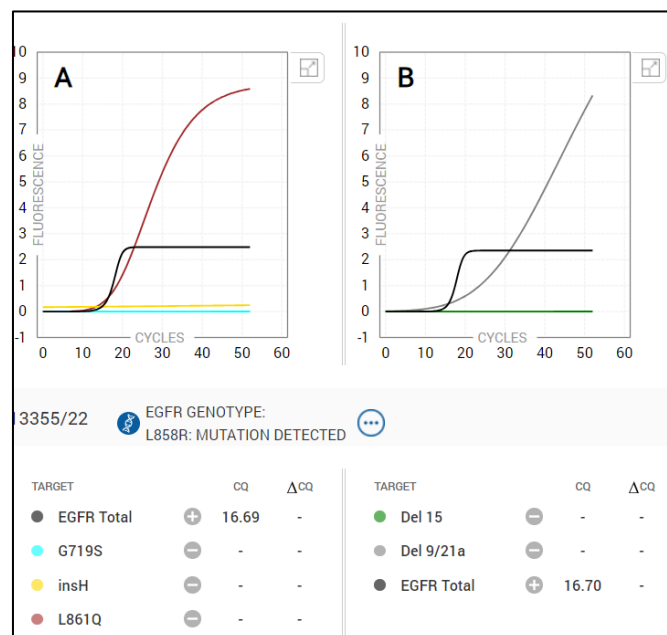
Parafinski blok se reže na mikrotomu koji je prethodno potrebno detaljno očistiti PCR sprejom (PCR Clean™, Minerva Biolabs) koji degradira nukleinske kiseline i inaktivira enzime na površini, kako ne bi došlo do kontaminacije. Histološki uzorak se reže na točno određenom mjestu u parafinskom bloku koji je patolog označio na hemtoksilin-eozin stakalcu. Debljina reza mora biti 5 μm, te ovisno o veličini uzorka, potrebno je staviti 1-2 reza (≥ 1 mm²). Uzorak se stavlja između dva filter papirića namočena sterilnom vodom te se sterilnom pincetom stavlja u patronu Idylla™ EGFR Mutation Test za daljnju analizu na Idylla™ uređaju.

Citološki razmazi se sastružu sa predmetnog stakalca sterilnim skalpelom te se uzorak stavlja između dva filter papirića natopljena sterilnom vodom. Također je bitno da je radna površina

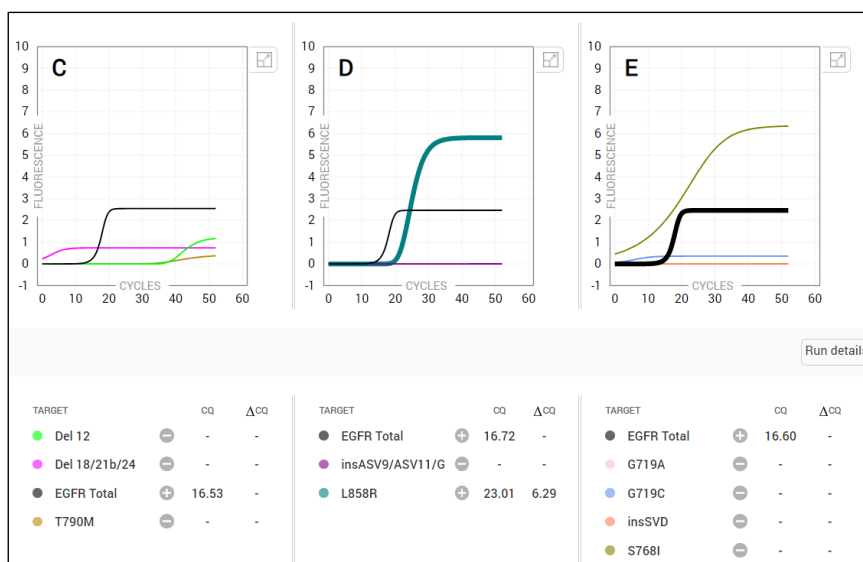
sterilna kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka. Filter papirići s uzorkom se stavljaju sterilnom pincetom u patronu Idylla™ EGFR Mutation Test za daljnju analizu.

3.2.3.2. Prikaz rezultata

Nakon završene analize u Idylla™ platformi rezultati se softverski obrađuju te su vidljivi na Idylla™Explore web stranici gdje se uz potrebne korisničke podatke i lozinku mogu analizirati grafikoni koji prikazuju PCR krivulje analiziranih uzoraka. Rezultati su grafički jednostavno prikazani pomoću pet setova grafikona sa PCR krivuljama, pri čemu svaki grafikon odgovara jednoj od pet PCR komora Idylla™ patrone, označenih od A do E. Ispod grafikona nalazi se popis vizualiziranih mutacija koji odgovaraju krivuljama, zajedno sa unutarnjim kontrolama (Slike 10 i 11).



Slika 10. Prikaz rezultata PCR analize na Idylla™ uređaju (izvor: arhiva rezultata na web stranici Idylla runs, <https://idyllaexplore.biocartis.com/>)



Slika 11. Prikaz rezultata PCR analize na Idylla™ uređaju (izvor: arhiva rezultata na web stranici Idylla runs, <https://idyllaexplore.biocartis.com/>)

Kao rezultat analize, Idylla™Explore prikazuje status mutacija odnosno jesu li detektirane ili ne, kao i vrstu detektirane mutacije koja može biti promjena u sekvenci aminokiselina ili promjena u nukleotidu (Slika 12).

TARGET RESULTS		TEST RESULTS	
TARGET	CHAMB.	CQ	ΔCQ
● EGFR Total	A	+	16.69
● EGFR Total	B	+	16.70
● EGFR Total	C	+	16.53
● EGFR Total	D	+	16.72
● EGFR Total	E	+	16.60
● L858R	D	+	23.01 6.29

TARGET RESULTS	TEST RESULTS
EGFR GENOTYPE:	
+	L858R: MUTATION DETECTED
	Protein change: p.Leu858Arg
	Nucleotide change: c.2573T>G,c.2573_2574delinsGT,c.2573_2574delinsGA
-	EXON 19 DELETION: NO MUTATION DETECTED
-	T790M: NO MUTATION DETECTED
-	G719A/C/S: NO MUTATION DETECTED

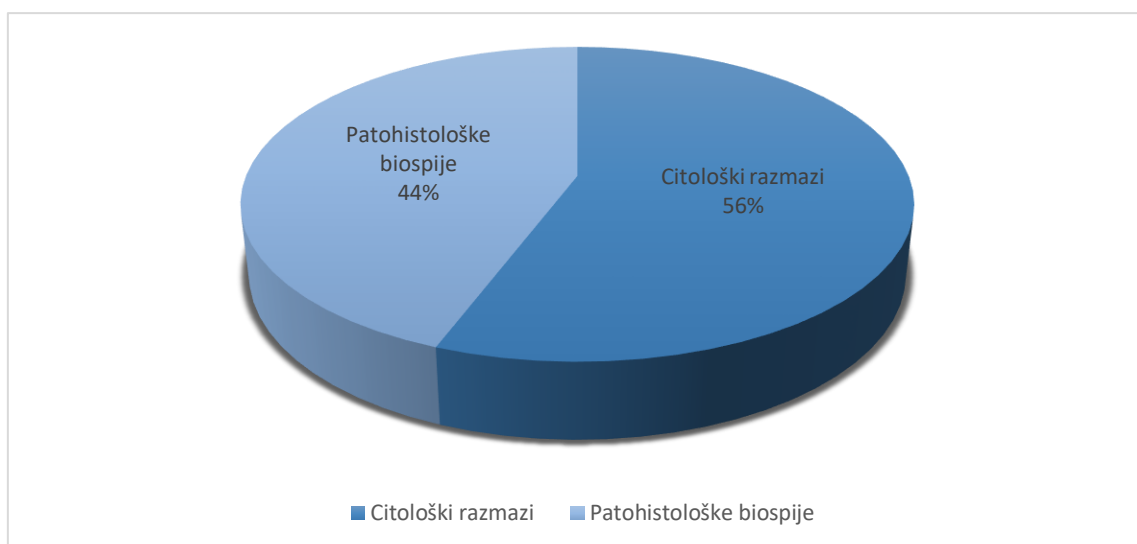
Slika 12. Prikaz detektirane mutacije L858R u uzorku na Idylla™ uređaju (izvor: arhiva rezultata na web stranici Idylla runs, <https://idyllaexplore.biocartis.com/>)

3.2.4. Statističke metode

Svi dobiveni rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike koristeći program Microsoft Excel (Microsoft Office Standard, 2021.). Korištene su sljedeće statističke metode u Excelu: brojanje (Count), postotci (Percentage), pivot tablice (Pivot Tables), križna tablica (Contingency Table), sumarijacija podataka Sum funkcijom (SUM), proporcije (Proportions). Ove metode omogućuju sveobuhvatnu analizu i razumijevanje podataka, pomažući u identifikaciji ključnih obrazaca i potencijalnih faktora rizika za adenokarcinom pluća kod muškaraca i žena.

4. REZULTATI

U razdoblju od 01. siječnja 2021. godine do 01. travnja 2023. godine u Kliničkoj bolnici Dubrava na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, obrađen je 251 pacijent sa dijagnozom karcinoma pluća. Navedeni pacijenti su upućeni na molekularno testiranje EGFR gena kako bi im se ovisno o rezultatima analize mogla propisati ciljana terapija i samim time, poboljšati ishod liječenja. Uzorci su bili citološki razmazi (bris bronha četkicom, pleuralni izljev, punktat limfnog čvora) te patohistološke biopsije (intraoperativni režnjevi pluća, bronhoskopije). Citoloških uzoraka bilo je 140 (56%), dok je patohistoloških bilo 111 (44%) (Graf 1).



Graf 1. Udio bioloških uzoraka testiranih na EGFR mutaciju

Od 251 ispitanika kod 209 (83,3%) pacijenata je dijagnosticiran adenokarcinom pluća kao primarna dijagnoza, dok je u 30 (12%) pacijenata postavljena dijagnoza sekundarnog odnosno metastatskog karcinoma. Kod 7 pacijenata (2,8%) je dijagnosticiran karcinom pločastih stanica, dok su neuroendokrini tumor, adenoskvamozni karcinom te pleomorfni karcinom zabilježeni kod 1 pacijenta. Kod dvije osobe (0,8%) nije navedena dijagnoza (Tablica 5).

Tablica 5 Broj pacijenata testiranih na EGFR mutaciju obzirom na vrstu dijagnosticiranog karcinoma

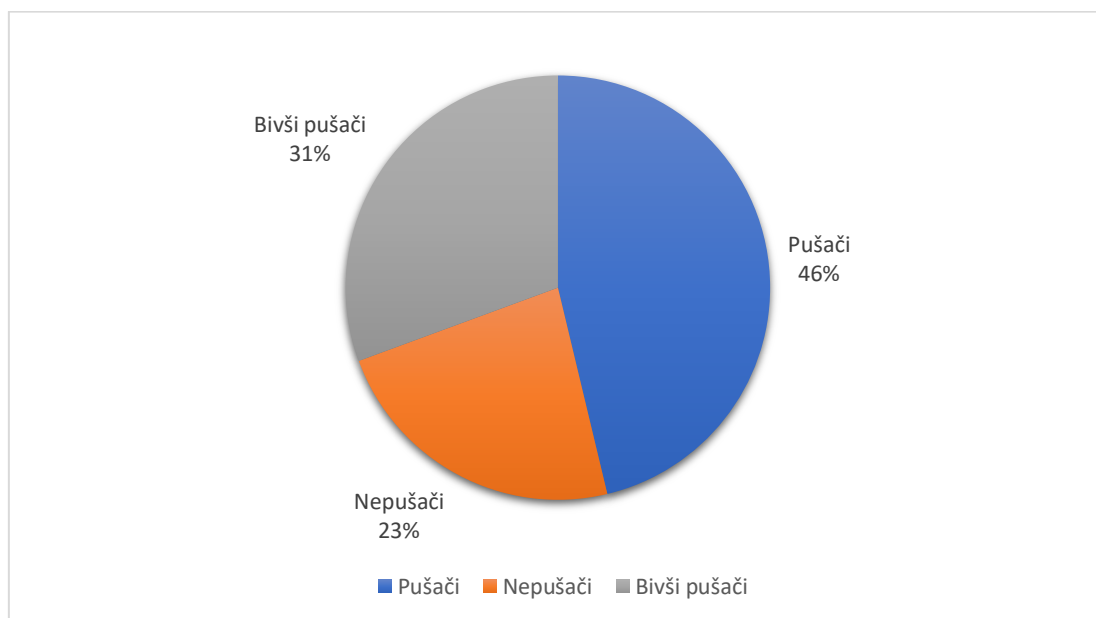
VRSTA DIJAGNOSTICIRANOG KARCINOMA	BROJ PACIJENATA (%) (N=251)
Adenokarcinom pluća	209 (83,3 %)
Metastatski tumor	30 (12%)
Karcinom pločastih stanica	7 (2,8%)
Neuroendokrini tumor	1 (0,4%)
Adenoskvamozni karcinom	1 (0,4%)
Pleomorfni karcinom	1 (0,4%)
Nema dijagnoze	2 (0,7%)

Obzirom na vrstu biološkog uzorka, među ukupnim brojem testiranih uzoraka prevladavali su citološki razmazi sa 56% (N=140). Raspodjela testiranih uzoraka obzirom na vrstu uzorka i spol prikazana je na tablici 6.

Tablica 6 Raspodjela testiranih bioloških uzoraka obzirom na spol

VRSTA UZORKA	MUŠKARCI BROJ (%)	ŽENE BROJ (%)	UKUPNO BROJ
Citološki razmazi	91 (65%)	49 (35%)	140
Patohistološke biopsije	57 (51,4%)	54 (48,6%)	111

Kod većine ukupno testiranih pacijenata (N=147; 58,6%) sa dijagnosticiranim karcinomom pluća, iz anamneze su također prikupljeni podatci vezani uz navike konzumiranja cigareta pri čemu je kod većine utvrđeno da su pušači (46%) ili bivši pušači (31%) (Graf 2).



Graf 2. Udio testiranih pacijenata obzirom na pušački status

Kod pušača i bivših pušača je broj žena značajno manji u odnosu na muškarce (Tablica 7).

Tablica 7 Udio testiranih muškaraca i žena obzirom na pušački status

Ispitivane varijable	Muškarci (%)	Žene (%)	Ukupan broj (%)
Pušač	42 (28,6%)	26 (17,7%)	68 (46,3%)
Bivši pušač	34 (23,1%)	11 (7,9%)	45 (31%)
Nepušač	16 (10,9%)	18 (12,3%)	34 (23,2%)

S rasponom godina testiranih pacijenata između 33 i 89 godina, ukupni medijan dobi iznosi 67 godina. Od ukupnog broja testiranih osoba u navedenom razdoblju, prevladavali su muškarci sa 59% (N=148). Demografska obilježja pacijenata prikazana su u tablici 8.

Tablica 8 Demografska obilježja pacijenata testiranih na EGFR mutaciju

Ispitivane varijable	Medijan	Mod	Min	Maks	Ukupan broj
Muškarci	67	68	33	89	148
Žene	67	68	36	87	103
Ukupno	67	68	33	89	251

Obzirom na ukupni broj testiranih osoba, većina pacijenata bila je u dobnoj skupini od 61-70 godina (49%). (Tablica 9).

Tablica 9 Podjela testiranih pacijenata na EGFR mutaciju obzirom na dob

DOB (godine)	UKUPNO (%)
33-49	11 (4,4%)
50-60	32 (12,7%)
61-70	123 (49%)
71-80	73 (29,1%)
81-89	12 (4,8%)

Od 148 muškaraca testiranih na EGFR mutaciju, najveći broj testiranih je u dobnoj skupini 61-70 godina (54,7%), dok je najmanji broj muškaraca pripadao dobnoj skupini od 81-89 godina (3,4%) (Tablica 10).

Tablica 10 Udio testiranih muškaraca na EGFR mutaciju obzirom na dob i status mutacije

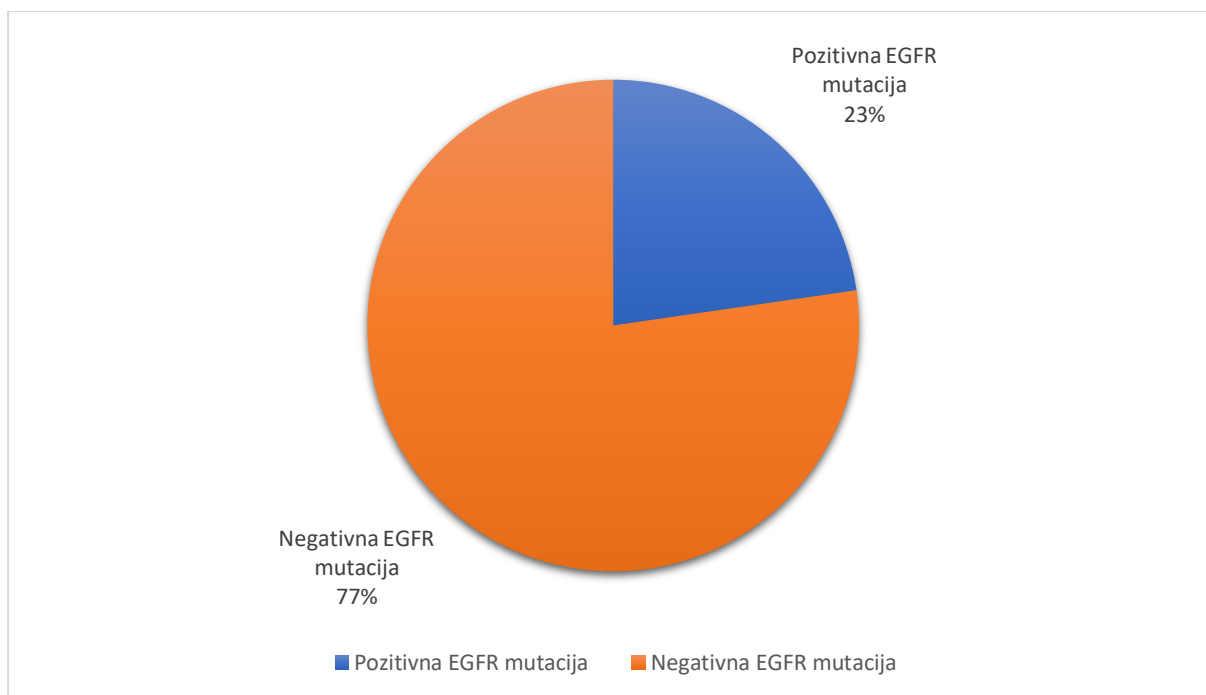
DOB (godine)	BROJ (%) ISPITANIKA (N=148)
33-49	7 (4,7%)
50-60	12 (8,1%)
61-70	81 (54,7%)
71-80	43 (29,1%)
81-89	5 (3,4%)

Od 103 žene testirane na EGFR mutaciju, najveći broj je bio u dobnoj skupini 61-70 godina (40,8%), dok je najmanji broj žena bio u dobnoj skupini od 33-49 godina (3,9%) (Tablica 11).

Tablica 11 Udio testiranih žena na EGFR mutaciju obzirom na dob

DOB (godine)	BROJ (%) ISPITANIKA (N=103)
33-49	4 (3,9%)
50-60	20 (19,4%)
61-70	42 (40,8%)
71-80	30 (29,1%)
81-89	7 (6,8%)

Od ukupnog broja testiranih uzoraka, kod 23% (N= 57) pacijenata je utvrđena pozitivna EGFR mutacija dok je preostalih 77% (N= 194) uzoraka dalo negativan rezultat (Graf 3).



Graf 3. Udio pozitivnih i negativnih EGFR mutacija u ukupnom broju testiranih uzoraka

Obzirom na broj ispitanika sa utvrđenom pozitivnom EGFR mutacijom, prevladavaju žene (52,6%, N= 30) u odnosu na muškarce (47,4%, N=27) (Tablica 12).

Tablica 12 Udio pozitivnih EGFR mutacija obzirom na spol

Ispitivane varijable	Pozitivne EGFR mutacije N (%)
Muškarci	27 (47,4%)
Žene	30 (52,6%)

Većina muškaraca sa utvrđenom pozitivnom EGFR mutacijom pripada dobnim skupinama od 61-70 godina te 71-80 godina (N=22, 81,5%) (Tablica 13).

Tablica 13 Udio pozitivnih testova na EGFR mutaciju po dobnim skupinama za muškarce

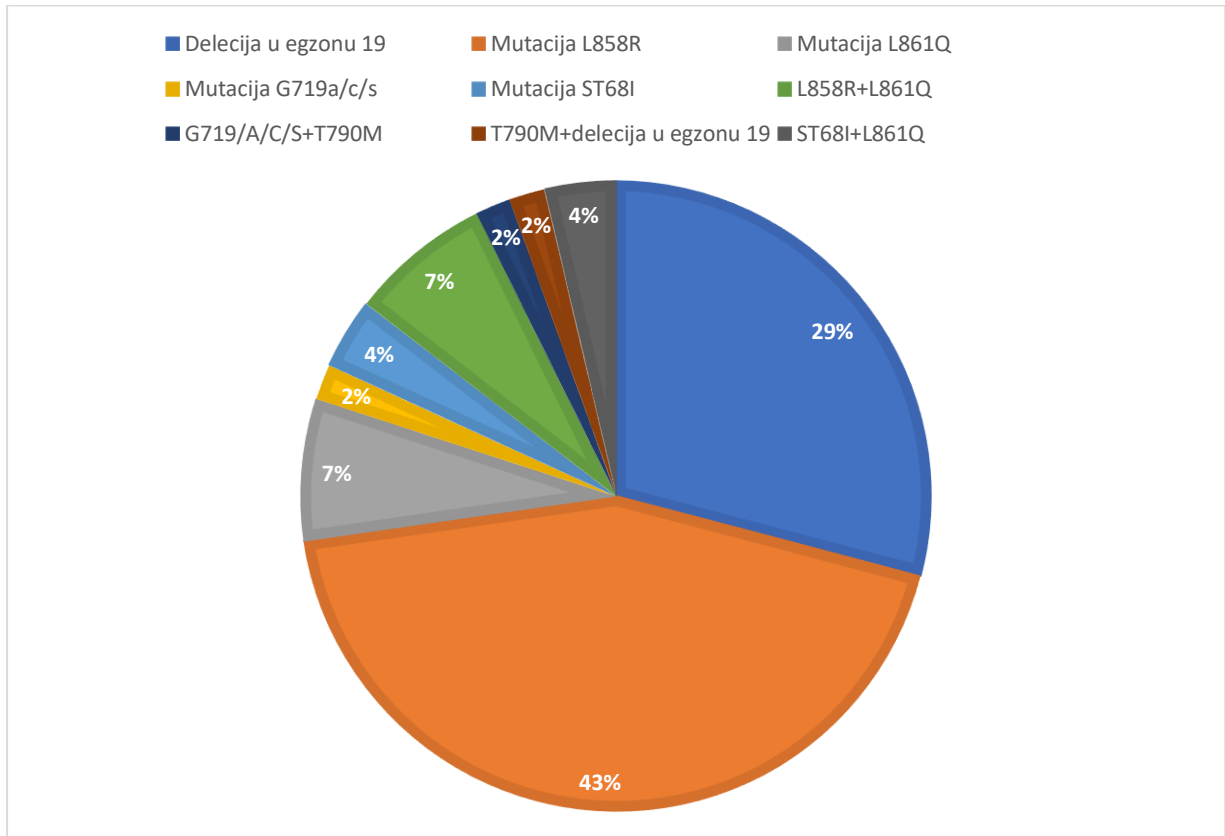
Dobna skupina	Pozitivna EGFR mutacija N (%)
33-49	1 (3,6%)
50-60	2 (7,4%)
61-70	10 (37%)
71-80	12 (44,5%)
81-89	2 (7,5%)

Također, i većina žena sa utvrđenom pozitivnom EGFR mutacijom pripada dobnim skupinama od 61-70 godina te 71-80 godina (N=23, 76,7%) (Tablica 14).

Tablica 14 Udio pozitivnih testova na EGFR mutaciju po dobnim skupinama za žene

Dobna skupina	Pozitivna EGFR mutacija N (%)
33-49	1 (3,4%)
50-60	4 (13,3%)
61-70	14 (46,7%)
71-80	9 (30%)
81-89	2 (6,6%)

U ukupnom broju uzoraka kod kojih je utvrđena pozitivna EGFR mutacija, najčešće zabilježene mutacije su L858R (43%), te delecija u egzonu 19 (29%) (Graf 4).



Graf 4. Udio tipova EGFR mutacija u ukupnom broju pozitivnih testova

Analizom podataka koji se odnose na muškarce testirane na EGFR mutaciju (N=148) utvrđeno je da je su mutacije L858R i delecija u egzonu 19 najčešći tipovi mutacije (N=16, 59,3%), pri čemu su obje najučestalije u dobnoj skupini od 71-80 godina (Tablica 15).

Ostale mutacije, poput G719A/C/S, ST68I i kombinacije L858R+L861Q, su rijetke te su zabilježene u znatno manjem broju slučajeva (Tablica 15).

Tablica 15 Tip EGFR mutacija obzirom na spol (muškarci) i dob

MUTACIJA	DIJAGNOZA	DOB GODINE/BROJ (%) ISPITANIKA	MUŠKARCI BROJ (N)
L858R	Adenokarcinom pluća	33-49: 1 (11,1%) 50-60: 1 (11,1%) 61-70: 1 (11,1%) 71-80: 5 (55,6%) 81-89: 1 (11,1%)	9
	Metastaza adenokarcinoma pluća	71-78: 1 (100%)	1
Delecija u egzonu 19	Adenokarcinom pluća	61-70: 2 (40%) 71-80: 3 (60%)	5
	Metastaza adenokarcinoma pluća	61-70: 1 (100%)	1
L861Q	Adenokarcinom pluća	71-80: 1 (50%) 80-89: 1 (50%)	2
	Metastaza adenokarcinoma pluća	50-60: 1 (100%)	1
G719A/C/S	Metastaza adenokarcinoma	61-70:1 (100%)	1
ST68I	Adenokarcinom pluća	71-80: 1 (100%)	1
	Planocelularni karcinom	61-70: 1 (100%)	1
L858R+L861Q	Adenokarcinom pluća	71-80: 1 (100%)	1
	Metastaza adenokarcinoma pluća	61-70: 2 (100%)	2
GT719/A/C/S	Adenokarcinom pluća	61-70: 1 (100%)	1
ST68I+L861Q	Adenokarcinom pluća	71-80: 1 (100%)	1

Na temelju prikupljenih podataka za osobe ženskog spola, a koje su testirane na EGFR mutaciju, vidljivo je da su najčešće zabilježene mutacije L858R i delecija u egzonu 19 (N=24, 80%) te da su obje najučestalije u dobnoj skupini od 61 do 70 godina (Tablica 16).

Ostale mutacije zabilježene su u znatno manjem broju ispitanika (Tablica 16).

Tablica 16 Tip EGFR mutacija obzirom na spol (žene) i dob

MUTACIJA	DIJAGNOZA	DOB GODINE/BROJ (%) ISPITANIKA	ŽENE Broj (N)
L858R	Adenokarcinom pluća	50-60: 2 (8,3%) 61-70: 6 (25%) 71-80: 6 (25%)	14
Delecija u egzonu 19	Adenokarcinom pluća	50-60: 2 (14,3%) 61-70: 5 (35,7%) 71-80: 1 (7,1%) 80-89: 2 (14,3%)	10
ST68I	Adenokarcinom pluća	33-49: 1 (50%) 71-80: 1 (50%)	2
L861Q	Adenokarcinom pluća	5-60: 1 (100%)	1
L858R+L861Q	Adenokarcinom pluća	71-80:1 (100%)	1
T790M+delecija u egzonu 19	Adenokarcinom pluća	61-70: 1 (100%)	1
ST68I+L861Q	Adenokarcinom pluća	61-70: 1 (100%)	1

Treba napomenuti da su metastatski tumori sa mutacijama L858R, delecijom u egzonu 19 i L861Q prisutni samo kod muškaraca, dok kod žena nema metastatskih tumora (Tablica 15).

5. RASPRAVA

Karcinom pluća je jedan od glavnih globalnih javnozdravstvenih problema, te je ujedno i najčešći tip karcinoma u svijetu koji bilježi najveću smrtnost (45). Općenito, učestalost raka pluća i stopa smrtnosti približno su dva puta veći kod muškaraca nego kod žena, iako omjer muškaraca i žena varira od regije do regije (46).

Prema podacima GLOBOCAN-a (Global Cancer Observatory) 2018. godine u Hrvatskoj je oboljelo 3021 osoba od karcinoma pluća (stopa incidencije 72,5/100 000), i to 899 žena (stopa incidencije 41,7/100 000) i 2122 muškaraca (stopa incidencije 105,7/100 000) (47). Podatci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo pokazuju da je 2020. godine u Hrvatskoj oboljelo 3084 osoba od karcinoma pluća (stopa incidencije 76,2/100 000), i to 1065 žena (stopa incidencije 51,2/100 000) i 2019 muškaraca (stopa incidencije 102,6/100 000) (48). Usporedbom navedenih podataka može se zaključiti da je kod žena primjetan porast incidencije i mortaliteta što je povezano s porastom prevalencije pušenja među ženama, dok kod muškaraca incidencija i mortalitet stagniraju ili su u blagom padu. U međunarodnoj studiji o preživljavanju raka CONCORD-3 objavljeni su podaci Hrvatskog registra za rak o petogodišnjem preživljavanju oboljelih od nekih vrsta raka za razdoblje između 2000. i 2014. godine. Od 30 europskih zemalja obuhvaćenih istraživanjem, Republika Hrvatska se nalazi među pet zemalja s najlošijim preživljavanjem za rak pluća (10 %) (37,46,49).

Aktivirajuće mutacije/delecije EGFR gena, koje uzrokuju kontinuiranu aktivaciju EGFR receptora, prisutne su kod približno 10 - 20% bijelaca s dijagnosticiranim karcinomom pluća nemalih stanica (50).

U ovom istraživanju analiza EFGR mutacija provedena je na ukupno 251 uzorku pacijenata kojima je postavljena dijagnoza karcinoma pluća, pri čemu je 140 (55,8%) bilo citoloških, a 111 (44,2%) patohistoloških. Ovo se može objasniti činjenicom da se većini bolesnika (više od 70%) dijagnoza postavi u uznapredovalom stadiju kada operacija više nije terapijska opcija. U toj fazi citološki uzorci su često manje invazivan izvor za dijagnozu i određivanje prediktivnih markera, te je potrebno manje uzorka a i sami proces analize je brži (51,52).

Skupina ispitanika sastojala se pretežito od muškaraca (N=148, 59%) te 103 žene (41%). Obzirom na ukupni broj testiranih osoba, većina pacijenata bila je u dobnoj skupini od 61-70 godina (49%) te od 71-80 godina (29,1%). Međutim, prisutnost pacijenata sa diagnosticiranim karcinomom pluća u dobi od 33 do 49 godina (4,9%) naglašava potrebu za boljim praćenjem i

ranijom dijagnostikom u mlađih osoba. Brojne druge publikacije otkrile su da pojavnost raka pluća pokazuje snažnu korelaciju s dobi te da se najviše stope incidencije nalaze u starijih osoba. Prema Portalu za istraživanje raka u Ujedinjenom Kraljevstvu između 2013. i 2015. više od 40% slučajeva raka pluća dijagnosticirano je u dobnoj skupini ≥ 75 godina (53). U SAD-u, učestalost doseže vrhunac u dobi od 80 do 84 godine kod muškaraca u usporedbi sa 75 do 79 godina kod žena (54).

Veći udio karcinoma pluća kod muškaraca u odnosu na žene zabilježen je i u drugim sličnim istraživanjima provedenih na uzorcima zaprimljenima u KBC Split i KBC Osijek (38,54). U istraživanju provedenom u KBC Split, karcinom pluća dijagnosticiran je u 73% muškaraca i 23% žena, dok je u KBC Osijek dijagnosticiran kod 58% muškaraca i 42% žena. Prethodne studije pokazale su spolne razlike u učestalosti raka pluća te je incidencija raka pluća općenito veća u muškaraca nego u žena (55,56). No posljednje studije ukazuju na to da se od 2006. godine i incidencija i mortalitet brže smanjuju kod muškaraca nego kod žena (57,58).

U ovom istraživanju najčešće dijagnosticiran histološki podtip karcinoma pluća je bio adenokarcinom pluća, dijagnosticiran kod ukupno 209 (83,3%) pacijenata, dok je u 30 (12%) pacijenata postavljena dijagnoza sekundarnog odnosno metastatskog karcinoma. To je u skladu sa podatcima prema kojima je adenokarcinom najčešći tip karcinoma pluća i kod muškaraca i kod žena (57). Opsežna studija provedena u SAD-u pokazala je da je u razdoblju od 2001. do 2015. njegova je učestalost značajno porasla kod oba spola, s nešto bržom stopom kod žena (58).

Istraživanja su pokazala da oko 14% tumora pluća u Europi nosi EGFR mutacije, u usporedbi s 10% u SAD-u ili 35% u istočnih Azijata. Prisutnost EGFR mutacija ključni je prediktor učinkovitosti inhibitora EGFR-tirozin kinaze (TKI) (43,59).

Od ukupnog broja testiranih pacijenata (251), kod 57 (23%) pacijenata utvrđena je prisutnost EGFR mutacije. Najčešći tipovi su bile tzv. klasične mutacije L858R u egzonu 21 (42%) i delecija u egzonu 19 (28%). Prevalencija ovih mutacija je u skladu s literaturom, koja ukazuje na to da su mutacije L858R i delecija u egzonu 19 najčešće kod adenokarcinoma pluća te čine oko 85% svih EGFR mutacija (14,40). U znatno manjem postotku su zabilježene su tzv. rijetke mutacije poput L861Q (7%), G719A/C/S (2%) te ostale navedene u grafu 4. Učestalost mutacija L858R i delecije u egzonu 19 može se između ostalih usporediti i sa studijom iz Bosne i Hercegovine gdje su rezultati, kao i rezultati ovog rada, u skladu sa očekivanom prevalencijom EGFR mutacija, s obzirom na zemljopisni položaj i etničku pripadnost

proučavane skupine, tj. osoba bijele rase iz Južne Europe (41). U Hrvatskoj je 2016. godine napravljena studija na citološkim uzorcima gdje je broj pozitivnih mutacija na 177 pacijenata iznosio 19,8%, također uz najčešće detektirane mutacije delecije u egzonu 19 (10,2%) i točkaste mutacije L858R u egzonu 21 (9,6%) (42).

U uzorcima analiziranim za potrebe našeg istraživanja, mutacije L858R i delecija u egzonu 19 kod žena su bile prisutne u 80% slučajeva a najčešće su utvrđene u dobi od 61 do 70 godina. Kod muškaraca su te mutacije zabilježene u 51,9 % slučajeva i to najčešće u dobi od 71 do 80 godina. I kod muškaraca i kod žena sa detektiranom pozitivnom EGFR mutacijom najčešća uputna dijagnoza bio je adenokarcinom pluća, pri čemu je zanimljivo za primijetiti da je kod svih pozitivnih žena to bila postavljena dijagnoza, odnosno nije bilo metastatskih tumora.

Daleko najvažniji rizični faktor za razvoj karcinoma pluća je uporaba duhana. Sukladno literaturi, 85% smrti od tog karcinoma diljem svijeta može se pripisati pušenju što upućuje na zaključak da se većina karcinoma pluća može prevenirati (57). No treba naglasiti, da u 21. stoljeću učestalost adenokarcinoma pluća među nepušačima raste, a za takve bolesnike je otprilike 2,5 puta veća vjerojatnost da će biti žena nego muškarac (60).

Razlike u pušačkim navikama vezanim uz spol utjecale su na promjenjivu demografiju raka pluća (61). Povijesno gledano, muškarci imaju veću prevalenciju pušenja od žena u bilo kojem trenutku, konzumiraju više cigareta dnevno te imaju veće stope korištenja duhanskih proizvoda (58).

Pušenje cigareta je kod žena doseglo vrhunac 2 desetljeća kasnije nego kod muškaraca, stoga je epidemija raka pluća počela kasnije kod žena, čemu je doprinijela i činjenica da su žene sporije prestajale pušiti u odnosu na muškarce. U posljednjem desetljeću, navike konzumiranja cigareta postaju sve sličnije među spolovima (46). Prema istraživanju iz 2016. u Sjedinjenim Državama 15,5% svih odraslih osoba (37,8 milijuna) su pušači (među njima 17,5% muškaraca te 13,5% žena), dok su 84,5% bivši pušači ili nepušači (62). Općenito govoreći, smanjena prevalencija pušenja u prošlim desetljećima pripisuje se smanjenoj učestalosti raka pluća i drugih karcinoma povezanim s cigaretama.

Brojne epidemiološke studije pokazuju da je rak pluća kod žena puno manje ovisan o duhanu nego kod muškaraca (63,64). Sve veća pojavnost raka pluća kod žena nepušača i mladih žena zahtijeva dodatne studije u svrhu boljeg razumijevanja spolno utemeljenih pokretača ove bolesti. Pretpostavlja se da su kod žena nepušača rizični faktori za razvoj karcinoma pluća različiti okolišni čimbenici, genetički faktori te hormonalni status (57,58).

Za potrebe ovog istraživanja za 58,6% testiranih pacijenata prikupljeni su podaci iz anamneze o pušačkom statusu pri čemu je kod većine utvrđeno da su pušači (46%) ili bivši pušači (31%) što ukazuje da je pušenje značajan faktor rizika za razvoj i obolijevanje od karcinoma pluća.

Nedostatak ovog rada je nedovoljno informacija o pušačkom statusu oboljelih. U budućem istraživanju trebalo bi svakako za sve testirane pacijente voditi evidenciju o pušačkom statusu i količini cigareta (eng. *packs per year*) koji se računa na način da se pomnoži broj cigareta koje je osoba konzumirala u danu sa brojem godina konzumacije. Također, usporedba većeg broja različitih uzoraka doprinijela bi novim spoznajama koje bi omogućile bržu dijagnostiku primjenu adekvatne terapije. U vrijeme prikupljanja podataka za ovaj rad, u Kliničkoj bolnici Dubrava nije postojao Odjel za onkologiju i radioterapiju koji je započeo s radom u prosincu 2022. godine. Uz sve navedene podatke, trebalo bi prikupiti i podatke o načinima liječenja i njihovim učincima, o petogodišnjem preživljenju što bi dovelo do još kvalitetnije analize i utvrđivanja najdjelotvornije terapije.

6. ZAKLJUČAK

- Od 251 ispitanika kod 209 (83,3%) pacijenata je dijagnosticiran adenokarcinom pluća kao primarna dijagnoza, što ukazuje na činjenicu da je to najčešći tip karcinoma pluća kod testiranih pacijenata
- Analizom podataka utvrđeno je da je molekularnom analizom EGFR gena testirano više muškaraca nego žena, 148 (59%) muškaraca te 103 žene (41%)
- Molekularno testiranje EGFR gena izvršeno je na više citoloških uzoraka (N=140, 55,8%) u odnosu na patohistološke uzorke (N=111, 44,2%), što ukazuje na prikladnost ove vrste uzorka prilikom dijagnostike karcinoma pluća. Citološki uzorci dobivaju se minimalno invazivnim postupcima i mogu dati dovoljno materijala za dijagnostiku i terapijski tretman bolesnika s karcinomom pluća kao i omogućiti brže rezultate analize.
- Pozitivne EGFR mutacije zabilježene su kod ukupno 57 (23%) testiranih pacijenata, a najčešći tipovi mutacija su bile L858R u egzonu 21 (N=24; 43% pacijenata) i delecija u egzonu 19 (N=16; 29% pacijenata)
- Obzirom na broj ispitanika sa utvrđenom pozitivnom EGFR mutacijom, prevladavaju žene (52,6%, N= 30) u odnosu na muškarce (47,4%, N=27)
- Kod svih testiranih žena dijagnosticiran je adenokarcinom pluća, a najčešće su zabilježene mutacije L858R i delecija u egzonu 19, i to u dobi od 61 do 70 godina. Od ukupnog broja testiranih žena, njih 23 (76,7%) je bilo u dobnim skupinama 61-70 godina te 71 i 80 godina. S obzirom na rezultate, vidljivo je da je starija životna dob povezana sa većim rizikom od razvoja karcinoma pluća
- Kod testiranih muškaraca prevladava dijagnoza adenokarcinoma pluća a najčešće su zabilježene mutacije L858R i delecija u egzonu 19, i to u dobi od 71 do 80 godina. Od ukupnog broja testiranih muškaraca, njih 22 (85%) bilo je u dobnim skupinama od 61-70 godina te 71-80 godina. Kao i kod žena, rezultati prikazuju utjecaj starije životne dobi na veći rizik razvitka karcinoma pluća
- Kod većine testiranih pacijenata (N=147, 58,6%) iz anamneze su prikupljeni podatci o navikama konzumiranja cigareta te je vidljivo da 46% ispitanika pripada kategoriji

pušača, dok 31% pripada kategoriji bivših pušača što ukazuje da je pušenje značajan faktor rizika za razvoj i obolijevanje od karcinoma pluća

- Nedostatak podataka o pušačkom statusu kod značajnog broja pacijenata naglašava potrebu za boljom dokumentacijom i praćenjem životnih navika koje mogu utjecati na razvoj karcinoma pluća
- Rezultati ove retrospektivne studije upućuju na važnost molekularnog testiranja EGFR gena u pacijenata sa dijagnosticiranim karcinomom pluća, kako bi što prije dobili ciljanu terapiju, te samim time poboljšali ishod liječenja.

7. LITERATURA

1. <https://hrcak.srce.hr/file/120529> (pristupljeno: 04.05.2024.)
2. <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=15910> (pristupljeno: 04.05.2024.)
3. <https://www.onkologija.hr/rak-pluca/> (pristupljeno: 04.05.2024.)
4. Damjanov I, Jukić S. Specijalna patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
5. Cox TM, Sinclair J. Molekularna biologija u medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
6. Jukić J. Patologija za studente viših medicinskih škola. 4. dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 1999. str. 127-129.
7. WHO Classification of Tumours Editoria Bord. Thoracic tumours.: International Agency for Research on Cancer. Lyon; 2021.
8. European Society for Medical Oncology; <https://www.esmo.org/content/download/124824/2364857/1/HR-Rak-Pluca-Nemalih-Stanica-Vodic-za-Bolesnike.pdf> (pristupljeno 06.05.2024.)
9. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, Zagreb, 2021.
10. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2019 Oct;28(10):1563-1579. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221. PMID: 31575553; PMCID: PMC6777859
11. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. Front Oncol. 2017 Aug 28;7:193. doi: 10.3389/fonc.2017.00193. PMID: 28894699; PMCID: PMC5581350
12. Hasleton P, Flieder DB, editors. Spencer's Pathology of the Lung, 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000
13. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. Semin Cancer Biol. 2020 Apr;61:167-179. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.015. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31562956; PMCID: PMC7083237.

14. Drljača J, Janjić N, Vučinić N et al. Farmakogenetski značaj mutacija gena za receptor epidermalnog faktora rasta u ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća. MD [Internet]. 2019;11(1):35–41.
15. Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*. 2010 Nov;1(7):497-514. doi: 10.18632/oncotarget.186. PMID: 21165163; PMCID: PMC3001953.
16. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:965-1014. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.965. PMID: 10872470.
17. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 SUPPL.):21–6.
18. <https://www.onkologija.hr/rak-pluca/rak-pluca-dijagnoza/> (pristupljeno 11.05.2024.)
19. <https://govorimoorakupluca.com/dijagnoza/> (pristupljeno 11.05.2024.)
20. <https://radiochirurgiazagreb.com/hr/ebus> (pristupljeno 11.05.2024.)
21. Bogdanić JE. Nova klasifikacija plućnih neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2022 Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:748748>
22. Ricaurte LM, Arrieta O, Zatarain-Barrón ZL, Cardona AF. Comprehensive review of fetal adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer Auckl NZ*. 2018;9:57–63.)
23. Pernar J. DIJAGNOSTIKA PLUĆNIH TUMORA [Završni rad]. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija; 2021 Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:37363>
24. Bulić V. Usporedba citoloških i histoloških nalaza karcinoma pluća dijagnosticiranih bronhoskopskom biopsijom u KBC Split u 2016. godini [Završni rad]. Split: Sveučilište u Splitu; 2018 Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:460534>
25. <https://govorimoorakupluca.com/lijecenje-raka-pluca/imunoterapija/>(pristupljeno 11.05.2024.)
26. Li Y, Mao T, Wang J, Zheng H, Hu Z, Cao P, Yang S, Zhu L, Guo S, Zhao X, Tian Y, Shen H, Lin F. Toward the next generation EGFR inhibitors: an overview of osimertinib resistance mediated by EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Cell Commun Signal*. 2023 Apr 11;21(1):71. doi: 10.1186/s12964-023-01082-8. PMID: 37041601; PMCID: PMC10088170.

27. Vrbanec D, Belev B. Targeted Drugs in Gastrointestinal Oncology. *Medicus* [Internet]. 2012 [pristupljeno 16.05.2024.];21(2_Gastroenterologija). Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/102974>
28. Johnson M, Garassino MC, Mok T, Mitsudomi T. Treatment strategies and outcomes for patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitors: Focus on novel therapies. *Lung Cancer*. 2022 Aug;170:41-51. doi: 10.1016/j.lungcan.2022.05.011. Epub 2022 May 21. PMID: 35714425.
29. Shah R, Lester JF. Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Clash of the Generations. *Clin Lung Cancer*. 2020 May;21(3):e216-e228. doi: 10.1016/j.clcc.2019.12.003. Epub 2019 Dec 20. PMID: 32014348.
30. Abourehab MAS, Alqahtani AM, Youssif BGM, Gouda AM. Globally Approved EGFR Inhibitors: Insights into Their Syntheses, Target Kinases, Biological Activities, Receptor Interactions, and Metabolism. *Molecules*. 2021 Nov 4;26(21):6677. doi: 10.3390/molecules26216677. PMID: 34771085; PMCID: PMC8587155.
31. https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2023/20230726160055/aux_160055_hr.pdf (pristupljeno 26.05.2024.)
32. Sun R, Hou Z, Zhang Y, Jiang B. Drug resistance mechanisms and progress in the treatment of EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2022 Sep 26;24(5):408. doi: 10.3892/ol.2022.13528. PMID: 36245822; PMCID: PMC9555020.
33. Uchibori K, Inase N, Araki M, Kamada M, Sato S, Okuno Y, Fujita N, Katayama R. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nat Commun*. 2017 Mar 13;8:14768. doi: 10.1038/ncomms14768. PMID: 28287083; PMCID: PMC5355811.
34. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(10):958-967. doi:10.1056/NEJMoa0904554
35. Shaban N, Kamashev D, Emelianova A, Buzdin A. Targeted Inhibitors of EGFR: Structure, Biology, Biomarkers, and Clinical Applications. *Cells*. 2024; 13(1):47. <https://doi.org/10.3390/cells1301004>
36. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM, Nanni-Metéllus I, Lacave R, Lacroix L, Escande F, Lizard S, Pretet JL, Rouquette I, de Crémoux P, Solassol J, de Fraipont F, Bièche I, Cayre A, Favre-Guillevin E, Tomasini P, Wislez M, Besse B, Legrain M, Voegeli AC, Baudrin L, Morin F, Zalcman G, Quoix E, Blons H, Cadranel J. Rare EGFR exon 18

- and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):126-31. doi: 10.1093/annonc/mdt418. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24285021; PMCID: PMC3868323.
37. Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020.-2024. Ministarstvo zdravstva. Zagreb, siječanj 2020. (pristupljeno: 05.06.2024.)
 38. Bulić V. Usporedba citoloških i histoloških nalaza karcinoma pluća dijagnosticiranih bronhoskopskom biopsijom u KBC Split u 2016. godini (Završni rad). Split: Sveučilište u Splitu; 2018.
 39. World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer (2012). Lyon; 2018. <https://gco.iarc.who.int/> (pristupljeno: 04.06.2024.)
 40. Parvar SY, Rezvani A, Ghaderpanah R, Hefzosseheh M, Rafiei S, Monabati A. The relation between epidermal growth factor receptor mutations profiles and smoking patterns in patients with lung adenocarcinoma: A cross-sectional study. *Health Sci Rep*. 2023 Jul 5;6(7):e1369. doi: 10.1002/hsr2.1369. PMID: 37425232; PMCID: PMC10323165.
 41. Udovičić-Gagula D, Džananović N, Dorić M. Prevalence of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and correlation with histological patterns in lung adenocarcinoma in patients from Bosnia and Herzegovina. *Med Glas (Zenica)*. 2024 Feb 1;21(1). doi: 10.17392/1627-23. Epub ahead of print. PMID: 37950662.
 42. Mohar B, Smojver Ježek S, Rajković Molek K, Štemberger C, Kurpis M, Kupanovac Ž, Samaržija M, Jonjić N, Grahovac B. Detection of an EGFR mutation in cytological specimens of lung adenocarcinoma. *Cytopathology*. 2016 Dec;27(6):444-451. doi: 10.1111/cyt.12325. Epub 2016 Mar 18. PMID: 26990359.
 43. Zhang P, Nie X, Bie Z, Li L. Impact of heavy smoking on the benefits from first-line EGFR-TKI therapy in patients with advanced lung adenocarcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Mar;97(9):e0006. doi: 10.1097/MD.00000000000010006. PMID: 29489642; PMCID: PMC5851738.
 44. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134. PMID: 21296855.
 45. Isla D, Majem M, Viñolas N. *et al.* A consensus statement on the gender perspective in lung cancer. *Clin Transl Oncol* **19**, 527–535 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1578-x>

46. Florez N, Kiel L, Riano I, Patel S, DeCarli K, Dhawan N, Franco I, Odai-Afotey A, Meza K, Swami N, Patel J, Sequist LV. Lung Cancer in Women: The Past, Present, and Future. *Clin Lung Cancer*. 2024 Jan;25(1):1-8. doi: 10.1016/j.clcc.2023.10.007. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37940410.
47. Ministarstvo zdravstva, Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020.-2024.; Zagreb, siječanj 2020. <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2019%20Programi%20i%20projekti/NACIONALNI%20PROGRAM%20PREVENCIJE%20RAKA%20PLU%20C4%86A.pdf> (pristupljeno: 08.07.2024.)
48. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske; Incidencija raka u Hrvatskoj. Zagreb, 2022. <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-Incidencija-raka-u-Hrvatskoj-2020.-godine.pdf> (pristupljeno: 08.07.2024.)
49. Nacionalni strateški okvir protiv raka do 2030. Hrvatski sabor. Zagreb, 2020. <https://www.zakon.hr/cms.htm?id=46645> (pristupljeno: 08.07.2024.)
50. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020 Apr;61:167-179. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.015. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31562956; PMCID: PMC7083237.
51. Frankel D, Nanni I, Ouafik L, Greillier L, Dutau H, Astoul P, Daniel L, Kaspi E, Roll P. Cytological Samples: An Asset for the Diagnosis and Therapeutic Management of Patients with Lung Cancer. *Cells*. 2023 Feb 27;12(5):754. doi: 10.3390/cells12050754. PMID: 36899890; PMCID: PMC10001120.
52. Dzambas J. et al. Correlation between cytological and histopathological diagnosis of non-small cell lung cancer and accuracy of cytology in the diagnosis of lung cancer // *Vojnosanitetski Pregled*. 2020. Vol. 79. No. 4. pp. 345-351.
53. Tamási L, Horváth K, Kiss Z, Bogos K, Ostoros G, Müller V, Urbán L, Bittner N, Sárosi V, Vastag A, Polányi Z, Nagy-Erdei Z, Daniel A, Nagy B, Rokszin G, Abonyi-Tóth Z, Moldvay J, Vokó Z, Gálffy G. Age and Gender Specific Lung Cancer Incidence and Mortality in Hungary: Trends from 2011 Through 2016. *Pathol Oncol Res*. 2021 Apr 30;27:598862. doi: 10.3389/pore.2021.598862. PMID: 34257553; PMCID: PMC8262188.
54. Cancer Facts & Figures 2023. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; 2022. Accessed January 9, 2024. Available online: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer->

64. Lam S, leRiche JC, Zheng Y, et al. Sex-related differences in bronchial epithelial changes associated with tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:691-6. 10.1093/jnci/91.8.691

8. SAŽETAK

Učestalost i tip mutacije u EGFR genu u patohistološkim i citološkim uzorcima karcinoma pluća

Cilj: Utvrditi tip i učestalost pojedinih mutacija EGFR gena u slučajevima karcinoma pluća u razdoblju od 01. siječnja 2021. do 01. travnja 2023. godine u Kliničkoj bolnici Dubrava na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju.

Metode: Rezultati i podatci iz anamneze retrospektivno su prikupljeni iz laboratorijskog informacijskog sustava Issa na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju. Prikupljeni su podatci o dobi, spolu te rezultatima testiranja na EGFR mutaciju. Sekvenciranje epidermalnog receptora faktora rasta (EGFR) u Kliničkoj bolnici Dubrava izvodi se korištenjem Idylla™ EGFR mutacijskog testa na Biocartis Idylla™ RT-PCR sustavu iz uzoraka parafinskih blokova ili citoloških razmaza.

Rezultati: U promatranom razdoblju kod 251 pacijenta sa dijagnozom karcinoma pluća određeno je molekularno testiranje EGFR gena. Kod većine ispitanika (83,3%) uputna dijagnoza bio je adenokarcinom pluća. Testiranje je izvršeno na 140 citoloških (55,8%) te 111 patohistoloških uzoraka (44,2%). Mutacija je pronađena kod 57 (23%) uzoraka, i to češće kod žena (52,6%) u odnosu na muškarce (47,4%). Najčešće detektirane mutacije su točkasta mutacija L858R i delecija u egzonu 19. Kod testiranih žena, najviše je bilo slučajeva adenokarcinoma pluća s mutacijama L858R i delecijom u egzonu 19 u dobi od 61 do 70 godina. Kod testiranih muškaraca, također su najčešće mutacije bile L858R i delecija u egzonu 19, i to u dobi od 71 do 80 godina. Za 58,6% testiranih pacijenata prikupljeni su podatci o navikama konzumiranja cigareta te je vidljivo da većina pripada kategorijama pušača i bivših pušača (77%) što ukazuje na to da je pušenje značajan faktor rizika za razvoj i obolijevanje od karcinoma pluća.

Zaključci: Rezultati ove retrospektivne studije upućuju na važnost molekularnog testiranja EGFR gena u pacijenata sa dijagnosticiranim karcinomom pluća, kako bi što prije dobili ciljanu terapiju, te samim time poboljšali ishod liječenja. Nedostatak podataka o pušačkom statusu kod značajnog broja pacijenata naglašava potrebu za boljom dokumentacijom i praćenjem životnih navika koje mogu utjecati na razvoj karcinoma pluća.

Ključne riječi: NSCLC, karcinom pluća, EGFR, ciljana terapija

9. ABSTRACT

Frequency and type of mutation in the EGFR gene in pathohistological and cytological samples of lung carcinoma

Aim: To determine the type and frequency of individual EGFR gene mutations in cases of lung cancer in the period from January 1, 2021 to April 1, 2023 at the Dubrava Clinical Hospital at the Clinical Institute of Pathology and Cytology.

Methods: Results and data from the anamnesis were collected retrospectively from the laboratory information system Issa at the Clinical Institute of Pathology and Cytology. Data on age, gender and the results of EGFR mutation testing were collected. Epidermal growth factor receptor (EGFR) sequencing at Dubrava Clinical Hospital is performed using the Idylla™ RT-PCR system from paraffin blocks or cytological smears.

Results: In the observed period, 251 patients diagnosed with lung cancer underwent molecular testing of the EGFR gene. In the majority of subjects (83,3%), the referring diagnosis was lung adenocarcinoma. Testing was performed on 140 cytological (55,8%) and 111 pathohistological samples (44,2%). Mutation was found in 57 (23%) samples, and this is more common in women (52,6%) compared to men (47,4%). The most frequently detected mutations are point mutation L858R and deletion in exon 19. In the tested women, there were more cases of lung adenocarcinoma with L858R and deletion in exon 19 between the ages of 61 and 70. In the tested men, the most frequent mutations were also L858R and deletion in exon 19, and this at the age of 71 to 80 years. Data on cigarette consumption habits were collected for 58,6% of tested patients, and it is evident that the majority belong to the categories of smokers and ex-smokers (77%), which indicates that smoking is a significant risk factor for developing and contracting lung cancer.

Conclusions: The results of this retrospective study point the importance of molecular testing of the EGFR gene in patients diagnosed with lung cancer, in order to receive targeted therapy as soon as possible, thereby improving of the outcome of treatment. The lack of data of the smoking status of a significant number of patients highlights the need for better documentation and monitoring of lifestyle habits that may affect the development of lung cancer.

Key words: NSCLC, lung carcinoma, EGFR, targeted therapy

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI

Ime i prezime: Matea Kos

Datum i mjesto rođenja: 19.06.1991., Zagreb

Mobitel: 095/848-1871

E-mail: matea.kos25@gmail.com

OBRAZOVANJE

1998.-2006. Osnovna škola Vjenceslava Novaka, Zagreb

2006.-2010. Veterinarska škola, Zagreb

2010.-2016. Preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu, Zagreb

2017.-2018. Odrađen pripravnički staž u Domu zdravlja, Sesvete

2018.- Položen stručni ispit za prvostupnika medicinsko laboratorijske dijagnostike pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske u Zagrebu

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

OSTALO

2019. – zaposlena u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju u Kliničkoj bolnici Dubrava, Zagreb

2023.- delegat Skupštine Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovnog razreda za medicinsko laboratorijsku djelatnost

Aktivno sudjelovanje na više domaćih znanstvenih skupova s međunarodnim sudjelovanjem.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Matea Kos, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom
„Učestalost i tip mutacije u EGFR genu u patohistološkim i citološkim uzorcima
karcinoma pluća“

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

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

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

Split, 05.07.2024.

Potpis studenta/studentice: _____

