Značaj izražaja ERCC1 u bronhoskopskoj biopsiji adenokarcinoma pluća u svakodnevnoj kliničkoj praksi

Piljić Burazer, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:271703

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Marina Piljić Burazer

ZNAČAJ IZRAŽAJA ERCC1 U BRONHOSKOPSKOJ BIOPSIJI ADENOKARCINOMA PLUĆA U SVAKODNEVNOJ KLINIČKOJ PRAKSI

Doktorska disertacija

Split, 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Marina Piljić Burazer

ZNAČAJ IZRAŽAJA ERCC1 U BRONHOSKOPSKOJ BIOPSIJI ADENOKARCINOMA PLUĆA U SVAKODNEVNOJ KLINIČKOJ PRAKSI

Doktorska disertacija

Split, 2020.

Doktorski rad je izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

Voditelj rada: prof. prim. dr. sc. Merica Glavina Durdov

Zahvaljujem od srca prof. prim. dr. sc. Merici Glavini Durdov što je prihvatila biti moj mentor i što me poticala svojim entuzijazmom, energijom i neizmjernom strpljivošću na konačnu realizaciju doktorske disertacije. Još je vrijednije što se iz naše suradnje razvilo jedno novo prijateljstvo.

Mojim roditeljima i bratu hvala na bezuvjetnoj ljubavi kojom oplemenjuju moj život.

Mome suprugu Željku hvala na svesrdnoj podršci u svemu što radim, a mojoj kćerki Ani hvala što je svemu što radim dala potpuni smisao.

SADRŽAJ

SADRŽAJ ……..01
POPIS OZNAKA I KRATICA ……04
1. UVOD ……..06
1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma pluća ……07
1.1.1. Epidemiologija ……...07
1.1.2. Etiologija ……08
1.2. Klinička slika karcinoma pluća i dijagnostički postupci ……...08
1.1.1. Klinička slika ……..08
1.1.2. Dijagnostički postupci ……09
1.3. Patohistološka klasifikacija karcinoma pluća ……...10
1.4. Adenokarcinom pluća ……...10
1.1.1. Definicija i morfologija ……..10
1.1.2. Imunohistokemijska obilježja ……12
1.1.3. Molekularna obilježja ……15
1.5. TNM klasifikacija karcinoma pluća i stadiji proširenosti bolesti ……18
1.6. Liječenje adenokarcinoma pluća ……...22
1.6.1. Liječenje bolesnika s lokaliziranom/lokalno uznapredovalom bolešću .24
1.6.2. Sistemska terapija u bolesnika s proširenom bolešću ……24
1.7. ERCC1 ……..25
1.7.1. Definicija i značaj u prognozi i predikciji karcinoma pluća ……..25
1.7.2. Problematika interpretacije ERCC1 ……...26
2. HIPOTEZE I CILJEVI …...……..28
3. ISPITANICI I METODE ……..30
3.1. Ispitanici ……31
3.2. Metode ……...31
3.3. Statistička raščlamba ……33
3.4. Etička načela ……33
4. REZULTATI ……..34
5. RASPRAVA ……55
6. ZAKLJUČCI ……..62
7. SAŽETAK ……...64
8. SUMMARY ……67
9. LITERATURA ……...70
10. ŽIVOTOPIS ……82

POPIS OZNAKA I KRATICA

AAH atipična adenomatozna hiperplazija

ACTH adrenokortikotropni hormon (engl. adrenocorticotropic hormone)

AIS adenokarcinom in situ

AJCC Američko društvo za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer*)

AK adenokarcinom

ALK kinaza anaplastičnog limfoma (engl. *anaplastic lymphoma kinase*)

AMP Udruženje molekularnih patologa (engl. *Association for Molecular Pathology*)

ATS Američko torakalno udruženje (engl. *American Thoracic Society*)

BRAF engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CAP eng. *College of American Pathologists*

CT kompjuterizirana tomografija (*engl. computed tomography*)

DKS diferencijalna krvna slika

DNA deoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid*)

ECOG eng. *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFR receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EKG elektrokardiogram

EML4 engl. *echinoderm microtubule-associated protein-like 4*

ERCC1 engl. *excision repair cross-complementation group 1*

ERS Europsko respiracijsko udruženje (engl. *European Respiratory Society*)

ESMO Udruženje europskih onkologa (engl. *European Society for Medical Oncology*)

ERBB2 engl. *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*

HRP engl. *horse redish peroxydase*

IASCL Međunarodno udruženje za istraživanje karcinoma pluća (engl. *International Association for the Study of Lung Cancer*)

KKS kompletna krvna slika

KRAS engl. *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*

KTP kemoterapija temeljana na platini

MAPK engl. *mitogen activated protein kinase*

MIC engl. *minimal invasive carcinoma*

MET engl. *mesenchymal epithelial transition factor*

MR magnetska rezonanca

mRNA vjesnička RNA (engl. *messanger RNA*)

NER engl. *nucleotide excision repair*

NGS engl. *next generation sequencing*

NSCLC nesitnostanični karcinom pluća (engl. *non small cell lung carcinoma*)

NSCLC-NOS nesitnostanični karcinom pluća bez drugih obilježja (engl. *non small cell lung carcinoma – not otherwised specified*)

NTRK engl. *neurotrophic thyrosin kinase*

PD1 engl. *programmed death 1*

PD-L1 engl. *programmed death - ligand 1*

PET pozitronska emisijska tomografija (engl. *positron emission tomography*)

PIK3 engl. *phosphatidylinositol 3 - kinase*

PS eng. *perfomance status*

RAS engl. *Rat sarcoma*

RET engl. *rearranged during transfection*

Rt-PCR lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *real time - polymerase chain reaction*)

TKI inhibitori tirozin kinaze (engl. *tyrosine kinase inhibitors*)

TMB engl. *tumor mutational burden*

TP53 engl. *tumor protein p 53*

TTF-1 engl. *thyroid transcription factor-1*

SCLC sitnostanični karcinom (engl. *small cell lung carcinoma*)

SE sedimentacija

STAS engl. *spread through air spaces*

SZO Svjetska zdravstvena organizacija

UICC Međunarodna unija za borbu protiv raka (eng. *Union for International Cancer Control*)

UZ ultrazvuk

VEGF-1 engl. *vascular endothelial growth factor-1*

XPF engl. *xeroderma pigmentosum group X*

UVOD

1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA PLUĆA

1.1.1. Epidemiologija

Karcinom pluća je od nekoć rijetke bolesti, u posljednjih 100 godina postao globalni javnozdravstveni problem epidemijskih razmjera. To je danas najčešće dijagnosticirana maligna bolest (11,6% ukupne incidencije malignih tumora) i najčešći je uzrok smrti od maligne bolesti (18,4% ukupno umrlih) u oba spola u svijetu (1). Broj novooboljelih se svake godine povećava, bez značajnijih poboljšanja u ukupnom preživljenju. U svijetu je 2012. godine zabilježeno 1,8 milijuna oboljelih i 1,6 milijuna umrlih, a 2018. godine 2 milijuna oboljelih i 1,7 milijuna umrlih od karcinoma pluća. Najviša incidencija je u zemljama Srednje i Istočne Evrope i u Istočnoj Aziji. Prema podatcima za 2018. godinu prednjači Mađarska sa stopom incidencije od 56,7 na 100 tisuća stanovnika, dok je Hrvatska na 23. mjestu sa stopom incidencije od 32,5 na 100 tisuća stanovnika (2). Desetljećima je raspodjela po spolu pokazivala veći udio muškog spola. Zadnjih godina globalno se bilježi blagi pad incidencije i smrtnosti u muškaraca i postupni porast u žena (3). Jedno od mogućih objašnjenja je smanjenje broja pušača među muškarcima i povećanje među ženama, osobito u zemljama koje se brzo razvijaju. Izloženost dimu pri kuhanju i grijanju na ugljen u zatvorenom prostoru bez dobre ventilacije može u žena nepušača povećati rizik od karcinoma pluća (4). Medijan životne dobi oboljelih u svijetu je u trenutku dijagnoze 71 godina i najčešće se dijagnosticira u uznapredovalom metastatskom stadiju bolesti kad je petogodišnje preživljenje 5%, a zajedno za sve stadije bolesti 16% (5). U Republici Hrvatskoj (RH) je prema podatcima Registra za rak za 2016. godinu, među novootkrivenim malignim tumorima u muškaraca karcinom pluća na drugom mjestu (17%) iza karcinoma prostate (19%), a u žena na trećem mjestu (8%) iza karcinoma dojke (25%) i kolona (9%) (6). Od 3068 novooboljelih od karcinoma pluća u RH 2016. godine, umrlo je 2868 (93,4%) bolesnika, a bolest im je dijagnosticirana kao uznapredovala metastatska bolest u 23,7% , lokalno proširena bolest u 20,6% i lokalizirana bolest u 8,7% slučajeva; u 47% slučajeva nije bilo podataka o stadiju bolesti. Novooboljeli su većinom bili muškog spola, 2164 (70,5%).

Petogodišnje preživljenje oboljelih od raka pluća u RH je za sve stadije zajedno 10%, što je lošije od prosjeka razvijenih zemalja (6). Uvođenje Nacionalog programa za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020. - 2024. ima za cilj povećati petogodišnje preživljenje s 10% na 18%, kao u SAD-u (7). Rizična populacija, aktivni pušači u dobi od 50 do 75 godina ili bivši

pušači koji su prestali pušiti unutar 15 godina, pozvat će se na preventivne preglede CT-om niske doze zračenja. Uvjet za probir je pušački staž od minimalno 30 godina i 30-tak i više kutija cigareta godišnje. Cilj programa je u pet godina postići odaziv od 50% među tom populacijom i smanjiti ukupnu smrtnost od raka pluća za 20%.

1.1.2. Etiologija

Nastanak karcinoma pluća je u 90% slučajeva povezan s pušenjem i potencijalnim karcinogenima iz duhanskog dima, kao što su policiklički aromatski ugljikovodici i aromatski amini, N-nitrozamini, benzen, vinil klorid i arsen. Rizik od pojave karcinoma pluća je 30 puta veći u pušača nego u nepušača (8). U RH puši 31,1% stanovništva: 35,3% muškaraca i 27,1% žena, a među nepušačima je 21,1% bivših pušača što ukazuje na velik udio pušača u općoj populaciji (9).

Ostali rizični čimbenici su dugotrajna profesionalna izloženost azbestu, kromu, arsenu, kadmiju, siliciju, cinku, zatim pasivno pušenje, zagađenost zraka u velikim gradovima zbog policikličkih ugljikovodika iz ispušnih plinova motornih vozila, kronična opstruktivna plućna bolest, starost te izloženost radonu i radioaktivnom zračenju (10).

1.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI

1.2.1. Klinička slika

Karcinom pluća se u 70% - 80% bolesnika prezentira simptomima uznapredovale bolesti, a rjeđe se otkriva u ranoj asimptomatskoj fazi, obično zahvaljujući slikovnim pretragama pluća u sklopu neke obrade (11). Znakovi i simptomi karcinoma pluća nastaju zbog lokalnog tumorskog rasta, invazije ili opstrukcije susjednih struktura, širenja limfnim putevima u regionalne limfne čvorove, hematogenim rasapom u udaljene metastaze, ili zbog paraneoplastičnog sindroma. Većina bolesnika se javi liječniku zbog dugotrajnog kašlja ili hemoptize, dispneje ili pneumonitisa nastalih uslijed centralnog ili endobronhalnog rasta tumora. Kad tumor, češće adenokarcinom, raste periferno, može izazvati bol zbog urastanja u pleuru i stijenku prsnog koša. Regionalni rast tumora kontinuiranim širenjem ili metastaziranjem u regionalne limfne čvorove može izazvati disfagiju zbog kompresije jednjaka, promuklost uslijed paralize glasnica zbog zahvaćanja rekurentnog živca, paralizu freničnog živca s podizanjem hemidijafragme i paralizu simpatikusa uz nastanak Hornerova

sindroma (ptoza, mioza, enoftalmus i prestanak znojenja na istoj strani). Pancoastov sindrom je posljedica lokalnog širenja tumora iz plućnog vrška u osmi cervikalni te prvi i drugi torakalni živac, što izaziva jaku bol u ramenu i duž ulnarne strane podlaktice. Lokalno širenje tumora može izazvati sindrom gornje šuplje vene, pleuralni ili perikardijalni izljev. Metastaze u mozgu prezentiraju se neurološkim ispadima, u koštanoj srži kao pancitopenija ili patološki prijelomi, a metastaze u jetru kao bol pod rebrenim lukom i biokemijska disfunkcija. Česte su metastaze u nadbubrežnu žlijezdu, supraklavikularne i aksilarne limfne čvorove i supkutano (12). Nespecifični sustavni simptomi uznapredovale bolesti su mršavljenje, kronični umor i febrilitet, učestale pneumonije na istom mjestu i sklonost drugim infekcijama zbog oslabljenog imuniteta. Rjeđe je prvi klinički simptom paraneoplastični sindrom koji se može očitovati kao anemija, tromboflebitis, duboka venska tromboza, batićasti prsti i kaheksija. Rijetko zloćudne stanice mogu ektopično lučiti hormone ili njemu slične peptide pa bolesnik ima npr. hiperkalcemiju i hipofosfatemiju (luče protein povezan s parathormonom), hiponatrijemiju (luče protein povezan s antidiuretskim hormonom) ili hipokalijemiju i Cushingov sindrom (luče ACTH ili njemu sličan polipeptid) (13).

1.2.2. Dijagnostički postupci

Dijagnostički postupci su anamneza i fizikalni pregled, laboratorijski testovi (KKS, DKS, SE, koagulacijski testovi, kompletna biokemija), radiološke slikovne pretrage i morfološka analiza s genetskom analizom. Patološka dijagnoza se postavlja na temelju patohistološke/citološke analize uzorka tkiva dobivenog bronhoskopijom/transtorakalnom biopsijom pod kontrolom CT-a ili UZ-a. Osim toga, citološka dijagnoza se može postaviti analizom iskašljaja, ispirka, otisaka, bronhoalveolarnog lavata i obriska četkicom, transtorakalnog punktata, analizom pleuralnog izljeva, punktata limfnih čvorova ili udaljenih metastaza (14). U bolesnika u kojih je dijagnosticiran adenokarcinom, treba refleksnim testiranjem analizirati postojanje aktivirajućih mutacija: 1) imunohistokemijski analizirati izražaj ALK i ROS1 i 2) metodom rtPCR odrediti *EGFR* status. U svim NSCLC treba imunohistokemijski analizirati PD-L1 status radi eventualne imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka (14).

Dijagnostički postupci za procjenu proširenosti bolesti su CT toraksa i gornjeg abdomena, PET u potencijalno operabilnih bolesnika, scintigrafija kosti ako su prisutni simptomi ili postoji sumnja na koštane metastaze, rendgenska snimka kosti ako su prisutni simptomi ili patološki scintigrafski nalaz, CT mozga s kontrastom ili MR ako su prisutni simptomi

moždanih metastaza i u stadiju bolesti II i višem. Ako je potrebno, radi se punkcija i citološka analiza pleuralnog izljeva, punkcija ili biopsija povećanih limfnih čvorova, endobronhalni ultrazvuk, transezofagealni ultrazvuk i medijastinoskopija (14).

Kad u obzir dolazi operativni zahvat, treba prethodno procijeniti funkciju respiratornog sustava na temelju nalaza spirometrije, analize plinova u arterijskoj krvi i acidobaznog statusa, određivanja difuzijskog kapaciteta pluća, EKG-a, ultrazvuka srca i dodatnih pretraga (ventilacijska i perfuzijska scintigrafija pluća, spiroergometrija i određivanje tlakova u plućnoj arteriji) (14).

1.3. PATOHISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA

Mikroskopskim pregledom bioptičkog i citološkog uzorka ili operativnog materijala određuje se tip karcinoma pluća. Prema klasifikaciji SZO iz 2015. godine, invazivni karcinom pluća se dijeli na adenokarcinom, karcinom pločastih stanica, karcinom velikih stanica, neuroendokrine tumore, adenoskvamozni karcinom, sarkomatoidni karcinom, karcinom tipa žlijezda slinovnica i neklasificirani karcinom (15). Povijesna podjela na sitnostanični karcinom pluća (engl. *small cell lung cancer* - SCLC) i nesitnostanični karcinom pluća (engl. *non small cell lung cancer* - NSCLC) je klinički važna jer se razlikuju u terapijskom pristupu i prognozi. Na NSCLC otpada 85% svih karcinoma pluća i tu se ubrajaju adenokarcinom, karcinom pločastih stanica, karcinom velikih stanica i ostale rijetke morfološke varijante. SCLC je u trenutku dijagnoze najčešće proširena bolest koja se liječi sustavnom kemoterapijom, s ili bez zračenja i ima lošu prognozu (14). Nasuprot tome, NSCLC se u određenom postotku slučajeva dijagnosticira u operabilnom stadiju, diseminirana bolest ima lošiji odgovor na kemoterapiju od SCLC, ali postoji mogućnost ciljane terapije i imunoterapije pa je prognoza bolja (14).

1.4. ADENOKARCINOM PLUĆA

1.4.1. Definicija i morfologija

Adenokarcinom je najčešći histološki tip karcinoma pluća, s udjelom oko 45% (16). Definira se kao zloćudni epitelni tumor sa žljezdanom diferencijacijom, produkcijom sluzi ili izražajem pneumocitnih imunohistokemijskih biljega. Nastaje zloćudnom transformacijom pneumocita tipa II i bronhiolarnih necilijarnih sekretornih stanica, tzv. Klara stanica. Najčešće

raste kao periferni tumorski čvor, a rjeđe kao endobronhijalni plak/polip obložen intaktnom sluznicom, ili kao intramuralno ili „pseudomezotelijalno“ zadebljanje. Preinvazivne lezije su atipična adenomatozna hiperplazija (AAH) i adenokarcinom in situ (AIS) (15).

Invazivni adenokarcinom pluća ima različite histološke slike (lepidički, acinarni, papilarni, mikropapilarni i solidni podtip), često kombinirane u istom tumoru (15). U lepidičkom podtipu atipični pneumociti tipa II ili Klara stanice oblažu alveole. U acinarnom podtipu zloćudne stanice oblikuju žljezdolike ili kribriformne oblike u dezmoplastičnoj stromi i mogu sadržavati mucin. Papilarni podtip je građen od fibrovaskularnih resica obloženih atipičnim epitelom. Mikropapilarni podtip je građen od atipičnih epitelnih stanica koje tvore resice bez fibrovaskularne strome što „plutaju“ u alveolarnim prostorima ili invadiraju stromu. Solidni podtip je građen od nakupina atipičnih poligonalnih epitelnih stanica pa je dodatnim metodama potrebno isključiti karcinom pločastog epitela i karcinom velikih stanica (15).

Varijante invazivnog adenokarcinoma pluća su: 1) invazivni mucinozni adenokarcinom, građen od atipičnih mucinoznih cilindričnih stanica, 2) koloidni adenokarcinom u kojem su alveole obložene atipičnim mucinoznim epitelom i ispunjene mucinom, dijelom rupturirane i s jezercima ekstracelularne sluzi u dezmoplastičnoj stromi, 3) fetalni adenokarcinom građen od glikogenom bogatih atipičnih epitelnih stanica u žljezdolikom rasporedu, okruženih fibromiksoidnom stromom, 4) adenokarcinom s enteričnom diferencijacijom, morfološki nalik kolorektalnom karcinomu. Minimalno invazivni adenokarcinom (MIC) je mali solitarni adenokarcinom (≤3 cm) karakteriziran lepidičkim rastom s ≤5 mm invazivne komponente. Analizom operativnog materijala adenokarcinoma pluća utvrđeno je da se u 80% slučajeva nalazi više od jednog histološkog podtipa, a ponekad i varijanata (15).

Histološki podtipovi imaju različito biološko ponašanje i agresivni potencijal pa tako i prognostički značaj. Stoga je potrebno u reseciranim tumorima odrediti predominantni podtip i varijantu ako postoji. AIS, MIC i predominantno lepidički podtip imaju dobru prognozu, acinarni i papilarni predominantni podtip intermedijarnu, a mikropapilarni i solidni predominantni podtip te varijante koloidni i mucinozni adenokarcinom imaju lošu prognozu (15). Kad se u adenokarcinomu predominantno acinarnog ili lepidičkog podtipa u zračnim prostorima nađu mikropapilarne tumorske formacije (engl. *spread through air spaces* - STAS), određuje se kao mikropapilarni podtip. Uočeno je da STAS značajno pridonosi recidiviranju adenokarcinoma pluća u bolesnika s kliničkim stadijem I koji su bili podvrgnuti ograničenoj resekciji, a ne lobektomiji (17). Određivanje podtipa adenokarcinoma i varijante

ima i prediktivni značaj. U studiji Tsao i suradnika među operiranim bolesnicima koji su primali adjuvantnu kemoterapiju, duže vrijeme bez bolesti imali su bolesnici s mikropapilarnim ili solidnim podtipom u odnosu na bolesnike s acinarnim ili papilarnim podtipom adenokarcinoma (18). *EGFR* mutacija je češća u lepidičkom i papilarnom podtipu (19) dok je *ALK* mutacija češća u acinarnom i solidnom podtipu adenokarcinoma pluća (15). Obje mutacije su dobri prediktori odgovora na terapiju TKI-ima.

1.4.2. Imunohistokemijska obilježja

Dodatne metode za razlikovanje adenokarcinoma pluća od drugih tipova karcinoma pluća i presadnica u pluća su histokemijsko dokazivanje sluzi metodom Pas-alcian ili mucikarmin i imunohistokemijsko bojenje uporabom specifičnih protutijela TTF-1 (engl. *thyroid transcription factor-1*) i Napsin A (slika 1).

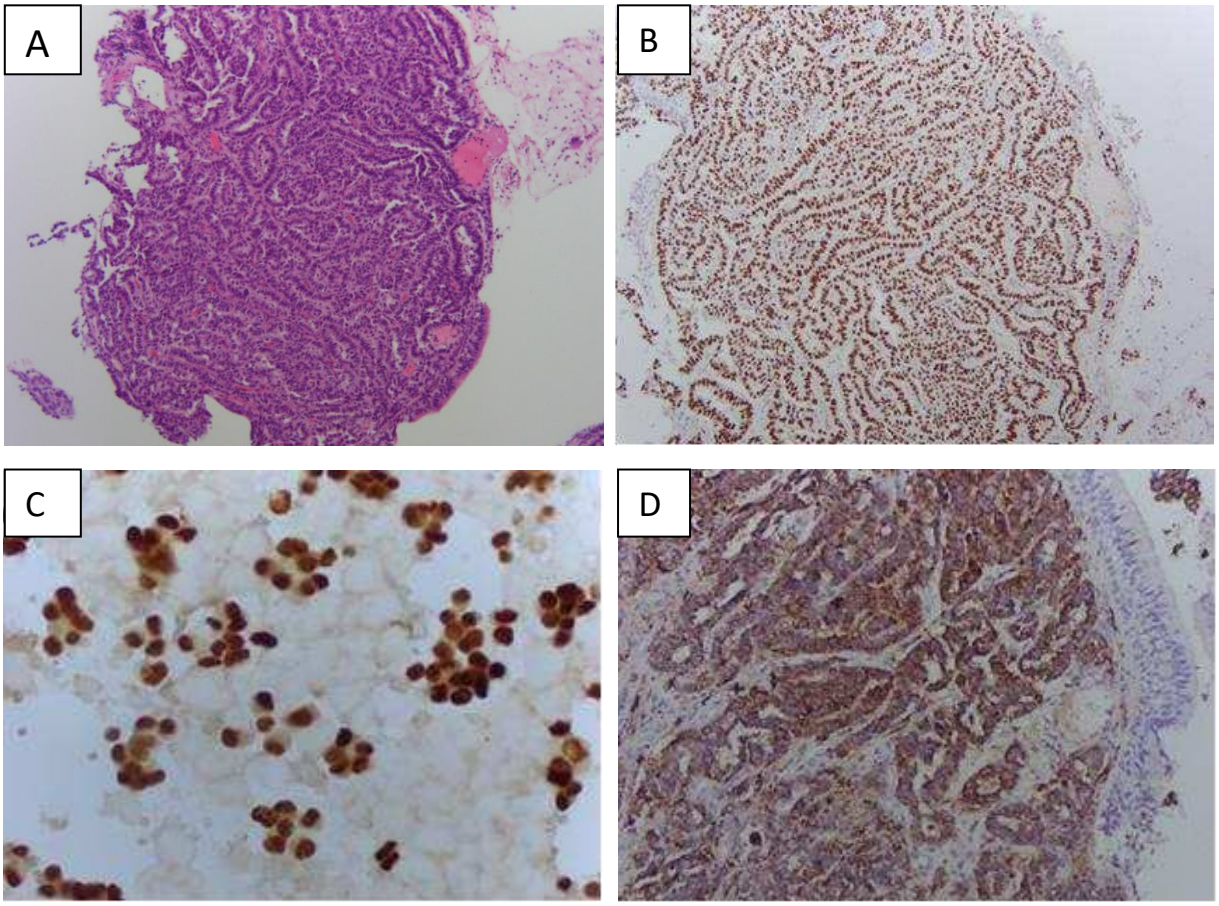
TTF-1 je nuklearni protein nužan za morfogenezu dišnih putova i nastanak pneumocita tipa II. Vezan je za DNK i regulira izražaj surfaktantnih proteina A, B i C u pneumocitima tipa II i sekrecijskih proteina Klara stanica; izvan pluća izražen je u tireocitima (20). Izražaj TTF-1 je pozitivan u adenokarcinomima pluća (62,5% – 80%) i SCLC-u (80% - 100%), a rijetko pozitivan u pločastom karcinomu, do 27% slučajeva (21).

Napsin A je asparatska proteinaza koja sudjeluje u sazrijevanju surfaktanta B. Nalazi se u citoplazmi pneumocita tipa II i fagocitiran u alvelarnim makrofagima: izvan pluća izražen je u epitelu proksimalnih bubrežnih kanalića te izvodnim kanalićima i acinusima gušterače (22). Napsin A je izražen u 80% primarnih adenokarcinoma pluća, rjeđe u slabo diferenciranima, a negativan je u karcinomu pločastih stanica i SCLC. Metastaze raka dojke, gušterače, žučnih putova i crijeva su u manje od 5% slučajeva pozitivne na Napsin A (23). TTF-1 regulira izražaj Napsina A, što objašnjava njihovu čestu koekspresiju (24).

Prema rezultatima više studija pozitivan izražaj TTF-1 i Napsina A u adenokarcinomu pluća je dobar prognostički pokazatelj, a njihov negativan izražaj je povezan s češćim recidiviranjem i kraćim ukupnim preživljenjem (20,21,24,25).

Ako su oba biljega negativna, u proširenom dijagnostičkom imunopanelu koriste se CK 7 koji nije specifičan, ali je pozitivan u gotovo svim adenokarcinomima pluća, zatim biljezi za isključenje karcinoma pločastih stanica (p40 ili CK5/6 ili p63), neuroendokrinih tumora (CD56, kromogranin A, sinaptofizin) te drugih tumora i metastaza (npr. kalretinin, S100, Melan A, ER, GCDFP, POX8, CK20, CDX2) (15). Iako uzorak male biopsije/citologije

karcinoma pluća može biti oskudan, s minimalno tumorskog tkiva i artefakatima, u 70% slučajeva predstavlja jedini materijal za postavljanje dijagnoze. S obzirom da odabir terapije ovisi o histološkom tipu i aktivirajućim mutacijama koje se također analiziraju iz uzorka male biopsije/citologije, SZO je 2015. godine postavila kriterije za dijagnostiku karcinoma pluća u uzorcima male plućne biopsije/citologije. Standardizirani su terminologija i postupak s uzorkom, a naglasak stavljen na racionalni pristup kako bi se sačuvalo dovoljno tkiva za imunohistokemijsku i molekularnu analizu (tablica 1) (15).



Slika 1. Adenokarcinom pluća: A) histološka slika u bronhoskopskoj biopsiji (HE 100x), B) pozitivan izražaj TTF-1 u jezgrama zloćudnih stanica u bioptičkom uzorku (TTF1/HRP 100x) i C) u citološkom uzorku sedimenta pleuralnog izljeva (TTF1/HRP 200x), D) pozitivan izražaj Napsina A u citoplazmi zloćudnih stanica (Napsin A/HRP 100x).

Tablica 1. Terminologija i kriteriji za dijagnostiku adenokarcinom pluća u uzorcima male biopsije/citologije u usporedbi s terminologijom u reseciranim uzorcima, SZO, 2015. (15)

Mala biopsija/citologija	**Morfologija/specijalno bojanje (imunohistokemija)**	**Resecirani tumor**
Adenokarcinom (opisati prepoznatljivi uzorak kao acinarni, papilarni, mikropapilarni, solidni)	Morfološki jasna obilježja adenokarcinoma	Adenokarcinom, naznačiti predominantni podtip:lepidički, acinarni, papilarni, solidni, mikropapilarni
Adenokarcinom s lepidičkim rastom (napomenuti da se ne može isključiti invazija)		Minimalno invazivni karcinom, AIS ili invazivni adenokarcinom s lepidičkom komponentom
Invazivni mucinozni karcinom (opisati prisutni uzorak; invazivni mucinozni adenokarcinom sa lepidičkim uzorkom, ako je prisutan lepidički uzorak)		Invazivni mucinozni adenokarcinom
Adenokarcinom s koloidnim uzorkom		Koloidni adenokarcinom
Adenokarcinom s fetalnim uzorkom		Fetalni adenokarcinom
Adenokarcinom s enteričnim uzorkom		Enterični adenokarcinom
Karcinom nemalih stanica, vjerojatno adenokarcinom	Bez morfoloških obilježja adenokarcinoma, ali dokazan specijalnim bojanjem (npr. TTF1 pozitivan)	Adenokarcinom (solidni uzorak može biti samo jedna komponenta tumora)
NSCC, NOS karcinom nemalih stanica, drugačije ne specificiran	Bez morfoloških i IHK obilježja adenokarcinoma, pločastog ili neuroendokrinog karcinoma	Karcinom velikih stanica
Moguć adenoskvamozni karcinom	Prisutna morfološka obilježja adenokarcinoma i pločastog karcinoma; ili bez morfoloških obilježja, ali je tumor TTF-1 i p40 pozitivan	Adenoskvamozni karcinom (ako je svaka komponenta zastupljena sa $\geq$ 10 %)

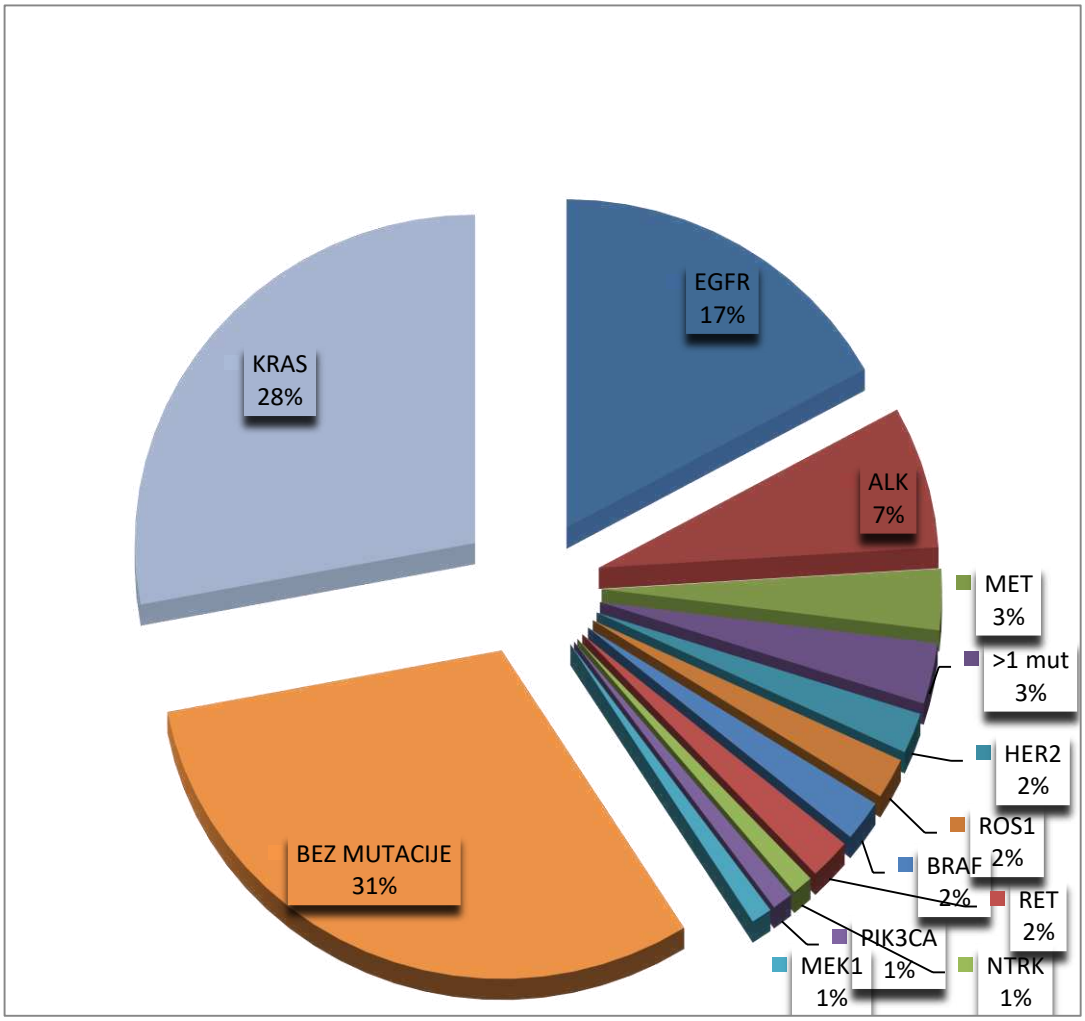
1.4.3. Molekularna obilježja

Izlaganje bronhalne sluznice duhanskom dimu u pušača rano izaziva inaktivaciju tumor supresorskih gena na kratkom kraku kromosoma 3 u respiratornom epitelu pa se tzv. „efektom polja“ mutageniziraju velika područja respiratorne sluznice. Na tom „plodnom tlu“ daljnjim djelovanjem karcinogena akumuliraju se dodatne mutacije koje dovode do kasnih mutacija gena *TP53* i *KRAS* i nastanka karcinoma (26). Poznato je da 10% -15% adenokarcinoma pluća u bijele rase i 30% - 60% u Azijata ima aktivirajuću *EGFR* mutaciju koja potiče signalni put preko RAS, PIK3 i drugih signalnih molekula i time omogućava nekontrolirano umnažanje zloćudnih stanica i izbjegavanje apoptoze (27). Aktivirajući receptor se može blokirati inhibitorom tirozin kinaze (engl. *thyrosine kinase inhibitor* – TKI), što polučuje povoljan, iako privremen terapijski odgovor (28). U adenokarcinomu pluća su rjeđe zastupljene, u 4%-6% slučajeva, aktivirajuće mutacije *ALK*, *ROS1*, *HER2*, *BRAF* i *MET* za koje postoje specifični TKI-i te mutacije *RET, PIK3CA, NTRK1 i NRG1* (26). U ostalim tipovima karcinoma pluća još se istražuju mogući ciljani lijekovi. Među pušačima su češće *KRAS i BRAF* mutacije, a među nepušačima *EGFR, ALK, ROS1* i *ERBB2* mutacije, što ukazuje na različite signalne puteve u nastanku adenokarcinoma pluća u pušača i nepušača (29).

Identifikacija molekularnih mehanizama karcinogeneze te njihovih biljega je važna radi usmjerenog protutumorskog liječenja, odnosno utvrđivanja terapijskih protokola za bolesnike s istim molekularnim obilježjima tumora. Međunarodnom suradnjom tri udruženja, CAP (*College of American Pathologists*), IASLC *(International Association for the Study of Lung Cancer*) i AMP (*Association for Molecular Pathology*) 2013. godine donesene su smjernice u kojima se preporuča refleksno testiranje aktiviranih mutacija *EGFR* i *ALK* radi ciljanog liječenja proširenog adenokarcinoma pluća odgovarajućim TKI-ima (28). Smjernicama je dodana preporuka za refleksno testiranje aktivirane mutacije *ROS1,* 2018. godine, za koju postoji TKI terapija pa se danas obvezno testira tzv. „velika trojka“ - *EGFR, ALK i ROS1* (30). Iste godine smjernice je prihvatilo Udruženje europskih onkologa, ESMO (*European Society for Medical Oncology*) i zajedno s Udruženjem kineskih onkologa *(Chinese Society of Clinical Oncology*) izdalo Pan-Asian smjernice za rutinsko testiranje svih uznapredovalih neskvamoznih NSCLC na *EGFR, ALK, ROS1 i BRAF* mutaciju. U proširenom panelu savjetuje se testirati aktivirajuće mutacije *KRAS, HER2, PIK3CA, MET i RET* (31). Rijetko adenokarcinomi imaju *HER2* amplifikaciju/mutaciju ili *MET* amplifikaciju/mutaciju exona 14 koja se može liječiti tirozin kinaznim inhibitorom. Danas se u najopremljenijim laboratorijima

metodom NGS (engl. *next generation sequencing*), na bioptičkom uzorku ili iz tekuće biopsije radi sveobuhvatni test na osam onkogena, odnosno prediktivnih biljega (*EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, HER2, RET i KRAS*) od kojih za šest postoji ciljana terapija TKI-ima (slika 2) (32).

Slika 2: Genske mutacije u adenokarcinomu pluća i njihova učestalost (modificirano prema ref. 32)



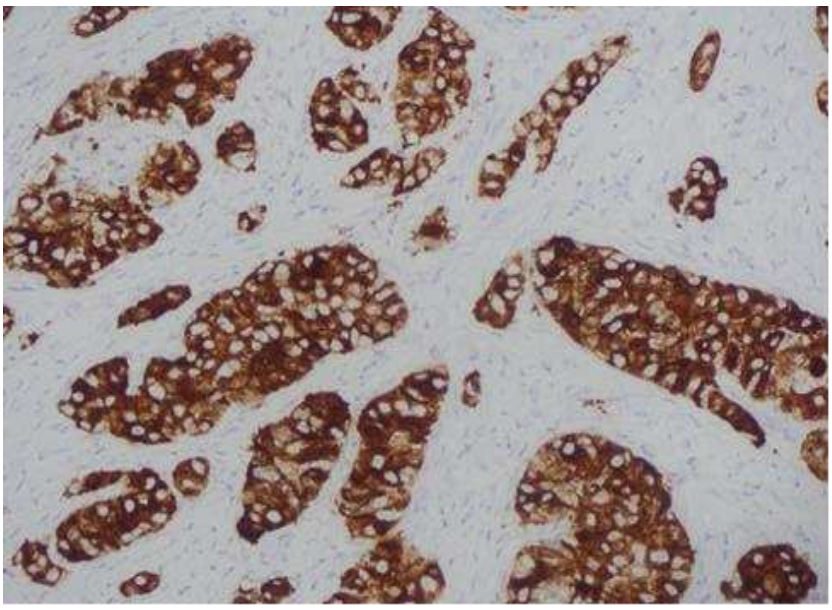
EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) je gen za receptor epidermalnog čimbenika rasta. Njegov produkt je transmembranski glikoprotein koji pripada skupini receptora protein-tirozin kinaze i sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije i apoptoze. Aktivacijska mutacija *EGFR* ima važnu ulogu u karcinogenezi i tumorskoj progresiji jer rezultira nekontroliranom staničnom proliferacijom, aktivacijom transkripcije, inhibicijom apoptoze, tumorskom angiogenezom i metastaziranjem (33). Aktivacijska mutacija *EGFR* utvrđena je u 10% - 15%

adenokarcinoma pluća u bijele rase i 30% - 60% Azijata, češće u žena i nepušača (27). Aktivacijske mutacije *EGFR*-a su prediktivne za terapijski odgovor na TKI-e (osimertinib, gefitinib, erlotinib, afatinib). U 90% slučajeva radi se o deleciji na egzonu 19 i supstitucijskoj mutaciji na egzonu 21 na kodonu 858 (L858R), a u preostalih 10% slučajeva nalaze se rjeđe supstitucijske mutacije na egzonu 18 na kodonu 719 (G719X) i duplikacije i insercije na egzonu 20 (32). Međutim, 8-16 mjeseci od početka liječenja u većine bolesnika se javlja stečena rezistencija i dolazi do progresije bolesti. Najčešći mehanizam, u 60% slučajeva, je sekundarna supstitucijska mutacija u egzonu 20 *EGFR* (T790M), zbog koje je treonin zamijenjen metioninom na poziciji 790. Bolesnici s tom dokazanom mutacijom u drugoj liniji nastavljaju liječenje TKI-ima *EGFR* nove generacije, osimertinibom, ako njime nisu liječeni u prvoj liniji. Ako jesu, ili mutacija nije dokazana, liječenje se nastavlja kemoterapijom ili kemoterapijom u kombinaciji s imunoterapijom (32,34,35). Rjeđi uzroci rezistencije na TKI-e su pretvorba adenokarcinoma u sitnostanični karcinom u 14% slučajeva, epitelno-mezenhimalna pretvorba ili aktivacija alternativnih staničnih signalnih putova zbog c-*MET* amplifikacije u 5% slučajeva, *HER2* amplifikacije u 8% i mutacije *PIK 3C* u 5% slučajeva (15).

ALK-translokacija se nalazi u 2% - 6% adenokarcinoma pluća; bolesnici su češće u mlađoj odrasloj dobi i nepušači. Transkromosomska translokacija (inverzija) gena *ALK* (engl. *anaplastic lymphoma kinase*) i *EML4* (engl. *echinoderm microtubule - associated protein - like* 4) na kromosomu 2 stvara *EML4-ALK* fuzijski gen čiji citoplazmatski protein ima tirozin kinaznu aktivnost i potiče rast tumora (27). U praksi je imunohistokemijska analiza izražaja ALK prihvaćena kao ekvivalent fluorescentnoj in situ hibridizaciji, zlatnom standardu za dokazivanje *EML4-ALK* (slika 3) (30). U terapiji bolesnika s ALK-translokacijom preporučuje se u prvoj liniji primjena TKI-a ALK kao što su alectinib, crizotinib, ceritinib i brigatinib (35). Unatoč odličnom terapijskom odgovoru, nakon nekog vremena dolazi do rezistencije na TKI i progresije bolesti kada se liječenje treba nastaviti TKI-om nove generacije, lorlatinibom. Mehanizmi rezistencije su sekundarne mutacije u domeni tirozin kinaze ALK, najčešće L1196M mutacija, zatim amplifikacija *ALK* i pojava novih pogonskih onkogena poput mutacije *EGFR* i *KRAS* (36).

ROS1-translokacija je rezultat zamjene lokusa *ROS1* i mnogih drugih gena. ROS1 tirozin kinaza spada u porodicu inzulinskih receptora i strukturno je slična tirozin kinaznoj domeni ALK. Aktivacijom ROS1 fuzijskih tirozin kinaznih domena dolazi do signalne kaskade koja

aktivira MAPK i AKT signalni put, što potiče staničnu proliferaciju i druge tumorogene učinke. ROS1 protein se dijagnosticira imunohistokemijski i potvrđuje primjenom FISH metode. ROS1-translokacija pojavljuje se u 3% NSCLC, najčešće mlađih i nepušača i prediktor je osjetljivosti na TKI ALK, crizotinib (37). Ako dođe do rezistencije na crizotinib i sistemske progresije bolesti, liječenje se nastavlja lorlatinibom, TKI-om nove generacije (35).



Slika 3. Imunohistokemijski izražaj ALK pozitivnog adenokarcinoma pluća (ALK/HRP 200x)

1.5. TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA I STADIJI BOLESTI

U opisu anatomske proširenosti karcinoma pluća koristi se TNM klasifikacija i svrstavanje u stadije na temelju kojih se planira terapijski protokol i može prognozirati klinički tijek bolesti. Zajedničkim naporima Međunarodne unije za borbu protiv raka (eng. *Union for International Cancer Control* - UICC), Američkog društva za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer* - AJCC) i Međunarodnog udruženja za proučavanje raka pluća (eng. *The International Association for the Study of Lung Cancer* - IASLC) uspostavljena je TNM klasifikacija pomoću koje se za svaki karcinom pluća može odrediti stadij bolesti (38).

TNM klasifikacija karcinoma pluća prema posljednjem, 8. izdanju je prikazana u tablici 2 (38).

Tablica 2. Deskriptori primarnog tumora, regionalnih limfnih čvorova i udaljenih presadnica prema 8. TNM klasifikaciji karcinoma pluća (38)

Primarni tumor (T)	
TX	Primarni tumor nije moguće utvrditi ili je dokazan prisutnošću zloćudnih stanica u iskašljaju ili bronhalnom ispirku, ali se ne može vizualizirati slikovnim pretragama ili bronhoskopijom
T0	Nema dokaza primarnog tumora
Tis	Karcinom *in situ*
T1	Tumor ≤ 3 cm u najvećem promjeru, okružen plućem ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopski vidljivog širenja proksimalnije od lobarnog bronha
T1mi	Minimalno invazivni karcinom
T1a	Tumor ≤ 1 cm u najvećem promjeru
T1b	Tumor > 1 cm, ali ≤ 2 cm u najvećem promjeru
T1c	Tumor > 2 cm, ali ≤ 3 cm u najvećem promjeru
T2	Tumor > 3 cm, ali ≤ 5 cm u najvećem promjeru ili tumor s nekim od sljedećih obilježja: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine, ali bez širenja na karinu ili zahvaća visceralnu pleuru ili uzrokuje atelektazu ili opstruktivni pneumonitis koji se širi u hilarnu regiju zahvaćajući dio pluća ili cijelo pluće
T2a	Tumor > 3 cm, ali ≤ 4 cm u najvećem promjeru
T2b	Tumor > 4 cm, ali ≤ 5 cm u najvećem promjeru
T3	Tumor > 5 cm, ali ≤ 7 cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u istom režnju kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od ovih struktura: stijenku prsnog koša (uključujući parijetalnu pleuru i tumore gornjeg sulkusa), frenički živac, parijetalni perikard
T4	Tumor > 7 cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u različitom režnju ipsilateralnog pluća kao i primarni tumor, ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od ovih struktura: ošit, medijastinum, srce, velike krvne žile, traheju, nervus laryngeus recurrens, jednjak, kralježnicu i karinu
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	Nije moguće procijeniti zahvaćenost limfnih čvorova
N0	Bez presadnica u limfne čvorove
N1	Presadnice u ipsilateralne peribronhalne i/ili ipsilateralne hilarne limfne čvorove i intrapulmonalne čvorove, uključujući i izravno širenje
N2	Presadnice u ipsilateralne medijastinalne i/ili subkarinalne limfne čvorove
N3	Presadnice u kontralateralne medijastinalne, kontralateralne hilarne, ipsilateralne ili kontralateralne skalenske ili supraklavikularne limfne čvorove

Udaljene presadnice (M)	
M0	Bez udaljenih presadnica
M1	Prisutne udaljene presadnice
M1a	Odvojeni tumorski čvor/čvorovi u kontralateralnom režnju; pleuralni tumorski čvor/čvorovi ili maligni pleuralni ili perikardijalni izljev
M1b	Pojedinačna presadnica izvan toraksa
M1c	Višestruke presadnice izvan toraksa u jedan ili više organa

Razlike prema prethodnom 7. izdanju TNM klasifikacije su prikazane u tablici 3 (39).

Tablica 3. Razlike u deskriptorima između 7. i 8. izdanja TNM klasifikacije karcinoma pluća (38,39)

Deskriptor	**7. izdanje**	**8. izdanje**
T komponenta		
0 cm (lepidični adenokarcinom ≤ 3 cm)	T1a ≤ 2 cm; T1b > 2 - 3 cm	Tis (AIS)
≤ 0.5 cm veličina invazije (predominantno lepidični adenokarcinom ≤ 3 cm)	T1a ≤ 2 cm; T1b > 2 - 3 cm	T1mi
≤ 1 cm	T1a	T1a
> 1-2 cm	T1a	T1b
> 2-3 cm	T1b	T1c
> 3-4 cm	T2a	T2a
> 4-5 cm	T2a	T2b
> 5-7 cm	T2b	T3
> 7 cm	T3	T4
Bronh < 2 cm od karine	T3	T2
Totalna atelektaza/pneumonitis	T3	T2
Totalna atelektaza/pneumonitis	T3	T4
Invasija medijastinalne pleure	T3	-
N komponenta		
Ne nalaze se, nisu zahvaćeni, ili regionalni limfni čvorovi su zahvaćeni	NX, N0, N1, N2, N3	Bez promjena
M komponenta		
Presadnice unutar prsnog koša	M1a	M1a
Pojedinačna ekstratorakalna presadnica	M1b	M1b
Multiple ekstratorakalne presadnice	M1b	M1c

AIS- adenocarcinoma in situ mi- minimalno invasivni adenokarcinom Tis- tumor in situ

Stadiji bolesti određuju se na temelju TNM klasifikacije, odnosno karakteristika primarnog tumora (T), statusa limfnih čvorova (N) i statusa udaljenih presadnica (M) (tablica 4).

Tablica 4. Stadiji karcinoma pluća prema 8. TNM klasifikaciji (38)

Stadij bolesti	**Primarni tumor (T)**	**Regionalni limfni čvorovi (N)**	**Udaljene metastaze (M)**
Okultni karcinom	TX	N0	M0
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I A1	T1mi, T1a	N0	M0
Stadij I A2	T1b	N0	M0
Stadij I A3	T1c	N0	M0
Stadij I B	T2a	N0	M0
Stadij II A	T2b	N0	M0
Stadij II B	T1a-c, T2a,b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadij III A	T1a-c, T2a,b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0,N1	M0
Stadij III B	T1a-c, T2a,b	N3	M0
	T3, T4	N2	M0
Stadij III C	T3, T4	N3	M0
Stadij IV A	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a, M1b
Stadij IV B	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

Prije odluke multidisciplinarnog tima o terapiji, treba procijeniti opće tjelesno stanje bolesnika na ljestvici ECOG (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group*) (40). Kriteriji su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. ECOG ljestvica općeg tjelesnog stanja bolesnika (40)

Stadij	ECOG
0	Bolesnik potpuno aktivan, sposoban obavljati bez ikakvih poteškoća sve aktivnosti kojima se bavio i prije bolesti.
1	Simptomatski, ali potpuno ambulantni bolesnik. Ograničen je u težim fizičkim aktivnostima, ali sposoban nastaviti posao koji je sjedilački i nije pretjerano zahtjevan, kao što su lagani kućanski poslovi ili uredski posao.
2	Ambulantni bolesnik koji je sposoban sam se brinuti za sebe, ali je nesposoban izvršavati bilo kakve radne aktivnosti; više od 50% vremena koje provodi budan, nije ograničen za krevet ili stolac.
3	Bolesnik djelomično sposoban brinuti se za sebe i ograničen na krevet ili stolac više od 50% vremena koje provodi budan.
4	Potpuno onemogućen bolesnik koji se ne može brinuti za sebe i u potpunosti je ograničen na krevet ili stolac.
5	Mrtav.

1.6. LIJEČENJE ADENOKARCINOMA PLUĆA

1.6.1. Razvoj terapije karcinoma pluća

Devedesetih godina prošlog stoljeća terapijske mogućnosti za liječenje uznapredovalog karcinoma pluća bile su vrlo ograničene, a medijan preživljenja 2 - 4 mjeseca (41). Uvođenjem kemoterapije temeljene na platini (cisplatin i karboplatin) u kombinaciji s taksanima (paklitaksel, docetaksel), antimetabolitima (gemcitabin) ili vinka alkaloidima (vinblastin i vinorelbin), značajno se poboljšalo preživljenje bolesnika i dosegnut je „plato“ medijana preživljenja od 10 mjeseci. Ti lijekovi su i danas „zlatni standard“ za većinu oboljelih od karcinoma pluća (43). Antimetabolit pemetreksed je uveden 2008. za liječenje uznapredovalog neskvamoznog NSCLC, nakon čega je medijan preživljenja produljen na 12 mjeseci (44). Bevacizumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protutijelo koje sprječava tumorsku angiogenezu inhibiranjem VEGF-1 (engl. *vascular endothelial growth factor-1*) (45). Odobren je 2006. za liječenje adenokarcinoma pluća, jer je utvrđeno produljenje ukupnog preživljenja za dva mjeseca u bolesnika liječenih kombinacijom

bevacizumaba i karboplatine/paklitaksela u odnosu na bolesnike liječene karboplatinom /paklitakselom. Bevacizumab je kontraindiciran u bolesnika koji imaju karcinom pločastih stanica, hemoptizu, kardiovaskularnu bolest, nekontroliranu hipertenziju i koagulopatiju (45).

Terapija adenokarcinoma je revolucionarno izmijenjena nakon otkrića TKI-a koji omogućuju ciljanu terapiju bolesnika s aktivirajućom mutacijom gena uključenih u karcinogenezu (46). Za primjenu TKI-a nužno je dokazati aktivacijsku, pogonsku (engl. *driver*) mutaciju u zloćudnim stanicama pa je, prije odluke o terapiji, nužno refleksno genetičko testiranje adenokarcinoma u bioptičkom uzorku. Genetička istraživanja adenokarcinoma pluća su dovela do otkrića mnogih pogonskih mutacija i paralelno s tim razvoja lijekova koji ih ciljano inhibiraju (tkz. *companion biomarkers*) čime su postavljeni temelji precizne, ciljane medicine. Praktičan primjer je obvezno refleksno testiranje *EGFR* i *ALK* mutacija u adenokarcinomu pluća i mogućnost liječenja specifičnim TKI-om. Takvim liječenjem se poboljšala kvaliteta života, produljilo vrijeme bez progresije bolesti i ukupno preživljenje od 10 mjeseci u bolesnika liječenih kemoterapijom, na 2-5 godina u bolesnika s *EGFR* mutacijom liječenih TKI-ima EGFR, odnosno do 7 godina za bolesnike s *ALK* mutacijom liječenih TKI-ima ALK (46).

Unatrag desetak godina, provedena su brojna istraživanja o ulozi imunološkog sutava u karcinogenezi. Tumori uspijevaju izbjeći nadzoru imunološkog sustava, rasti i metastazirati. Boljem razumijevanju mehanizama regulacije imunološkog sustava doprinijelo je otkriće imunoloških kontrolnih točaka vezanih uz PD1 (engl. *programmed death 1*) i PD-L1 (engl. *programmed death-ligand 1*) na membrani stanica imunološkog sustava, odnosno zloćudnih stanica (47). Paralelno s njihovim otkrićem komercijalno su razvijena monoklonska IgG protutijela koja inhibiraju imunološke kontrolne točke: nivolumab, pembrolizumab i atezolizumab. Primjenjuju se u imunoterapiji uznapredovalog NSCLC s pozitivnim izražajem PD-L1 na zloćudnim stanicama u bolesnika koji nemaju specifične mutacije pogodne za liječenje TKI-ma, u dobrom su kliničkom stanju (eng. *perfomance status* - PS 0-2), nisu na imunosupresivnoj terapiji i ne boluju od autoimune bolesti (35). Status PD-L1 se testira imunohistokemijski standardiziranim postupkom i izražava postotkom pozitivne membranske obojenosti na 100 zloćudnih stanica (0%, 1%-49%, ≥50%,) (47). Pembrolizumab se pokazao iznimno učinkovit u liječenju bolesnika s visokom izražajem PD-L1 (PD-L1 ≥50%). Danas znamo da što je viši izražaj PD-L1, bolji je odgovor na imunoterapiju, ali i da bolesnici s negativnim izražajem PD-L1 mogu dobro odgovoriti na liječenje. Zbog toga je nužno pronaći

novi prediktivni čimbenik imunoterapije (48). Nekoliko studija je ukazalo na nezavisnu prediktivnu važnost određivanja zbroja mutacija u tumoru (engl. *tumor mutational burden* - TMB) metodom NGS; što je TMB bio veći, odgovor na imunoterapiju je bio bolji i nije bio sukladan s izražajem PD-L1 na tumorskim stanicama (49).

Inicijalni plan liječenja za svakog bolesnika s adenokarcinomom pluća donosi multidisciplinarni tim specijalista (onkolog, pulmolog, patolog, kirurg i radioterapeut) na temelju patohistološke/citološke dijagnoze, PD-L1 statusa, mutacija *EGFR, ALK i ROS1,* stadija bolesti, procjene ECOG statusa i komorbiditeta (32).

1.6.2. Liječenje bolesnika s lokaliziranom/lokalno uznapredovalom bolešću

U bolesnika sa stadijem bolesti I i II terapija izbora je kirurški zahvat. Lobektomija (optimalno) ili pulmektomija imaju prednost pred segmentektomijom ili klinastom resekcijom. Zbog potencijalnih metastaza u ipsilateralne limfne čvorove (N1 i N2) preporučuje se potpuna resekcija limfnih čvorova medijastinuma (50). Nakon kirurškog liječenja potrebno je provesti adjuvantnu kemoterapiju temeljenu na platini u bolesnika sa stadijem bolesti IB, IIA, IIB i IIIA. U određenim slučajevima potrebno je kemoterapiju kombinirati sa sekvencijskom ili konkomitantnom radioterapijom (51). Za bolesnike sa stadijem IIIA preporučuje se provesti neoadjuvantnu kemoterapiju temeljenu na platini prije eventualnog kirurškog zahvata. Ako bolesnik nije kandidat za kirurški zahvat, treba primiti primarnu konkomitantnu kemoradioterapiju (52). Ako bolesnik sa stadijem bolesti I ili II zbog komorbiditeta ne može podnijeti kirurški zahvat i resekciju pluća, u obzir dolazi radikalna radioterapija tumora, odnosno kemoradioterapija (53). U bolesnika sa stadijem bolesti IIIB najbolji rezultat se postiže primjenom konkomitantne kemoradioterapije (14).

1.6.3. Sistemska terapija bolesnika s proširenom bolešću

Bolesnicima s proširenim adenokarcinomom bez aktivacijskih mutacija i s negativnim izražajem PD-L1, a koji su dobrog općeg stanja, daje se u prvoj liniji sistemska kemoterapija temeljena na platini i bevacizumab. Ukoliko se postigne parcijalni odgovor na terapiju ili stabilna bolest, daje se monoterapija održavanja pemetreksedom (32). U bolesnika s aktivacijskom mutacijom *EGFR*-a u prvoj liniji liječenja preporučuje se primjena TKI-a *EGFR* (osimertiniba, erlotiniba, afatiniba ili gefitiniba). Ako bolest progredira, treba u rebiopsiji tumora ili iz tumorskih stanica u krvi bolesnika (engl. *liquid biopsy*) uraditi test na

rezistentnu T790M mutaciju. Ukoliko je prisutna, preporučuje se terapija osimertinibom, ako bolesnik nije njime primarno liječen (35). U bolesnika s ALK-translokacijom u prvoj liniji preporučuje se liječenje crizotinibom, alektinibom, brigatinibom ili ceritinibom, a kod pojave sistemske progresije bolesti, nastavlja se liječenje lorlatinibom. Bolesnici s dokazanom *ROS1* mutacijom u prvoj liniji liječe se crizotinibom, entrectinibom ili ceritinibom (35). Bolesnicima s proširenim karcinomom i bez aktivirajućih mutacija kojima je imunohistokemijski dokazan PD-L1 u ≥50% zloćudnih stanica preporučuje se liječenje u prvoj liniji imunoterapijom, pembrolizumabom, ili ako je dokazan PD-L1 u <50% zloćudnih stanica liječenje kemoterapijom temeljenoj na platini u kombinaciji s imunoterapijom (35).

1.7. *ERCC1* (engl. *excision repair cross-complementation group 1*)

1.7.1. Definicija i značaj u prognozi i predikciji karcinoma pluća

U kemoterapiju temeljenu na platini spadaju spojevi metala platine, cisplatin i njegov derivat karboplatin. Cisplatin je u plazmi neaktivana molekula, a unutar stanice otpušta dva iona klora i postaje reaktivna elektrofilna molekula koja stvara kovalentne veze s velikim molekulama i DNA (54). Stvaranje platina-DNA adukata (monoadukata, intra- i interlančanih i DNA-protein umreženja) ometa funkciju DNA, inhibira tumorsku proliferaciju i uzrokuje staničnu smrt. Platina-DNA monoadukte i unutarlančane mreže popravlja sustav NER (engl. *nucleotide excision repair*), a spojeve među lancima popravlja NER i sustav homologne rekombinacije (55).

Kemoterapija temeljena na platini nije jednako učinkovita u svih bolesnika, što je potaklo istraživanja mogućih prediktivnih čimbenika među kojima je najizgledniji ERCC1 (56,57). ERCC1 je produkt gena *ERCC*1 na kromosomu 19 i jedan od 30-tak enzima NER sustava koji izrezivanjem nukleotida popravljaju DNA. ERCC1 s XPF (engl. *xeroderma pigmentosum group X*), zvanom i ERCC4, stvara heterodimer ERCC1-XPF koji djeluje kao endonukleaza specifična za strukturu. Njegovo konstitucionalno slabije djelovanje se nalazi u bolestima pigmentirana kseroderma, sindrom Cockayne i trihotiodistrofija. Kompletna delecija ERCC1 u ljudi nije nađena, a u transgeničnih miševa nije spojiva sa životom (58). ERCC1 je glavni enzim koji sudjeluje u popravku oštećenja DNA uzrokovanog kemoterapijom temeljenoj na platini pa se pretpostavlja da njegova aktivnost utječe na učinak terapije. Uzroci koji mogu

dovesti do smanjenog izražaja ERCC1 su heterozigotna delecija, jednonukleotidni polimorfizam (engl. *single-nucleotide polymorphism* - SNP) ili hipermetilacija promotora ERCC1 koja uzrokuje smanjenu razinu mRNA i proteina ERCC1 (59). Prema podatcima iz literature, slab ili negativan izražaj ERCC1 je nađen u 35% - 69% NSCLC, rjeđe u adenokarcinomu nego u karcinomu pločastih stanica, u 84% - 100% kolorektalnih karcinoma, 30% karcinoma želuca, 38% glioma, 64% karcinoma mokraćnog mjehura, 80% epitelnih karcinoma jajnika i testisa (60, 61). Terapijski odgovor na kemoterapiju temeljenu na platini bolji je u karcinoma sa slabim izražajem ERCC1. Primjerice, karcinomi testisa i jajnika koji najčešće imaju slabi ili negativni izražaj ERCC1, izrazito su osjetljivi na kemoterapiju temeljenu na platini (62, 63), a minimalni odgovor na tu terapiju imaju NSCLC i karcinomi glave i vrata, u kojih je jaki izražaj ERCC1 (64, 65).

1.7.2. Problematika interpretacije ERCC1

Kemoterapija temeljena na platini je standardna terapija za bolesnike s adenokarcinom pluća u uznapredovalom stadiju bolesti bez aktivacijskih mutacija i s negativnim izražajem PD-L1 u zloćudnim stanicama. U operabilnih bolesnika kemoterapija temeljena na platini se primjenjuje neoadjuvantno ili adjuvantno nakon operacijskog zahvata (35). Neželjene posljedice kemoterapije nastaju zbog neselektivnog djelovanja citostatika koji, osim učinka na tumor, djeluju i na zdrave stanice, osobito one koje se brzo dijele (54). S obzirom da u nekih bolesnika kemoterapija temeljena na platini ima slab učinak ili je bez povoljnog učinka, bilo bi važno identificirati pouzdane prediktivne čimbenike na osnovu kojih bi se mogli izdvojiti bolesnici kojima će ta terapija biti učinkovita od onih kojima neće i tako izbjeći nepotrebnu toksičnost. ERCC1 je u karcinomu pluća proučavan kao jedan od mogućih prognostičkih i prediktivnih čimbenika kemoterapije temeljene na platini, ali su rezultati dosadašnjih studija nekonzistentni. U nekoliko retrospektivnih studija i meta analiza utvrđena je povezanost jakog izražaja ERCC1 s lošom prognozom i rezistencijom na kemoterapiju temeljenoj na platini (55, 64). Nasuprot tome, u nekoliko retrospektivnih i malom broju prospektivnih studija nije utvrđena povezanost između izražaja ERCC1 i općeg preživljenja (66,67,68).

Za evaluaciju ERCC1 koriste se različite metode. ERCC1 se može analizirati imunohistokemijski i metodom molekularne genetike, odnosno lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (engl. *real time-polymerase chain reaction* - rtPCR). U jezgri postoje četiri izoforme ERCC1, 201 - 204, od kojih je samo izoforma 202 uključena u

popravak platina-DNA adukata (69). Ni jedno od komercijalnih primarnih protutijela ne omogućuje diferencijaciju između četiri izoforme ERCC1, što može pridonjeti nekonzistentnoj procjeni imunohistokemijskog izražaja ERCC1 (70). Smith i suradnici su 2014. godine analizirali protutijelo ERCC1 klon 4F9 i ocijenili ga najspecifičnijim, jer njegov izražaj u tumoru dobro korelira s rezultatima molekularne genetike (71). Osim toga, podudarnost među patolozima u subjektivoj procjeni izražaja ERCC1 nije visoka te postoje razlike u načinu određivanja vrijednosti kojom se razlučuje slabi od jakog izražaja ERCC1. Ozdermir i suradnici navode kako je nekonzistentnost ERCC1 kao prognostičkog čimbenika posljedica neujednačene metodologije kojom se određuje i preporučavaju usporedbu onih rezultata koji su dobiveni istom metodom (67). Bolje validirani postupak za procjenu statusa ERCC1 je određivanje mRNA ERCC1 u tumorskom tkivu rtPCR metodom. U prospektivnim studijama je ERCC1 mRNA najprije bio izoliran iz parafinskih blokova tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu. Formalin oštećuje mRNA, pa se uzorak kasnije počeo uzimati iz svježeg tkiva ili nakon skraćene fiksacije, kako bi se smanjio broj lažno negativnih nalaza (72). Pretkliničke i kliničke studije ukazuju da inhibicija enzima ERCC1 može spriječiti popravak DNA uzrokovan kemoterapijom temeljenoj na platini i tako poboljšati odgovor bolesnika na terapiju (73,74). Carter i suradnici, u radu iz 2018. godine, smatraju da je ERCC1 vrijedan prediktivni pokazatelj kojem važnost ne osporava pojava TKI-a i nove imunoterapijske paradigme (75). S obzirom da *ERCC1* izražava endonukleazu koja je ključna za popravak platina-DNA adukata, jaki izražaj ERCC1 u adenokarcinomu pluća bi trebao biti nepovoljan prediktivni pokazatelj kod bolesnika liječenih kemoterapijom na temelju platine.

Iz toga slijedi da bi u maloj biopsiji adenokarcinoma pluća, uz TTF-1/Napsin A i analizu *EGFR* i *ALK* statusa bilo korisno analizirati imunohistokemijski izražaj ERCC1, temeljem kojeg bi u svakodnevnoj kliničkoj praksi mogli razdvojiti bolesnike u različite prognostičke i prediktivne podskupine i time pridonijeti individualiziranoj terapiji bolesnika.

2. HIPOTEZE I CILJEVI

HIPOTEZE

1. Imunohistokemijski izražaj ERCC1 ima prognostički značaj i slab izražaj ERCC1 je povoljan prediktivni pokazatelj za liječenje kemoterapijom temeljenoj na platini.

2. Pozitivan imunohistokemijski izražaj TTF-1 i/ili Napsina A je povoljan prognostički pokazatelj.

GLAVNI CILJEVI

1. Usporediti preživljenje ispitanika s adenokarcinomom pluća liječenih kemoterapijom temeljenoj na platini u odnosu na imunohistokemijski izražaj ERCC1.
2. Istražiti mogu li se imunohistokemijski izražaj TTF-1, Napsina A i ERCC1 u uzorcima bronhoskopske biopsije adenokarcinoma pluća koristiti kao prognostički biljezi, usporedbom imunohistokemijskog izražaja TTF-1, Napsina A i ERCC1 s kliničkim pokazateljima (dob, spol, pušenje, ECOG status, stadij bolesti, veličina tumora, status limfnih čvorova i postojanje udaljenih presadnica) i preživljenjem.

SPOREDNI CILJEVI

1. Usporediti podtipove adenokarcinoma pluća (lepidički, acinarni, papilarni, solidni) s kliničkim pokazateljima (dob, spol, pušenje, ECOG status, stadij bolesti, veličina tumora, status limfnih čvorova i postojanje udaljenih presadnica), imunohistokemijskim izražajem TTF-1, Napsina A, ALK i ERCC1 i *EGFR* statusom analiziranim rtPCR metodom.
2. Usporediti povezanost mutacije *EGFR* sa svim promatranim varijablama.
3. Istražiti povezanost svih promatranih varijabli s preživljenjem.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

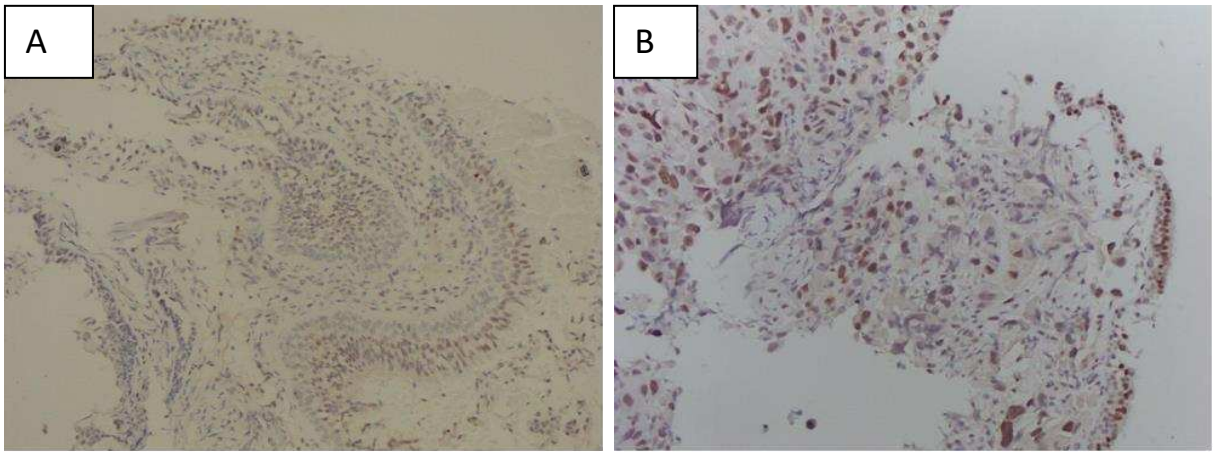
U istraživanje je uključeno 253 ispitanika s adenokarcinomom pluća čiji je bioptički materijal dobiven bronhoskopski i susljedno analiziran na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2015. godine. Ispitanici su liječeni na Odjelu za plućne bolesti KBC-a Split kemoterapijom temeljenoj na platini koja je, ovisno o stadiju bolesti i kliničkom statusu, bila kombinirana s operativnim zahvatom ili radioterapijom. Ispitanicima je dijagnoza adenokarcinoma pluća postavljena na osnovu histološke slike i imunofenotipa kad je bio: a) pozitivan izražaj CK7 i TTF-1 i/ili Napsin A, a negativan izražaj p40 i/ili CK5/6/p63, b) kad je bio pozitivno izražen CK7, negativni biljezi povezani s metastatskim karcinomom i nalazi kliničke obrade upućivali na primarni rak pluća. Podatci o kliničkom stadiju bolesti dobiveni su iz povijesti bolesti i klasificirani prema 7. kliničkoj TNM klasifikaciji (39). Iz studije su isključeni ispitanici kojima je dijagnoza postavljena transtorakalnom biopsijom, u kojih je bioptički materijal dobiven operacijom adenokarcinoma pluća ili presadnice plućnog adenokarcinoma, koji su primali samo simptomatsko-potpornu terapiju i ispitanici koji su nakon patohistološke dijagnoze nastavili liječenje u drugoj ustanovi. Također, iz studije su isključeni ispitanici s adenoskvamoznim karcinomom (TTF-1 i p40 pozitivni ili CK7 i p40/p63/iCK5/6 pozitivni). Ukupno preživljenje je praćeno od datuma bronhoskopske biopsije do datuma smrtnog ishoda, ili zaključno do 31. svibnja 2017. godine kad je određen status ispitanika (živ/mrtav).

3.2. Metode

Bojenje preparata indirektnom imunohistokemijskom metodom urađeno je u Laboratoriju za imunohistokemiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju u automatskom bojaču Ventana Ultra Benchmark (Ventana, Tuscon, Arizona). Iz parafinskih blokova izrezani su preparati debljine 5 μm, strojno priređeni za imunohistokemiju standardnim postupkom i inkubirani s monoklonskim mišjim protutijelima na TTF-1 (1:100), Napsin A (1:200) odnosno ERCC1 (4F9, spremno za upotrebu) (svi reagensi DAKO, Glostrup, Danska). Imunoreakcija je vizualizirana pomoću iView DAB detekcijskog kita (Ventana, Tuscon, Arizona). Za imunohistokemijsko testiranje ALK upotrijebljeno je kunićje monoklonsko protutijelo ALK (D5F3, Ventana, Tuscon, Arizona) i OptiVieW detekcijski amplifikacijski kit u automatskom bojaču Ultra Benchmark (Ventana, Tuscon, Arizona). Iz istog parafinskog bloka izrezan je rez debljine 15 μm za molekularnu analizu *EGFR* mutacije metodom rtPCR. Za pripremu uzoraka i izoliranje DNK korišten je Cobas Sample Preparation Kit (Roshe, Basel, Švicarska).

Molekularna analiza *EGFR* urađena je COBAS *EGFR* Mutacijskim Testom (Roche, Basel, Švicarska).

Pozitivan izražaj TTF-1 je bio smeđe nuklearno obojenje, a pozitivan izražaj Napsina A smeđe zrnato citoplazmatsko obojenje tumorskih stanica; pozitivna unutarnja kontrola za oba protutijela je bio alveolarni ili bronhiolarni epitel. Pozitivan izražaj ALK bio je smeđe zrnato citoplazmatsko obojenje citoplazme u barem jednoj tumorskoj stanici, a pozitivna vanjska kontrola stanice ganglijskog pleksusa u stijenci crvuljka. Pozitivan izražaj ERCC1 bio je smeđe nuklearno obojenje, a pozitivna unutarnja kontrola obojenje jezgara respiratornog epitela (slika 4). Procijenjen je udio ERCC1 pozitivnih zloćudnih stanica i izražen kao proporcijski skor (0 za 0%, 0,1 za 1 - 9%, 0,5 za 10 - 49% i 1,0 za ≥ 50%) i intenzitet nuklearnog obojenja stupnjevan od 0 do 3 (procijenjen prema intenzitetu obojenja respiratornog epitela koji je intenziteta obojenja 2). Umnoškom proporcijskog skora i intenziteta obojenja dobiven je semikvantitativni H skor. Medijan H skora je bio vrijednost kojom su razdvojeni adenokarcinomi s jakim izražajem ERCC1 od adenokarcinoma sa slabim izražajem ERCC1 (76). Sve originalne preparate i imunohistokemijska obojenja neovisno su analizirala dva specijalista (patolog i citolog) na mikroskopu Olympus 51BX (Olympus, Tokyo, Japan). U slučaju neslaganja, tražili su mišljenje trećeg specijaliste patologa.



Slika 4. Imunohistokemijski izražaj ERCC1 u adenokarcinomu pluća na uzorku male bronhoskopske biopsije: A) slab (≤ 0,1) i B) jak (> 0,1) (ERCC1/HRP 200x).

3.3. Statistička raščlamba

Prikupljeni podatci uneseni su u programu Microsoft Exel za Windows 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), a za izračun statističke značajnosti korišten je program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (verzija 20 za Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički, a interpretirani na razini značajnosti $P < 0,05$. Za usporedbu kategorijskih varijabli korišten je χ^2 test i test logističke regresije. Za usporedbu kvantitativnih varijabli korišten je Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney test. Coxovim regresijskim modelom je ispitan utjecaj svih istraživanih varijabli na preživljenje. Krivulje preživljenja izračunate su prema Kaplan-Meierovoj metodi, a razlike između krivulja su procjenjene log-rank testom.

3.4. Etička načela

Disertacija je sukladna sa svim primjenjivim svjetskim smjernicama i preporukama, čiji je cilj osigurati pravilno ophođenje i rukovanje s biološkim materijalima. Svi prikupljeni podatci su korišteni isključivo u istraživačke svrhe, bez navođenja bilo kakvih osobnih ili drugih podataka o bolesnicima. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (ur.br: 500–03/15/01/42) i provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

4. REZULTATI

Od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2015. godine dijagnosticirano je 316 novooboljelih od adenokarcinoma pluća na Odjelu za patologiju, Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Od toga je u 253 (80%) ispitanika dijagnoza postavljena na uzorcima male bronhoskopske biopsije i oni su uključeni u studiju. Medijan za dob u trenutku dijagnoze je bio 65 godina (min-maks: 44-91). Praćene kliničko-patološke varijable prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Raspodjela 253 ispitanika prema kliničko-patološkim varijablama

Kliničko-patološke varijable		**Ispitanici N (%)**
Dob (godine)	> 65	128 (50,6)
Spol	muški	161 (63,6)
	ženski	92 (36,4)
Pušenje	ne	15 (13,5)
	da	96 (86,5)
ECOG	0	75 (52,8)
	1	31 (21,8)
	2	17 (12)
	3	8 (5,6)
	4	11 (7,8)
Histološki podtip	lepidički	9 (3,7)
	acinarni	88 (35,9)
	papilarni	21 (8,6)
	solidni	127 (51,8)
TTF-1	negativan	35 (16,8)
	pozitivan	173 (83,2)
NAPSIN A	negativan	36 (23,2)
	pozitivan	119 (76,8)
ERCC1	≤ 0,1	68 (52,7)
	> 0,1	61 (47,3)
ALK	negativan	170 (93,9)
	pozitivan	11 (6,1)
EGFR	divlji	183 (90,1)
	mutiran	20 (9,9)
Veličina tumora (T)	1	22 (9,2)
	2	71 (29,7)
	3	69 (28,9)
	4	77 (32,2)
Limfni čvorovi (N)	negativni	59 (25)
	pozitivni	177 (75)
Udaljene metastaze (M)	ne	72 (30,6)
	da	163 (69,4)

Kliničko-patološke varijable		Ispitanici N(%)
Stadij bolesti	I	9 (3,9)
	II	28 (12)
	III	34 (14,6)
	IV	163 (69,5)
Terapija	K	142 (77,2)
	K+O	26 (14,1)
	K+R	16 (8,7)

K – kemoterapija O – operacija R – radioterapija Izražaj ERCC1 ≤ 0,1 slab/ > 0,1 jak

Većinom su ispitanici bili muškog spola (63,6%), pušači (86,5%) i dobrog ECOG statusa (52,8% ispitanika ECOG statusa 0). Od ukupno 96 pušača, 70 (72,9%) je bilo muškog spola, a među 15 nepušača, 7 (46,6%) je bilo muškog i 8 (53,4%) ženskog spola. Najzastupljeniji je bio solidni, a potom acinarni podtip adenokarcinoma. Imunohistokemijski izražaj TTF-1 i Napsina A je bio pozitivan u 83,2%, odnosno 76,8% ispitanika. Pozitivan izražaj CK 7 je nađen u 99,2% ispitanika; dva adenokarcinoma s negativnim izražajem CK7 bili su acinarnog podtipa. U 129 (50,7%) ispitanika je u parafinskom bloku bilo dovoljno tumorskog tkiva za imunohistokemijsku analizu ERCC1. Mikroskopskom analizom je izražaj ERCC1 semikvantitativno određen kao H skor. Medijan H skora ERCC1 od 0,1 (min-maks: 0-3) je određen za razlikovanje adenokarcinoma s jakim izražajem ERCC1 (ERCC1 > 0,1) od adenokarcinoma sa slabim izražajem ERCC1 (ERCC1 ≤ 0,1). Slab izražaj ERCC1 u adenokarcinomu je imalo 68 (52,7%) ispitanika. Većina ispitanika, 69,5%, dijagnosticirana je u stadiju IV bolesti. Prema prikupljenim podatcima o provedenoj terapiji za 184 ispitanika, najviše ih je liječeno samo s kemoterapijom temeljenoj na platini, 142 (77,2%), dok je kod 26 (14,1%) ispitanika kombinirana s kirurškom resekcijom tumora i kod 16 (8,7%) s radioterapijom.

Solidni podtip adenokarcinoma pluća je uspoređen s ostalim podtipovima prema kliničko-patološkim varijablama i rezultati prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Solidni prema ostalim podtipovima adenokarcinoma pluća i varijablama

Kliničko–patološke varijable		**Podtipovi adenokarcinoma**			
		Ostali N (%)	**Solidni N (%)**	χ^2	***p***
Dob (godine)	≤ 65	60 (51)	67 (53)	0,089	0.799
	> 65	58 (49)	60 (47)		
Spol	muški	64 (54)	91 (72)	7,983	**0,005**
	ženski	54 (46)	36 (28)		
Pušenje	ne	8 (17)	6 (10)	1,425	0,233
	da	37 (83)	55 (90)		
ECOG	0	33 (53)	37 (51)	0,08	0,937
	1	14 (23)	17 (23)		
	2	8 (12)	9 (12)		
	3	4 (6)	3 (4)		
	4	4 (6)	7 (10)		
TTF1	negativan	17 (18)	18 (16)	0,122	0,727
	pozitivan	78 (82)	94 (84)		
Napsin A	negativan	13 (20)	23 (26)	0,574	0,449
	pozitivan	51 (80)	67 (74)		
ERCC1	≤ 0,1	32 (53)	33 (52)	0,039	0,859
	> 0,1	28 (47)	31 (48)		
ALK	negativan	80 (92)	87 (97)	1,843	0,175
	pozitivan	7 (8)	3 (3)		
EGFR	divlji	93 (90)	83 (90)	0,000	0,986
	mutiran	10 (10)	9 (10)		
ALK	negativan	80 (92)	87 (97)	1,843	0,175
	pozitivan	7 (8)	3 (3)		
Stadij bolesti	I	5 (5)	3 (3)	3,233	0,357
	II	14 (13)	13 (11)		
	III	11 (10)	21 (17)		
	IV	77 (72)	81 (69)		
T	1	12 (11)	8 (7)	2,023	0,568
	2	35 (31)	34 (29)		
	3	33 (29)	33 (28)		
	4	33 (29)	43 (36)		
N	negativni	30 (27)	27 (23)	0,474	0,491
	pozitivni	81(73)	90 (77)		
M	ne	30 (44)	38 (32)	0,466	0,495
	da	38 (56)	81 (68)		

Utvrđena je statistički značajna razlika između solidnog i ostalih podtipova adenokarcinoma pluća samo prema spolu, jer je u solidnom podtipu udio muškog spola bio za 1,3 puta veći nego u ostalim podtipovima, a udio ženskog spola za 1,6 puta manji nego u ostalim podtipovima (χ^2 =7,983; p<0,05). Nije nađena razlika između solidnog podtipa i ostalih

podtipova prema ECOG statusu ni kad je ECOG status grupiran u tri skupine kao 0 : 1 : (2 +3 + 4), ni prema stadijima bolesti kad su grupirani u tri skupine kao (I + II) : III : IV (χ^2=0,065; p=0,996, odnosno χ^2=2,953; p=0,228).

Analizirana je povezanost imunohistokemijskog izražaja TTF-1 u tumoru s praćenim kliničko-patološkim varijablama i rezultati prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Izražaj TTF-1 prema kliničko - patološkim varijablama

Kliničko - patološke varijable		**TTF-1**			
		negativan N (%)	**pozitivan N (%)**	**χ^2**	***p***
Dob (godine)	≤ 65	17 (49)	85 (49)	0,004	0,952
	> 65	18 (51)	88 (51)		
Spol	muški	22 (63)	104 (60)	0.092	0,762
	ženski	104 (37)	69 (40)		
Pušenje	ne	1 (8)	13 (16)	0.487	0,845
	da	11 (92)	68 (84)		
ECOG*	0	9 (45)	51 (52)	3.082	0,544
	1	4 (20)	24 (25)		
	2	4 (20)	9 (9)		
	3	2 (10)	5 (5)		
	4	1 (5)	9 (9)		
ALK	negativan	25 (96)	121(93)	0.342	0,559
	pozitivan	1 (4)	9 (7)		
T	1	2 (6)	13 (8)	5.684	0.128
	2	5 (16)	57 (34)		
	3	10 (31)	46 (28)		
	4	15 (47)	49 (30)		
N	negativni	5 (15)	47 (29)	2.752	0,097
	pozitivni	28 (85)	114 (71)		
M	ne	5 (15)	53 (33)	4.125	**0,042**
	da	28 (85)	108 (67)		
Stadij bolesti**	I	1 (3)	7 (5)	1.854	0,396
	II	2 (6)	23 (14)		
	III	2 (6)	23 (14)		
	IV	28 (85)	108 (67)		

*Grupiran ECOG 0 : 1 : (2 + 3 + 4) ** Grupirani stadiji bolesti (I + II) : III : IV

Utvrđena je statistički značajna povezanost negativanog izražaja TTF-1 s postojanjem udaljenih presadnica (p=0,042).

Analizirana je povezanost imunohistokemijskog izražaja Napsina A u tumoru s praćenim kliničko-patološkim varijablama i rezultati prikazani u tablici 9.

Tablica 9. Izražaj Napsina A prema praćenim kliničko-patološkim varijablama

Kliničko–patološke varijable		**Napsin A**			
		negativan N (%)	**pozitivan N (%)**	χ^2	***p***
Dob (godine)	≤ 65	15 (42)	61 (51)	1.018	0.313
	> 65	21 (58)	58 (49)		
Spol	muški	25 (69)	76 (64)	0.379	0.538
	ženski	11 (31)	43 (36)		
Pušenje	ne	0 (0)	11 (19)	2.309	0.129
	da	10 (100)	46 (81)		
ECOG*	0	6 (34)	37 (52)		
	1	3 (18)	21 (29)	5.657	0.059
	2	4 (24)	6 (8)		
	3	2 (12)	3 (4)		
	4	2 (12)	5 (7)		
TTF-1	negativan	18 (53)	8 (7)	38.904	**<0.001**
	pozitivan	16 (47)	108 (93)		
ALK	negativan	28 (100)	84 (91)	2.609	0.106
	pozitivan	0 (0)	8 (9)		
T	1	1 (3)	6 (5)	9.469	**0.024**
	2	4 (12)	40 (35)		
	3	11 (32)	33 (30)		
	4	18 (53)	33 (30)		
N	negativni	5 (14)	33 (30)	3.757	0.053
	pozitivni	31 (86)	76 (70)		
M	ne	6 (17)	40 (37)	5.013	**0.025**
	da	30 (83)	69 (63)		
Stadij bolesti**	I	0 (0)	6 (6)		
	II	3 (8)	15 (14)	5.021	0.081
	III	3 (8)	19 (17)		
	IV	30 (84)	69 (63)		

*Grupiran ECOG 0 : 1 : (2 + 3 + 4) **Grupirani stadiji bolesti (I + II) : III : IV

Utvrđena je značajna povezanost izražaja Napsina A i TTF-1, koji su bili koeksprimirani u 93% slučajeva (p<0,001). Negativan izražaj Napsina A je bio značajno povezan s većim tumorom (p=0,024) i prisutnošću udaljenih presadnica (p=0,025). Utvrđena je granična povezanost negativnog izražaja Napsina A s pozitivnim limfnim čvorovima (p=0,053).

Izražaj ERCC1 je procijenjen na temelju medijana H skora od 0,1 (min-maks: 0-3) kao slabi (ERCC1 ≤0,1) ili jaki (ERCC1 >0,1) i uspoređen s praćenim kliničko-patološkim varijablama (tablica 10).

Tablica 10. Izražaj ERCC1 prema kliničko-patološkim varijablama

Kliničko–patološke varijable		Izražaj ERCC1		χ^2	*p*
		≤ 0,1 N (%)	**> 0,1** N (%)		
Dob (godine)	≤ 65	36 (53)	32 (52)	0,003	1,000
	> 65	32 (47)	29 (48)		
Spol	muški	44 (65)	42 (69)	0,249	0,378
	ženski	24 (35)	19 (31)		
Pušenje	ne	6 (18)	7(18)		0,589
	da	28 (82)	31 (82)	0,007	
ECOG*	0	25 (61)	16 (36)	9,498	**0,023**
	1	10 (24)	9 (21)		
	2	4 (10)	8 (18)		
	3	2 (5)	3 (7)		
	4	0 (0)	8 (18)		
Histološki podtip	ostali	32 (49)	28 (47)	0,039	0,844
	solidni	33 (51)	31 (53)		
TTF1	negativan	6 (11)	9 (17)	0,832	0,414
	pozitivan	49 (89)	44 (83)		
NAPSIN A	negativan	4 (11)	13 (30)	4,488	0,054
	pozitivan	34 (89)	31 (70)		
ALK	negativan	49 (98)	48 (94)	1,001	0,617
	pozitivan	1 (2)	3 (6)		
EGFR	divlji	51 (85)	49 (94)	2,481	0,137
	mutiran	9 (15)	3 (6)		
T	1	10 (15)	2 (3)	15,325	**0,002**
	2	25 (37)	14 (23)		
	3	18 (27)	13 (22)		
	4	14(21)	31 (52)		
N	pozitivni	47 (69)	54 (92)	9,742	**0.001**
M	da	48 (71)	55 (90)	7,657	**0,005**
Stadij bolesti**	I	2 (3)	0 (0)	7,690	**0,021**
	II	7 (10)	3 (5)		
	III	11 (16)	3 (5)		
	IV	48 (71)	55 (90)		

* Grupirani ECOG: 0 : 1 : 2 : (3 + 4) **Grupirani stadiji bolesti: (I + II) : III : IV

Jak izražaj ERCC1 je bio povezan s većim tumorom (p=0,002), pozitivnim limfnim čvorovima (p=0,001), prisutnim udaljenim presadnicama (p=0,005) i lošijim ECOG statusom (p=0,023). Nađena je granična povezanost negativnog izražaja Napsina A s jakim izražajem ERCC1 (p=0,054). Kad su stadiji bolesti grupani u tri skupine, na način da su stadij I i II kao jedna skupina bili uspoređeni s ostalim stadijima s obzirom na izražaj ERCC1, dokazana je

značajna razlika izražaja ERCC1 u odnosu na stadij bolesti (p=0,021). Ispitanici sa većim stadijem bolesti imali su značajno češće jak izražaj ERCC1.

Mutacija ALK nađena je u u 6,1% ispitanika.

Testiranje tumora na *EGFR* mutaciju urađeno je u 203 ispitanika i mutacija je utvrđena u 20 (9,9%) slučajeva. U 15 (75%) slučajeva radilo se o deleciji na eksonu 19 (19 del), u 4 (20%) slučaja o supstitucijskoj mutaciji exona 21 (L858R) i u jednom slučaju o mutaciji exona 18 (G719X). U tablici 11 prikazana je povezanost *EGFR* statusa s praćenim kliničko-patološkim varijablama. *EGFR* mutacija je nađena češće u ženskog spola (p=0,045), u nepušača (p=0,001) i starijih od 65 godina (p=0,041). Izgled za postojanje mutacije *EGFR* gena u odnosu na divlji tip je 2,8 puta (95%CI:1,1-7,3; p=0,029) veći u žena u odnosu na muškarce, za 3,1 puta (95%CI:1,1-8,3; p=0,028) veći u ispitanika starijih od 65 godina i za 17,5 puta (95%CI:3,2-100; p=0,021) veći u nepušača nego u pušača.
Svi tumori s *EGFR* mutacijom su bili negativni na ALK mutaciju.

Tablica 11. Povezanost statusa *EGFR* s kliničko-patološkim varijablama

Kliničko–patološke varijable		**Divlji EGFR N(%)**	**Mutirani EGFR N(%)**	χ^2	***P***	**OR**	**95%CI**	***p***
Dob (godine)	≤ 65	104 (57)	6 (30)	4.193	0.041	3,1	1,1-8,3	**0.028**
	> 65	79 (43)	14 (70)					
Spol	muški	120 (66)	8 (40)	4,005	0.045	2,8	1,1-7,3	**0.029**
	ženski	63 (34)	12 (60)					
Pušenje	ne	6 (7)	4 (36)	11.945	0.001	17,5	3,2-100	**0.021**
	da	79 (93)	7 (64)					
ECOG*	0	57 (54)	6 (55)	0.147	0.929			
	1	25 (24)	3 (27)					
	2	11 (10)	2 (18)					
	3	7 (6)	0 (0)					
	4	6 (6)	0 (0)					
TTF-1	negativni	26 (17)	1 (6)	1.354	0.245			
	pozitivni	130 (83)	16 (94)					
NAPSIN A	negativni	26 (23)	2 (17)	0.223	0.637			
	pozitivni	89 (77)	10 (83)					
ALK	n	132 (93)	15(100)	1.128	0.288			
	pozitivan	10 (7)	0 (0)					
T	1	15 (9)	4 (21)	5.400	0.145			
	2	55 (31)	5 (26)					
	3	46 (26)	7 (37)					
	4	60 (34)	3 (16)					
N	negativni	43 (25)	5 (26)	0.019	0.889			
	pozitivni	130 (75)	14 (74)					
M	negativni	51 (30)	5 (28)	0.023	0.880			
	pozitivni	122 (70)	13 (72)					
Stadij bolesti**	I	5 (3)	1 (6)	0.410	0.815			
	II	23 (13)	1 (6)					
	III	23 (13)	3 (16)					
	IV	122 (71)	13 (72)					

*Grupirani ECOG: 0 : 1 : (2 + 3 + 4) **Grupirani stadiji bolesti (I + II) : III : IV

Univarijantnom Coxovom regresijskom metodom analiziran je rizik od smrtnog ishoda za praćene kliničko-patološke varijable (tablica 12).

Tablica 12. Prikaz rezultata Coxove regresijske analize za smrtni ishod

Kliničko–patološke varijable		**HR**	**95% CI**	***p***
Dob (godine)	≤ 65	1,063	0,797-1,417	0,678
Spol	muški	0,803	0,594 – 1,086	0,154
Pušenje	da	1,110	0,573 – 2,153	0,757
ECOG	0 - 4	1,684	1,450 – 1,956	**<0,001**
Podtip adenokarcinoma*	lepidički	1,272	0,950 – 1,704	0,105
	acinarni			
	papilarni			
	solidni			
TTF1	negativan	0,557	0,377 – 0,823	**0,003**
Napsin A	negativan	0,475	0, 318 – 0,708	**<0,001**
ERCC1	≤ 0,1	6,478	4,035-10,401	**<0,001**
	> 0,1			
ALK	pozitivan	0,515	0,227 – 1,170	0,113
EGFR	mutiran	0,693	0,384 – 1,252	0,225
T	1 - 4	1,762	1,484 – 2,091	**<0,001**
N	pozitivan	4,132	2,660 – 6,418	**<0,001**
M	pozitivan	3,498	2,391 – 5,118	**<0,001**
Stadij bolesti**	I+II	2,176	1,714 – 2,764	**<0,001**
	III			
	IV			

*Grupirani podtipovi: solidni prema ostalim podtipovima ** Grupirani stadiji: (I+II):III:IV
Izražaj ERCC1 ≤ 0,1 slab/> 0,1 jak

Pogoršanjem kliničkog statusa ispitanika izraženim prema ECOG- u, povećavao se u svakoj kategoriji za 1,68 puta rizik od smrtnog ishoda (p<0,001). U slučaju negativnog izražaja TTF-1 i Napsina A, rizik od smrtnog ishoda je bio za 0,55, odnosno za 0,47 puta veći u usporedbi s ispitanicima s pozitivnim izražajem TTF-1 (p=0,003), odnosno Napsina A (p<0,001). Rizik od smrtnog ishoda je rastao sa svakim povećanjem veličine tumora za 1,76 puta (p<0,001), s pozitivnim limfnim čvorovima za 4,13 puta (p<0,001), s udaljenim presadnicama za 3,49 puta (p<0,001) i sa svakim porastom stadija bolesti za 2,17 puta (p<0,001). Rizik od smrtnog ishoda je bio za 6,47 puta veći u ispitanika s jakim izražajem ERCC1 u odnosu na ispitanike sa slabim izražajem ERCC1 (p<0,001).

Multiplom Coxovom regresijskom analizom prilagođenoj značajnim prognostičkim čimbenicima za preživljavanje, utvrđeno je da su dvije nezavisne prognostičke varijable koje utječu na kraće preživljenje ispitanika loš klinički status izražen prema ECOG - u (HR:4,425; 95%CI:1,891-10,353; *p*=0,008) i jaki izražaj ERCC1 (HR:5,126; 95%CI:2,594-10,130; *p*<0,001).

Razdoblje praćenja je bilo od 01. siječnja 2013. do 31. svibnja 2017. godine. Tijekom 53 mjeseca praćenja umrlo je 186 (73,51%) ispitanika. Prosječno ukupno preživljenje je bilo 19,8 mjeseci (SE:1,2)(95%CI:17-22), a medijan preživljenja 10 mjeseci (SE:1,9)(95%CI:6-14). Ukupno preživljenje je analizirano s obzirom na praćene kliničko-patološke varijable i prikazano u mjesecima (tablica 13).

Tablica 13. Prosjek i medijan preživljenja ispitanika s adenokarcinomom pluća prema praćenim kliničko-patološkim varijablama prikazani u mjesecima

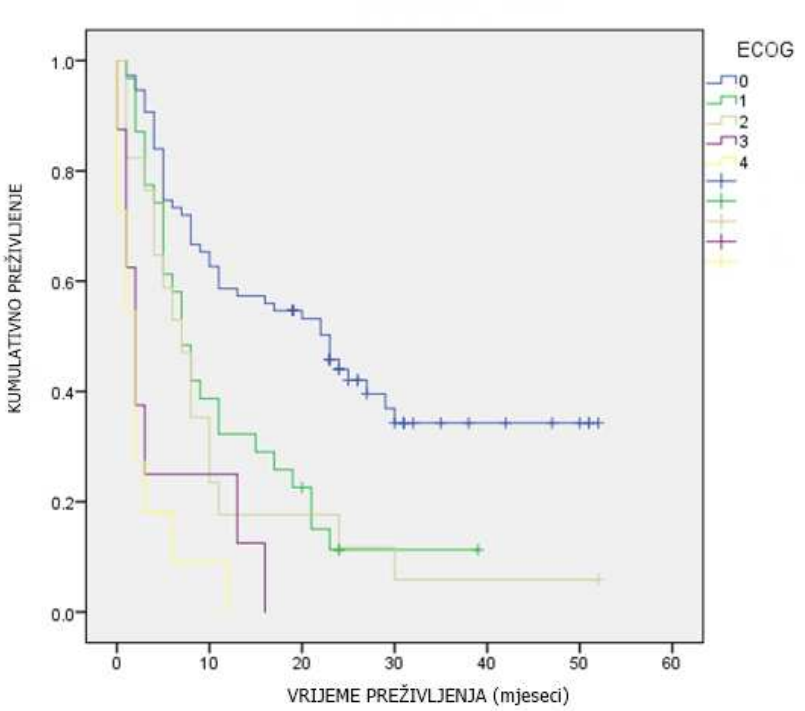
Kliničk–patološke varijable		**Prosjek preživljenja (SE);95%CI**	**Medijan preživljenja (SE);95%CI**	**LR**	***p***
Dob godine	≤ 65	20,109(1,762);15,656-23,561	10,00(0,972);8,095– 11,905	0,181	0,670
	> 65	19,331(1,711);15,977-22,684	10,00 (3,232);3,664-16,336		
Spol	muški	18,443(1,529);15,445-21,440	9 (1,002);7,037-10,963	2,150	0,143
	ženski	22,04(2,049);18,044-26,055	17 (3,972);9,215-24,785		
Pušenje	da	17,4 (1,935);13,607-21,193	8 (1,224);5,600-10,400	0,102	0,750
	ne	15,116 ;(8,760-21.471)	16 (10,797);0-37,163		
ECOG	0	25,916(2,468);21,079-30,754	23 (3,910);15,336-30,664	62,106	**<0,001**
	1	12,172(2,073);8,109-16,235	7 (1,113)4;819-9,181		
	2	10,882(3,096);4,815-16,950	7 (1,543);3,975-10,025		
	3	4,750 (2,169)0,498-9,002	2 (0,685);0,658-3,342		
	4	2,36 (1,073);0,534-4,739	2 (0,591);0,842-3,158		
Podtip	1	35,690(6,775);22,410-48,970	39 (-)	5,884	0,117
	2	20,945(2,076);16,876-25,015	11 (2,985);5,150-16,850		
	3	19,72 (4,339)10,768-27,777	8 (2,289);3,514-12,486		
	4	16,984(1,602);13,843-20,124	9 (1,127);6,791-11,209		
TTF-1	negativan	11,214(2,218);6,867-15,562	7 (1,314);4,24-9,76	9,392	**0,002**
	pozitivan	20,699(1,50);17,759-23,638	12 (2,287);7,517-16,83		
Napsin A	negativan	9,667 (1,728);6.28-13,053	5 (2);1,080-8,920	14,812	**<0,001**
	pozitivan	21,527(1,856);17,889-25.1564	13 (3,116);6,893-19,107		

Kliničko-patološke varijable		Prosjek preživljenja (SE);95%CI	Medijan preživljenja (SE);95%CI	LR	*p*
ERCC1	≤ 0,1	30,793(2,543)25,810-35,777	25 (4,594);15,996-34,004	78,710	**<0,001**
	> 0,1	5,951 (0,696);4,586-7,316	5 (0,441);4,135-5,865		
ALK	negativan	17,472(1,415);14,699-20,245	8 (0,889);6,258-9,742	1,570	0,210
	pozitivan	28,800(6,345);16,365-41,235	25 (6,964);11,352-38,648		
EGFR	divlji	19,14(1,418);16,336-21,893	10 (0,966);8,07-11,893	1,570	0,210
	mutiran	24,79(4,725);15,019-33,539	24 (4,863);14,469-33,531		
T	1	32,709(4,702)23,494-41,924	.	52,961	**<0,001**
	2	28,521(2,419);23,779-33,262	23 (3,512); 16,116-29,884		
	3	19,520(2,272);15,068-23,973	10 (2,371);2,371-5,353		
	4	9,240 (1,201);6,886-11,595	5 (0,625);3,774-6,226		
N	negativni	36,468(2,402);31,761-41,175	45 (9,468);26,443-63,557	48,562	**<0,001**
	pozitivni	14,706(1,311);12,13,7-17,275	7 (0,739);5,552-8,448		
M	ne	33,370(2,201);29,057-37,683	32 (5,4);21,416-42,84	48,784	**<0,001**
	da	13,819(1,348);11,178-16,461	7 (0,734);5,561-8,439		
Stadij bolesti*	I+II	39,355(2,654);34,154-44,556	39 (7,649);24,009-53,991	50,830	**<0,001**
	III	25,660(3,171);19,444-31,876	23 (3,312);16,08-29,492		
	IV	13,861 (1,355)	7 (0,762)		

*Grupirani stadiji bolesti: (I + II) : III : IV

Nije nađena statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju ispitanika s obzirom na histološki podtip adenokarcinoma (p=0,117), ni kad je solidni podtip uspoređen s ostalim podtipovima (χ^2=2,783, p=0,095).

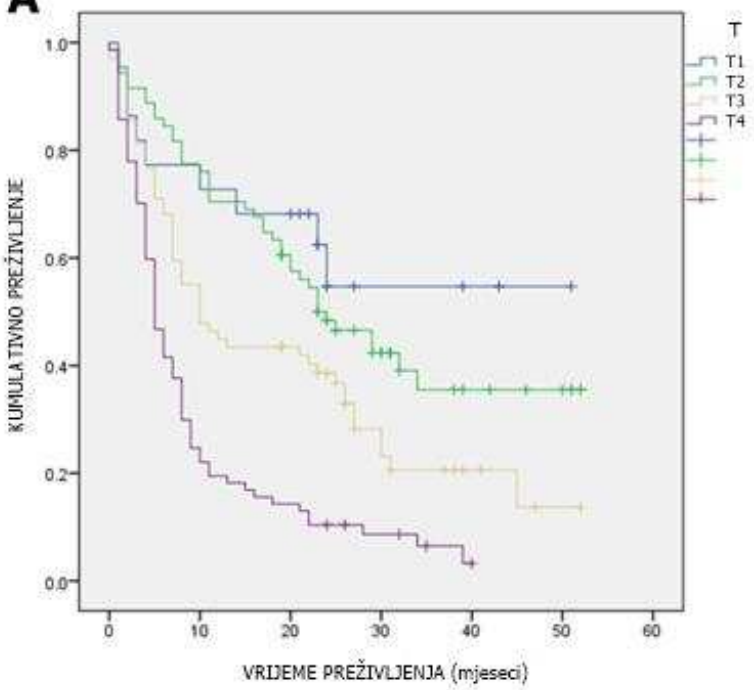
Ukupno preživljenje je bilo statistički značajno povezano s kliničkim statusom izraženim prema ECOG-u (p<0,001). Ispitanici ECOG statusa 0 živjeli su 11,5 puta dulje u odnosu na ispitanike ECOG statusa 4 (slika 5).



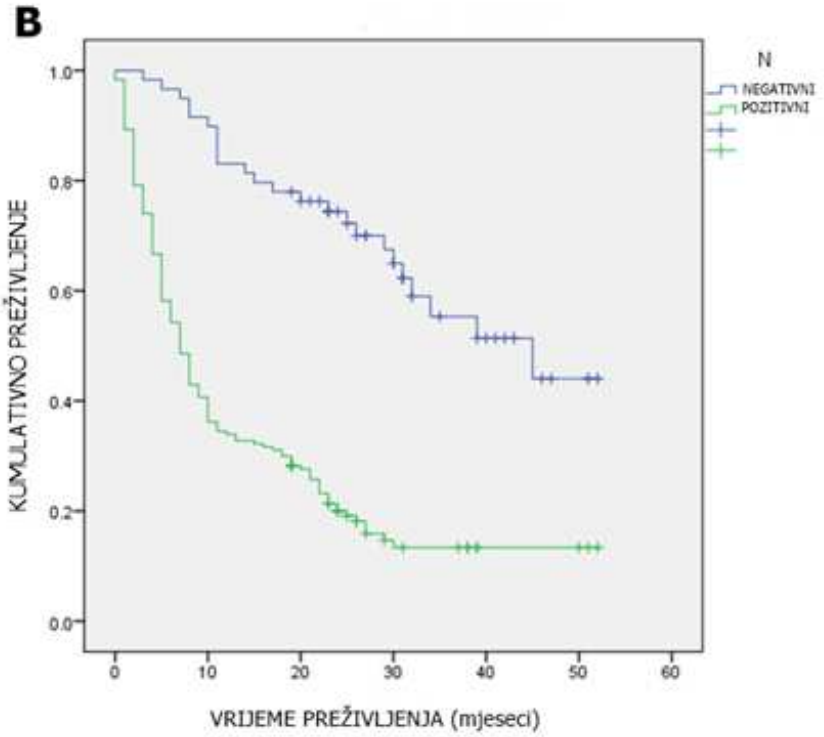
Slika 5. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema ECOG statusu.

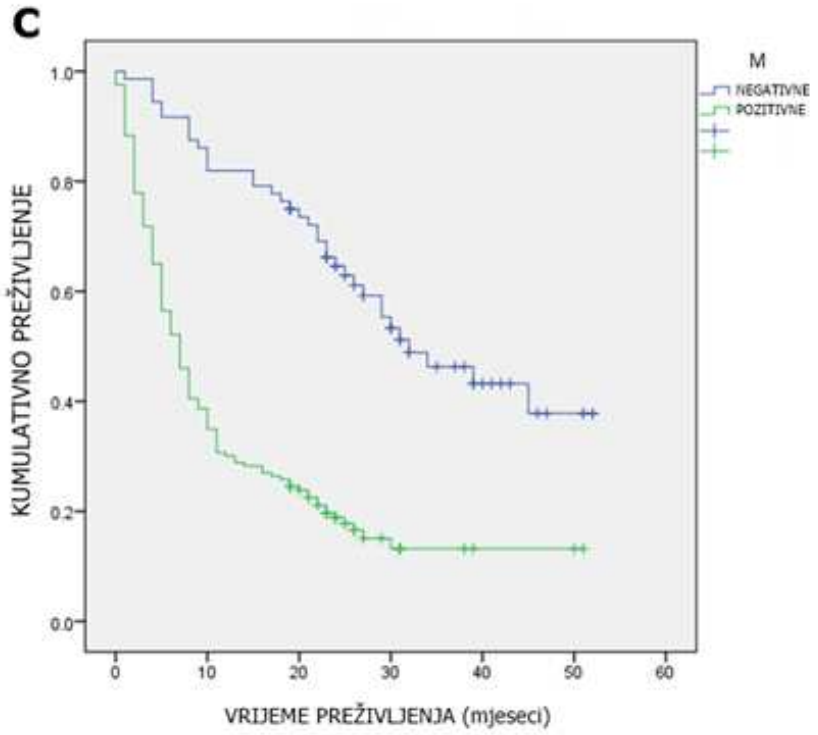
Utvrđena je značajna razlika u ukupnom preživljenju prema veličini tumora ($p<0,001$), statusu limfnih čvorova ($p<0,001$) i prisutnosti udaljenih presadnica ($p<0,001$) (slika 6 A, B i C). Ukupno preživljenje je bilo 3,5 puta dulje u ispitanika s tumorom manjim od tri cm (T1) u odnosu na ispitanike s tumorom karakteristika T4, 6,4 puta dulje u ispitanika bez pozitivnih limfnih čvorova u odnosu na ispitanike s pozitivnim limfnim čvorovima, kao i 4,5 puta dulje u ispitanika bez udaljenih metastaza u odnosu na ispitanike s prisutnim udaljenim metastazama.

A


T
T1
T2
T3
T4
KUMULATIVNO PREŽIVLJENJE
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
10
20
30
40
50
60
VRIJEME PREŽIVLJENJA (mjeseci)

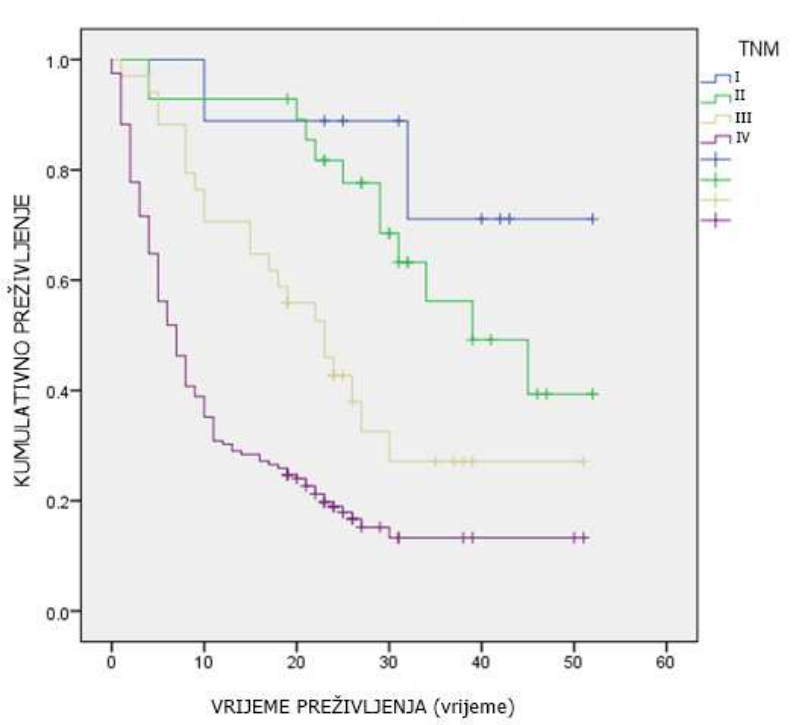
B


N
NEGATIVNI
POZITIVNI
KUMULATIVNO PREŽIVLJENJE
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
10
20
30
40
50
60
VRIJEME PREŽIVLJENJA (mjeseci)



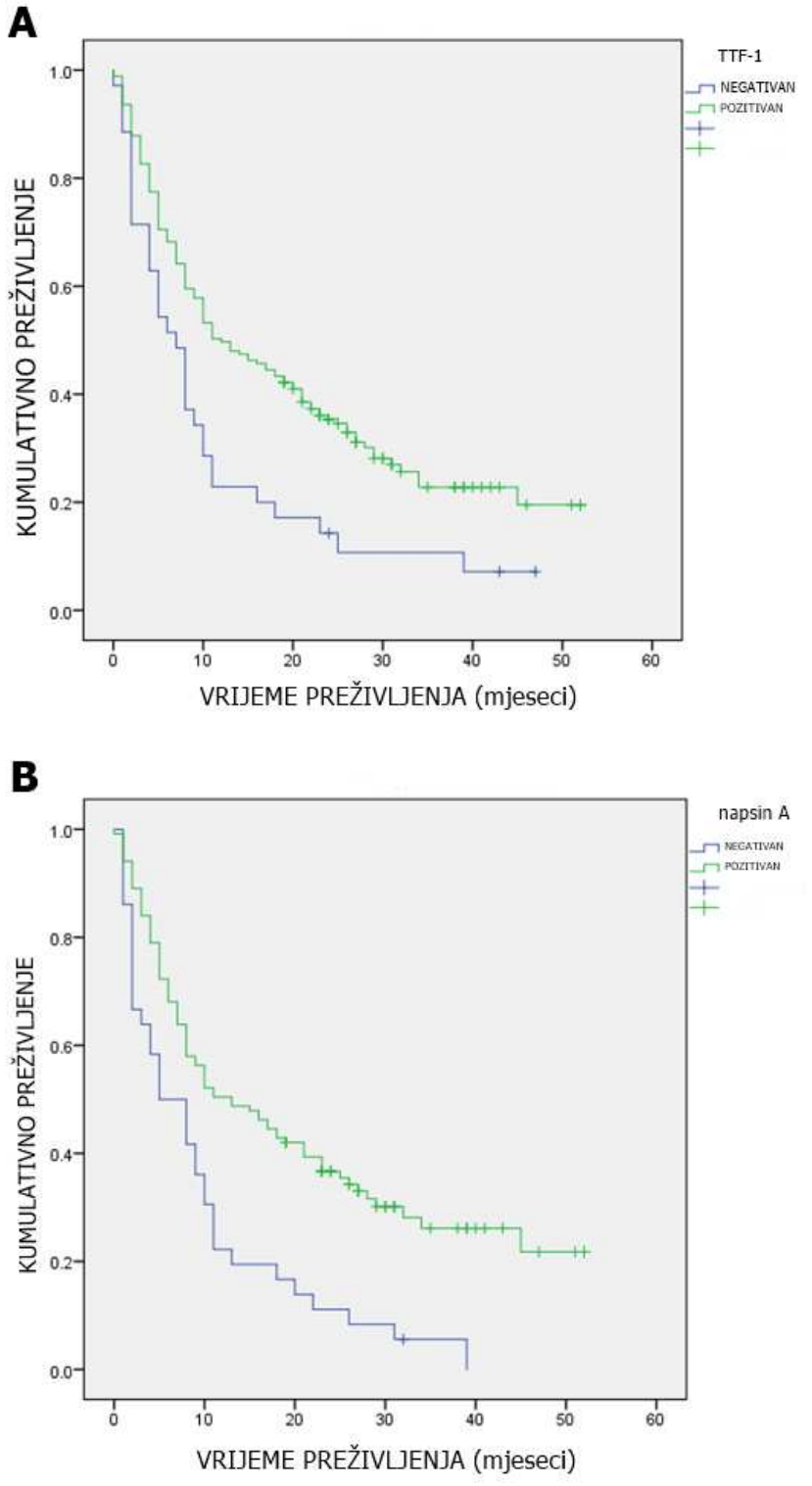
Slika 6. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema: A) veličini tumora (T), B) statusu limfnih čvorova (N) i C) prisutnosti udaljenih metastaza (M).

Utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju prema stadijima bolesti (slika 7). Ukupno preživljenje je bilo 1,69 puta dulje u skupini ispitanika grupiranog stadija bolesti I i II u odnosu na ispitanike stadija III, odnosno 5,57 puta dulje u odnosu na ispitanike stadija IV.



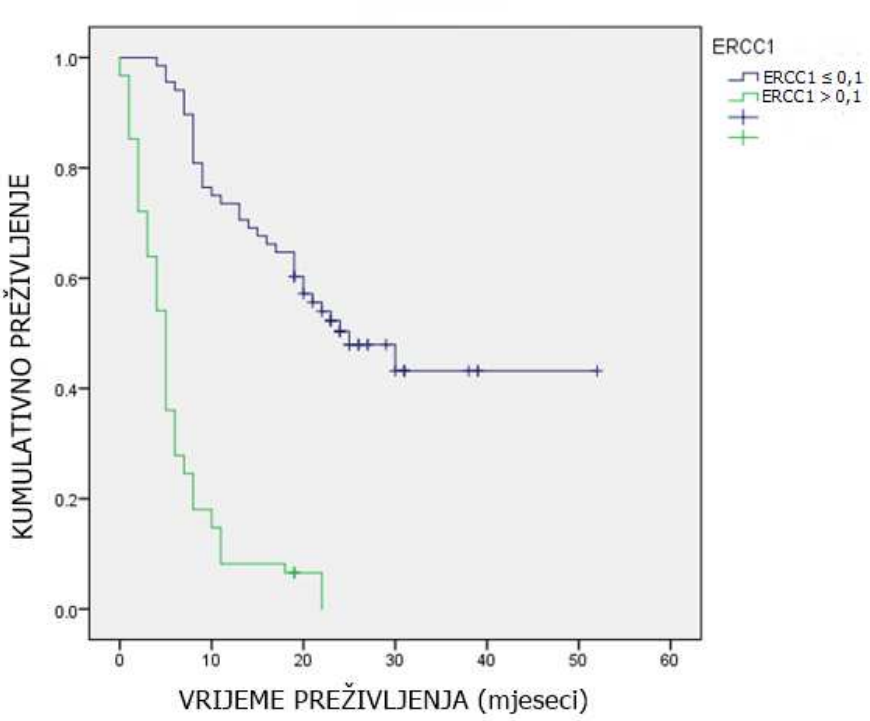
Slika 7. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema stadijima bolesti.

Utvrđena je značajna razlika u ukupnom preživljenju u odnosu na izražaj TTF-1 i Napsina A u tumoru ($p=0,002$, odnosno $p<0,001$) (slika 8 A i B). Ukupno preživljenje ispitanika s pozitivnim izražajem TTF-1 je bilo 1,71 puta dulje u odnosu na ispitanike s negativnim izražajem TTF-1, i 2,6 puta dulje u ispitanika s pozitivnim izražajem Napsina A u tumoru u odnosu na ispitanike s negativnim izražajem Napsina A.



Slika 8. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema izražaju TTF-1 (A) i Napsina A (B).

Utvrđena je statistički značajna povezanost između izražaja ERCC1 i ukupnog preživljenja. Na slici 9 prikazana je razlika u ukupnom preživljenju ispitanika s adenokarcinomom pluća s obzirom na slab ili jak izražaj ERCC1 u tumoru. Preživljenje je bilo 5 puta dulje u ispitanika sa slabim izražajem ERCC1 u odnosu na ispitanike s jakim tumorskim izražajem ERCC1 (25 mjeseci prema 5 mjeseci; $p<0,001$).



Slika 9. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema izražaju ERCC1 (≤ 0,1 slab/> 0,1 jak)

Svi ispitanici su liječeni kemoterapijom temeljenoj na platini koja je ovisno o stadiju bolesti i kliničkom statusu primijenjena sama ili u kombinaciji s operativnim zahvatom ili radioterapijom.

U tablici 14 je prikazan prosjek i medijan preživljenja ispitanika s adenokarcinomom pluća u različitim stadijima bolesti liječenih različitim terapijskim modalitetima, prema izražaju ERCC1 u tumoru.

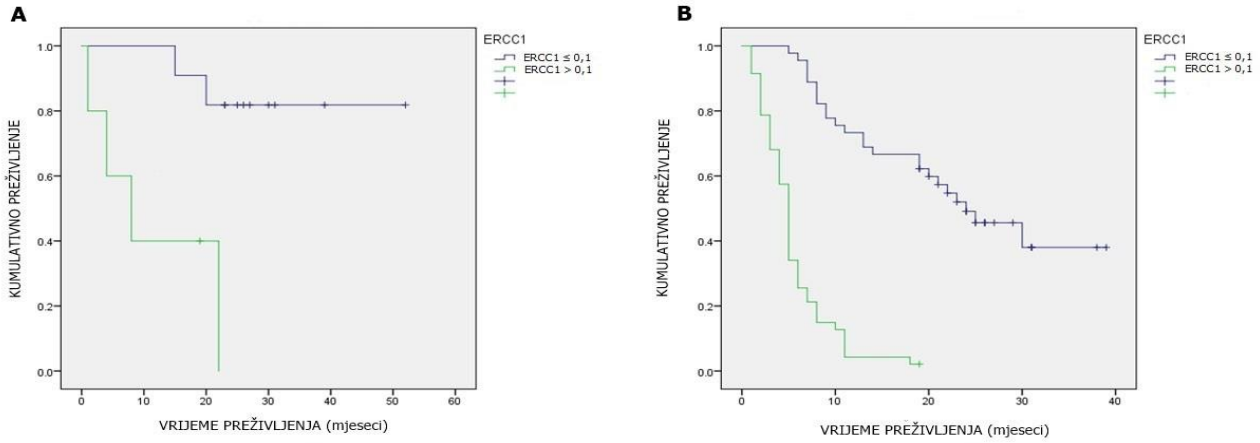
Tablica 14. Prosjek i medijan ukupnog preživljenja ispitanika s adenokarcinomom pluća u različitim stadijima bolesti liječenih različitim terapijskim modalitetima, prema izražaju ERCC1 u tumoru.

Stadij bolesti	**Terapija**	**ERCC1**	**Prosjek preživljenja (SE);95%CI mj.**	**Medijan preživljenja (SE);95%CI mj.**	**LR**	***p***
I-II-III N=27 (21%)	K+O ili K+R	≤ 0,1	45,727 (4,025) 37,838-53,616		9,290	**0,001**
		> 0,1	11,400 (4,614) 2,356-20,444	8 (4,382) 0-18,588		
IV N=102 (79%)	K	≤ 0,1	24,719 (2,034) 20,732-28,705	24 (3,607) 16,931-31,069	65,412	**<0,001**
		> 0,1	5,511 (0,564) 4,404-6,617	5 (0,295) 4,421-5,572		

K - kemoterapija O – operacija R – radioterapija Izražaj ERCC1 ≤ 0,1 slab/ > 0,1 jak

U skupini od 27 ispitanika stadija bolesti I-II-III koji su liječeni kemoterapijom temeljenoj na platini kombiniranom s operacijom ili radioterapijom, utvrđena je statistički značajna povezanost ukupnog preživljenja s izražajem ERCC1 (p=0,001) (slika 10A). Ukupno preživljenje je bilo 4,09 puta dulje u skupini od osam (29,6%) ispitanika sa slabim izražajem ERCC1 u odnosu na ispitanike s jakim tumorskim izražajem ERCC1 (45 mjeseci prema 11 mjeseci).

Od 102 ispitanika sa stadijem bolesti IV, liječenih samo kemoterapijom temeljenoj na platini, slab izražaj ERCC1 nađen je u 45 (44,12%) slučajeva. Utvrđena je statistički značajna povezanost ukupnog preživljenja s izražajem ERCC1 u tumoru (p<0,001) (slika 10B). Ukupno preživljenje je bilo 4,8 puta dulje u skupini ispitanika sa slabim izražajem ERCC1 u odnosu na ispitanike s jakim tumorskim izražajem ERCC1 (24 mjeseca prema 5 mjeseci).



Slika 10. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema izražaju ERCC1 (≤0,1 slab/>0,1 jak) u adenokarcinomu pluća u ispitanika u različitim stadijima bolesti i liječenih različitim terapijskim modalitetima. A) Ispitanici stadija bolesti I-II-III liječeni kemoterapijom temeljenoj na platini kombiniranoj s operacijom ili radioterapijom. B) Ispitanici stadija bolesti IV liječeni samo kemoterapijom temeljenoj na platini.

5. RASPRAVA

Kemoterapija temeljena na platini je zlatni standard u sistemskoj terapiji mnogih proširenih zloćudnih tumora pa tako i adenokarcinoma pluća. Posljednjih godina je u bolesnika s adenokarcinomom pluća koji imaju aktivirajuće mutacije ili odgovarajuće visok PD-L1 izražaj, kemoterapija zamijenjena novim i znatno uspješnijim terapijama - ciljanom terapijom specifičnim tirozin kinaznim inhibitorima ili imunoterapijom (35). Kriterij za takvo liječenje ispunjava manje od 50 % bolesnika, a preostali bolesnici, s adenokarcinom pluća bez aktivirajućih mutacija i s negativnim tumorskim izražajem PD-L1 liječe se kemoterapijom temeljenoj na platini. Učinak kemoterapije temeljene na platini nije podjednako dobar u svih bolesnika, što je s vremenom potaknulo istraživanje mogućih prediktivnih čimbenika u tumoru (77). Najbolje validiran čimbenik je endonukleaza ERCC1 iz NER sustava popravljača DNA, aktivna u izrezivanju platina-DNA adukata nastalih djelovanjem platine (78). S obzirom na taj mehanizam popravka DNA, može se pretpostaviti da je visoki izražaj i aktivnost ERCC1 u tumoru nepovoljan prediktivni pokazatelj, jer popravkom DNA omogućava daljnji rast tumora (79). U brojnim studijama su analizirani imunohistokemijski izražaj ERCC1 ili razina ERCC1 mRNA u tumoru i uspoređeni s kliničko-patološkim pokazateljima, ali rezultati nisu suglasni i ostalo je otvoreno pitanje vrijednosti ERCC1 kao prediktivnog čimbenika (55-57, 64, 66-68).

U našoj studiji, na uzorku iz jedne institucije, istražili smo prognostički i prediktivni značaj imunohistokemijskog izražaja ERCC1 u ispitanika s adenokarcinom pluća. Svi ispitanici su bili liječeni kemoterapijom temeljenoj na platini, koja je u ispitanika u stadiju bolesti IV bila samostalna, a u ispitanika u ranijim stadijima bolesti kombinirana s operativnim zahvatom ili radioterapijom. Iako je ispitanicima bio testiran *ALK i EGFR* status, nisu liječeni TKI-ima, jer u vrijeme našeg istraživanja (2013. - 2015. godine) nisu bili na listi odobrenih lijekova u RH, kao ni imunoterapija.

U istraživanje je uključeno 253 ispitanika kojima je bronhoskopskom biopsijom bio susljedno dijagnosticiran adenokarcinom pluća u razdoblju od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2015. godine i liječeni su na Odjelu za plućne bolesti KBC-a Split. Unatoč pokušajima ranog otkrivanja raka pluća, 70% slučajeva se dijagnosticira u proširenom stadiju bolesti kad su kirurške mogućnosti ograničene pa je mala plućna biopsija najčešći jedini uzorak za patološku i molekularnu genetsku analizu (11). S toga smo u istraživanje uključili ispitanike kod kojih je uzorak karcinoma pluća dobiven najčešćom metodom uzorkovanja tumorskog tkiva – biopsijom tijekom bronhoskopije. Naši rezultati su u skladu podatcima iz literature (80),

obzirom da je u trenutku dijagnoze 69,5% ispitanika imalo proširenu bolest i u 80% slučajeva dijagnoza adenokarcinoma je postavljena na uzorku bronhoskopske biopsije. U analizi nešto šireg vremenskog razdoblja (2012. - 2016. godine), dijagnoza karcinoma pluća u KBC-u Split je postavljena na uzorku bronhskopske biopsije u 80% slučajeva, a na uzorku transtorakalne biopsije u 7% slučajeva, što odgovara rezultatima iz literature (11).

Medijan životne dobi ispitanika je bio 65 godina, u rasponu od 44 do 91 godine, što je u skladu s podatcima Registra za rak RH. Naši ispitanici su mlađi nego u SAD-u gdje je u istom razdoblju medijan životne dobi bio 71 godina (81). Većinom su ispitanici bili muškog spola i pušači, što odgovara epidmiološkim podatcima iz literature (6). Unatoč tome što je većina ispitanika bila u stadiju IV bolesti, bili su dobrog kliničkog stanja. Taj podatak sugerira da je vjerojatni razlog za kasno otkrivanje raka pluća upravo dugo vrijeme bez kliničkih simptoma bolesti.

U našem uzorku male bronhoskopske biopsije najzastupljeniji je bio solidni podtip adenokarcinoma. U usporedbi solidnog prema ostalim podtipovima nije utvrđena statistički značajna razlika u praćenim kliničko-patološkim pokazateljima, osim povezanosti solidnog podtipa s muškim spolom. Jedno od mogućih objašnjenja je češća pušačka navika u muškoj populaciji, s obzirom da se solidni podtip češće javlja u pušača. Zheng i suradnici su utvrdili značajnu povezanost pušenja sa solidnim podtipom: manje je solidnog podtipa u bivših pušača nego u pušača (16,2 % prema 29,5 %; $p = 0,005$;) i više solidnog podtipa u bivših pušača nego u nepušača (16,2 % prema 11,1 %; $p < 0,104$) (82). U našoj studiji je solidni podtip bio češće dijagnosticiran u pušača nego nepušača, što pokazuje trend iako razlika nije bila statistički značajna.

Prema podatcima iz literature, solidni podtip je nepovoljan prognostički pokazatelj. Russell i suradnici izvještavaju da je solidni podtip u maloj biopsiji bio češće povezan s kraćim preživljenjem, pozitivnim limfnim čvorovima i udaljenim metastazama (83). Sousa i suradnici su objavili da je u njihovom istraživanju adenokarcinoma pluća, solidni podtip bio češće povezan s pozitivnim izražajem ERCC1 i mutiranim *EGFR* (84). Solis i suradnici ističu da je solidni podtip češće povezan s uznapredovalim stadijem bolesti nego acinarni i lepidički podtip (85).

U našem radu nismo dobili takvu povezanost, što možemo objasniti činjenicom da histološki podtip u maloj biopsiji ne odgovara uvijek stvarno predominantnom podtipu adenokarcinoma. Matsuzawa i suradnici su usporedili podtip adenokrcinoma pluća u maloj biopsiji s naknadno

određenim predominantnim podtipom u operiranom adenokarcinomu i utvrdili podudarnost u 66% slučajeva, a ovisila je o promjeru areje adenokarcinoma u maloj biopsiji (86).

Primjena imunohistokemijske metode olakšala je razlikovanje tipova karcinoma pluća, čime se smanjio udio dijagnoze nespecificiranog nesitnostaničnog karcinoma pluća (NSCLC, NOS). Protutijela na TTF-1 i Napsin A su se pokazala najpouzdanijima za dokaz primarnog adenokarcinoma pluća (87). U našem uzorku pozitivan izražaj TTF-1 je nađen u 83,2% i Napsina A u 76,8% slučajeva. U radu Zhanga i suradnika, ti biljezi su bili pozitivni u 85% adenokarcinoma pluća (88). Niži postotak slučajeva s pozitivnim izražajem Napsina A u našoj studiji može se objasniti većom zastupljenošću solidnog podtipa, s obzirom da je Napsin A češće od TTF-1 negativan u slabo diferenciranom adenokarcinomu (89). Koekspresija oba biljega nađena je u 93% slučajeva. Taj rezultat se može objasniti činjenicom da TTF-1 regulira izražaj Napsina A (90). Utvrdili smo da je negativan izražaj Napsina A povezan s većim tumorom. Negativan izražaj oba biljega je bio povezan s postojanjem udaljenih metastaza. Dulje ukupno preživljenje je bilo značajno povezano s pozitivnim izražajem TTF-1 i Napsina A u tumoru. U našoj studiji, objavljenoj 2017. godine, pozitivan izražaj TTF-1 i Napsina A je bio značajno povezan s manjim rizikom od smrtnog ishoda i duljim ukupnim preživljenjem ispitanika u odnosu na ispitanike s negativnim izražajem tih biljega (91). Kim i suradnici su u meta analizi utvrdili da je pozitivan izražaj TTF-1 dobar prognostički pokazatelj (92). Prema Ma i suradnicima, izražaj Napsina A i TTF-1 predstavlja nezavisni prognostički pokazatelj za preživljenje u bolesnika s operiranim adenokarcinomom (25). Veza između TTF-1 i prognoze u bolesnika s adenokarcinomom pluća nije posve razjašnjena. Myong je utvrdio da adenokarcinomi pluća s pozitivnim izražajem TTF-1 imaju niži proliferacijski indeks mjeren izražajem Ki-67 nego adenokarcinomi s negativnim izražajem TTF-1 (93). Na osnovu naših rezultata i navedenih zapažanja, utvrdili smo da TTF-1 i Napsin A nisu samo korisni dijagnostički biljezi već vrijedni prognostički pokazatelji u oboljelih od adenokarcinoma pluća.

U našem uzorku, *EGFR* mutacija je utvrđena u 9,9% ispitanika, a ALK-translokacija u 6,1% ispitanika. Značajno više *EGFR* mutacija je utvrđeno u skupini ispitanika starijih od 65 godina (p=0,028), u žena (p=0,029) i nepušača (p=0,021), što je u skladu s rezultatima iz literature (28). U radu Brčića i suradnika iz 2016. o mutacijama u adenokarcinomu pluća u RH, utvrđena je mutacija *EGFR* u 15,7 %, *ALK*-translokacija u 4,1% i *KRAS* mutacija u 34,9% bolesnika (27). Prema literaturi, *EGFR* mutacija u adenokarcinomu pluća je značajno

češća u bolesnika žute rase, u 24% - 66% slučajeva (28). Isto tako, *ALK*-translokacija je nešto češća u Azijata, u rasponu od 3% - 13%, a općenito češća u mlađih odraslih i nepušača. Nismo utvrdili povezanost *EGFR* mutacije i histološkog podtipa adenokarcinoma pluća, vjerojatno zbog malog broja ispitanika s *EGFR* mutacijom. Međutim, u literaturi se spominje njihova povezanost, prvenstveno u studijama s Dalekog Istoka gdje je inače veći udio *EGFR* mutiranih adenokarcinoma. Chen i suradnici su utvrdili češću povezanost *EGFR* mutacije s lepidičkim, papilarnim i acinarnim podtipom nego sa solidnim podtipom i mucinoznim karcinomom (94). Yosizawa i suradnici su *EGFR* mutaciju češće utvrdili u MIC-u, adenokarcinomu s predominantno lepidičkim i papilarnim podtipom, a rjeđe u solidnom i mikropapilarnom podtipu (95). Nasuprot tome, Yu i suradnici su utvrdili češću povezanost *ALK*-translokacije sa solidnim i mikropapilarnim podtipom i varijantama invazivnog karcinoma, nego s AIS-om i predominantno lepidičkim i papilarnim podtipom. *ROS1* translokacija češća je u solidnom podtipu adenokarcinoma pluća (96).

Yamashita i suradnici izvijestili su o povezanosti *EGFR* mutacije sa slabim izražajem ERCC1 (97). U našoj studiji, tumori s *EGFR* mutacijom češće su imali slab izražaj ERCC1, ali razlika nije bila statistički značajna (p=0,137).

Ni jedan ispitanik s *EGFR* mutacijom nije imao ALK-translokaciju. Prema literaturi, u adenokarcinomu pluća je rijetka mutacija oba gena. Analizom 977 uzoraka NSCLC, Yang i suradnici su utvrdili istovremenu mutaciju *EGFR* i *ALK* u 13 (1,3%) slučajeva i zaključili da oba gena treba rutinski analizirati (98).

Prognostički značaj EGFR mutacije u bolesnika koji nisu liječeni TKI-ima je bio rijetko analiziran i češće povezan s dobrom prognozom (99). U našem uzorku ispitanici s *EGFR* mutacijom u tumoru nisu bili liječeni TKI-ima. Ispitanici s *EGFR* mutacijom živjeli su pet mjeseci dulje od ispitanika bez *EGFR* mutacije (24 mjeseca prema 19 mjeseci), ali razlika u preživljenju nije bila statistički značajna (p=0,210).

Pomoću medijana H skora razdijelili smo imunohistokemijski izražaj ERCC1 na slab i jak i usporedili s praćenim kliničko-patološkim varijablama, kako bi ispitali prognostički i prediktivni značaj ERCC1 u adenokarcinomu. Jak izražaj ERCC1 je utvrđen u 47,3% slučajeva i bio je povezan s lošim prognostičkim pokazateljima: lošijim kliničkim stanjem izraženim po ECOG- u (p=0,023), većim tumorom (p=0,002), pozitivnim limfnim čvorovima (p=0,001), prisutnošću udaljenih presadnica (p=0,005) i višim stadijem bolesti (p=0,021). Hubner i suradnici su u meta analizi naveli da je jak izražaj ERCC1 dobar prognostički

pokazatelj u bolesnika sa TNM stadijem I A, koji su bili operirani i nisu primili adjuvantnu kemoterapiju temeljenu na platini (55). Goldstraw i suradnici ukazali su na češći relaps bolesti u operiranih bolesnika sa stadijem IA koji nisu primili adjuvantnu kemoterapiju (100). Pignon i suradnici su utvrdili da uvođenje adjuvantne kemoterapije temeljene na platini povećava stopu preživljenja za 5% (101). Može se pretpostaviti da bi bilo korisno odrediti izražaj ERCC1 u maloj biopsiji u operabilnih bolesnika, kako bi izdvojili bolesnike kojima će se adjuvantnom/neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenoj na platini povećati uspješnost liječenja, odnosno izbjeći nepotrebna toksičnost.

Kako su ispitanici bili liječeni kemoterapijom temeljenoj na platini, analiziran je prediktivni značaj ERCC1 i utvrđeno je, da je u svim stadijima bolesti slab izražaj ERCC1 bio povezan s duljim ukupnim preživljenjem. Ispitanici u stadiju bolesti I-II-III koji su bili liječeni kemoterapijom kombiniranom s operacijom ili radioterapijom, živjeli su 34 mjeseca dulje ako su imali slab tumorski izražaj ERCC1 (45 mjeseci prema 11 mjeseci) (p=0,002). Ispitanici u stadiju bolesti IV koji su bili liječeni samo kemoterapijom temeljenoj na platini, živjeli su 19 mjeseci dulje ako su imali slab tumorski izražaj ERCC1 (24 mjeseca prema 5 mjeseci).

Naše rezultate o prediktivnoj vrijednosti ERCC1 usporedili smo s rezultatima drugih autora dobivenih uporabom različitih metodologija. Lee i suradnici su 2017. godine objavili rezultate prospektivne ET (engl. *ERCC1 Trial*) studije u kojoj je kemoterapija s/bez citostatika temeljena na platini trebala biti izabrana na osnovu imunohistokemijske analize ERCC1 (68). Rabljeno je komercijalno protutijelo ERCC1 8F1 i korištena semikvantitativna analiza po kojoj je kao „ERCC1 pozitivan“ bio vrednovan adenokarcinom s 10 % jako pozitivnih ili 50% umjereno pozitivnih tumorskih stanica u maloj bronhoskopskoj biopsiji. Studija je prekinuta zbog neuspjeha terapije birane na taj način. Autori su zaključili da takav izbor terapije, a zbog protutijela koje se pokazalo nespecifično, nije značajno pridonio preživljenju bolesnika u uznapredovaloj fazi NSCLC. U našem radu primijenili smo komercijalno protutijelo ERCC1 4F9 koje je u literaturi validirano kao najoptimalnije, a u razdjeljivanju na slab/jak izražaj ERCC1 koristili medijan H skora, što je vjerojatno našu metodu učinilo pouzdanijom (76). Ozdemir i suradnici u 83 ispitanika s NSCLC nisu našli povezanost izražaja ERCC1 s učinkom kemoterapije temeljene na platini i preživljenjem. Autori kao ograničenje navode mali uzorak i retrogradno istraživanje. Koristili su medijan H skora za određivanje slabog i jakog izražaja ERCC1, ali drugo komercijalno protutijelo, ERCC1 SPM243 (67).

Booton i suradnici su rtPCR metodom istražili razinu ERCC1 mRNA na arhivskom materijalu iz parafinskih blokova NSCLC i usporedili s učinkom kemoterapije i preživljenjem ispitanika (66). Nisu utvrdili značajnu povezanost izražaja ERCC1 mRNA s terapijskim odgovorom i ukupnim preživljenjem, ali su upozorili na insuficijentnost upotrebljene metode i preporučili daljnje istraživanje o povezanosti polimorfizma *ERCC1*, ERCC1 mRNA i proteina.

U meta analizi kineskih autora ustanovljeno je da polimorfizmi *ERCC1*, C118T i C8092A mogu biti prediktivni biljezi za kemoterapiju temeljenu na platini u Azijskih bolesnika s NSCLC (64). Postel-Vinay i suradnici ukazali su na postojanje četiri izoforme ERCC1 u jezgri, od kojih je samo jedna uključena u popravak DNA-adukata. Trenutno, ni jedno od komercijalno dostupnih protutijela ne omogućuje diferencijaciju između četiri ERCC1 izoforme, što može svakako pridonijeti pogrešnoj procjeni izražaja ERCC1 (70).

U prospektivnoj randomiziranoj studiji Cobo i suradnika je rtPCR metodom analiziran izražaj ERCC1 mRNA u ispitanika s uznapredovalim stadijem NSCLC (102). Bolesnici u kontrolnoj skupini liječeni su kombinacijom docetaksela i gemcitabina. Ispitivana skupina je liječena docetakselom i cisplatinom ili docetakselom i emcitabinom, ovisno o niskoj ili visokoj razini ERCC1 mRNA. U ispitivanoj skupini je terapijski odgovor bio značajno bolji u usporedbi s kontrolnom skupinom (50,3% prema 39,3%). Takemoto i suradnici su 2019. godine objavili studiju u kojoj su procijenili korist od terapije bez platine u bolesnika sa stadijem bolesti IIIB/IV koji su imali visoki izražaj ERCC1 mRNA i zaključili da terapija bez platine za njih može biti učinkovita (72). Istaknuli su važnost uzorkovanja tumorskog tkiva za izolaciju ERCC1 mRNA prije fiksacije u formalinu, jer formalin oštećuje mRNA pa bi se na taj način smanjio broj lažno negativnih uzoraka.

Problematika vezana uz procjenu prognostičkog i prediktivnog značaja ERCC1 istražuje se i u karcinomima drugih organa. Utvrđeno je da je jak izražaj ERCC1 u pločastom karcinomu usne šupljine povezan s kraćim preživljenjem (65). Povezanost jakog izražaja ERCC1 sa slabim učinkom kemoterapije temeljene na platini analizirana je u bolesnica s karcinomom jajnika i to analizom ERCC1 u cirkulirajućim tumorskim stanicama (63). Iz navedenih studija razvidna je neujednačenost u metodologiji analize ERCC1, što svakako utječe na nesuglasje u interpretaciji njegova prognostičkog i prediktivnog značaja. Lakša i točna usporedba rezultata je moguća samo ukoliko su rezultati dobiveni istom metodologijom (67, 103).

U nekoliko radova analiziran je prediktivan značaj izražaja ERCC1 u imunoterapiji NSCLC. Chabanon i suranici su otkrili povezanost između slabog izražaja ERCC1 i boljeg odgovora

na imunoterapiju zbog povećanog broja neoantigena u tumorskoj stanici (104). S obzirom da su dosadašnje studije ukazale na dobar imunoterapijski odgovor i u bolesnika koji su imali negativan membanski izražaj PD-L1 (<1% PD-L1 pozitivnih zloćudnih stanica), traži se bolji prediktivni imunobiljeg za učinkovitost imunoterapije. Nekoliko studija je ukazalo na nezavisnu prediktivnu važnost zbroja mutacija u tumoru (engl. *tumor mutational burden* - TMB) određenih metodom NGS (engl. *next generation sequencing* - NGS). Što je TMB bio veći, to je odgovor na imunoterapiju bio bolji i nije bio sukladan s izražajem PD-L1 (49).

U zaključku, istraživanja prediktivnih čimbenika u kemoterapiji temeljenoj na platini još uvijek nisu pronašla ćimbenik koji bi bio spreman za kliničku primjenu. Uzimajući u obzir kako je mehanizam rezistencije multifaktorijalan, identifikacija takvog čumbenika bi pomogla ne samo u selekciji kemosenzitivnih bolesnika i izboru primjerene kombinacije lijekova, nego bi se izbjegla nepotrebna toksičnost, smanjili troškovi liječenja i možda poboljšali ishodi liječenja. Rezultati naše studije su potvrdili loš prognostički značaj jakog imunohistokemijskog izražaja ERCC1 u ispitanika s adenokarcinomom pluća. Novost je što je slab izražaj ERCC1 potvrđen kao dobar prediktivni biljeg u svim stadijima bolesti oboljelih od adenokarcinoma pluća liječenih samo kemoterapijom temeljenoj na platini ili kombiniranoj s operacijom ili radioterapijom. Imunohistokemijska analiza je vrijedna metoda za evaluaciju izražaja ERCC1, ali treba postići konsenzus oko najpouzdanijeg protutijela i razlikovanja slabog od jakog izražaja ERCC1, kako bi se izbjegle pogrešne interpretacije. Takav postupak se pokazao mogućim u preciznom testiranju mnogih čimbenika povezanih s terapijom. Osim toga, u stoljeću imunoterapije slab izražaj ERCC1 je prepoznat kao prediktor dobrog odgovora na imunoterapiju inhibitorima kontrolnih točaka. Razvidno je kako se moraju uložiti dodatni napori u identifikaciji mogućih prediktivnih čumbenika za svaki terapijski modalitet koji bi mogao pridonijeti boljem ishodu liječenja oboljelih od adenokarcinoma pluća s tim da buduća istraživanja moraju biti ujednačena prema izboru biljega i kriterijima procjene njegovog izražaja.

6. ZAKLJUČCI

1. Slab izražaj ERCC1 je u odnosu na jak izražaj ERCC1 u adenokarcinomu pluća povezan s duljim ukupnim preživljenjem ispitanika liječenih kemoterapijom temeljenoj na platini, kako u ispitanika u stadijima bolesti I-II-III, u kojih je kemoterapija kombinirana s operacijom ili radioterapijom (p=0,001), tako i u ispitanika sa stadijem bolesti IV koji su liječeni samo kemoterapijom (p<0,001).

2. Jak izražaj ERCC1 u adenokarcinomu pluća i lošiji klinički status izražen prema ECOG-u su nezavisni prognostički pokazatelji koji utječu na kraće ukupno preživljenje (p<0,001, odnosno p=0,008).

3. Negativan izražaj TTF-1 i Napsina A je povezan s prisutnošću udaljenih metastaza (p=0,042, odnosno p=0,025). Negativan izražaj Napsina A je povezan s većim tumorom (p=0,024). Jak izražaj ERCC1 je povezan s lošijim kliničkim statusom izraženim po ECOG-u (p=0,023), većim tumorom (p=0,002), pozitivnim limfnim čvorovima (p=0,001), prisutnošću udaljenih metastaza (p=0,005) i višim stadijem bolesti (p=0,021).

4. Najčešći je bio solidni podtip adenokarcinoma pluća (51,8%), koji je u usporedbi s ostalim podtipovima bio značajno povezan samo s muškim spolom (p<0,05).

5. *EGFR* mutacija je utvrđena u 9,9% ispitanika, češće u žena (p=0,024), nepušača (p<0,001) i starijih od 65 godina (p=0,041). Najčešća je bila delecija na eksonu 19 (19 del) i supstitucijska mutacija na exonu 21 (L858R), ukupno u 95% slučajeva.

6. Utvrđena je značajna povezanost boljeg kliničkog statusa izraženog po ECOG-u (p<0,001), nižeg kliničkog stadija bolesti (p<0,001), manjeg tumora (p<0,001), negativnih limfnih čvorova (p<0,001), odsutnosti udaljenih metastaza (p<0,001), pozitivnog izražaja TTF-1 (p=0,003) i Napsina A (p<0,001) te slabog izražaja ERCC1 (p<0,001) s duljim ukupnim preživljenjem.

7. SAŽETAK

Uvod: ERCC1 je endonukleaza koja pripada NER sustavu zaduženom za popravak DNK izrezivanjem nukleotida. Aktivna je u popravku platina-DNK adukata, nastalih djelovanjem kemoterapije temeljene na platini (KTP) i jedan je od mogućih čimbenika uključenih u rezistenciju na KTP. Ciljana terapija uznapredovalog adenokarcinoma pluća (AP) je suzila primjenu KTP u prvoj liniji na oko 50% bolesnika koji nisu kandidati za tirozin kinazne inhibitore ni imunoterapiju. Cilj retrogradne studije je utvrditi imunohistokemijski izražaj ERCC1 u AP i ispitati povezanost s kliničko-patološkim pokazateljima, ukupnim preživljenjem i odgovorom na KTP, odnosno prognostički i prediktivni značaj ERCC1 prije ere ciljane terapije i imunoterapije u RH, kako bi dobili informacije važne u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Ujedno je ispitan prognostički značaj izražaja TTF-1 i Napsin A u AP.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 253 ispitanika s AP dijagnosticiranim na uzorcima bronhoskopske biopsije od 2013. - 2015. godine u KBC-u Split. Revidirani su originalni histološki preparati i prikupljeni rezultati testiranja mutacije *EGFR*. Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva urađena je imunohistokemijska analiza ERCC1 u 129 ispitanika. Izražaj ERCC1 je analiziran semikvantitativno i izračunat H-skor te njegov medijan određen kao vrijednost za razdvajanje slabog (≤0,1) od jakog (>0,1) izražaja ERCC1. Histološki podtip, imunohistokemijski izražaj TTF-1, Napsina A, ALK i ERCC1 te rtPCR metodom određen *EGFR* status uspoređeni su s praćenim kliničko-patološkim pokazateljima i ukupnim preživljenjem. Većina ispitanika je liječena samo KTP, a kod manje ispitanika je kombinirana s operacijom ili radioterapijom. Podatci su statistički obrađeni i vrijednost $p<0,05$ izabrana kao statistički značajna razlika.

Rezultati: Medijan životne dobi je bio 65 godina, u rasponu od 44 do 91 godine. Većina bolesnika je bila muškog spola (63,6%), većinom pušači (86,5%) i sa stadijem bolesti IV (69,5%). Solidni podtip je bio najčešći (51,8%) i u usporedbi s ostalim podtipovima značajno povezan s muškim spolom ($p<0,05$). TTF-1 je bio pozitivan u 83,2% i Napsin A u 76,8% slučajeva; bili su koeksprimirani u 93% slučajeva. Negativan izražaj TTF-1 i Napsina A je bio povezan s prisutnošću udaljenih metastaza ($p=0,042$, odnosno $p=0,025$), a negativan izražaj Napsina A s većim tumorom ($p=0,024$). Jak izražaj ERCC1, nađen u 47,3% slučajeva, je bio povezan s lošijim kliničkim statusom izraženim po ECOG-u ($p=0,023$), većim tumorom ($p=0,002$), pozitivnim limfnim čvorovima ($p=0,001$), prisutnošću udaljenih metastaza ($p=0,005$) i višim stadijem bolesti ($p=0,021$). Izražaj ERCC1 i klinički status izražen po ECOG-u su bili nezavisni prognostički pokazatelji ($p<0,001$, odnosno $p=0,008$). Slab izražaj

ERCC1 je bio povezan s duljim ukupnim preživljenjem ispitanika u stadijima bolesti I-II-III koji su liječeni kombinacijom kemoterapije temeljene na platini s operacijom ili radioterapijom i ispitanika u stadiju bolesti IV koji su liječeni samo kemoterapijom temeljenoj na platini, u odnosu na ispitanike s jakim izražajem ERCC1 ($p=0,001$, odnosno $p<0,001$). *EGFR* mutacija je utvrđena u 9,9% ispitanika, češće u žena ($p=0,024$), nepušača ($p<0,001$) i starijih od 65 godina ($p=0,041$). ALK mutacija utvrđena je u 6,1% ispitanika, od kojih ni jedan nije imao *EGFR* mutaciju.

Zaključak: Jak izražaj ERCC1 i negativan izražaj TTF-1 i Napsina A u AP su nepovoljni prognostički pokazatelji. Izražaj ERCC1 ima prediktivnu vrijednost u ispitanika liječenih KTP u svim stadijima bolesti, kako u stadiju IV u kojem je KTP bila jedina terapija, tako u stadijima I-II-III gdje je KTP kombinirana s operacijom/radioterapijom. Analiza ERCC1 u AP bi mogla pomoći u donošenju odluke o terapiji, s obzirom da slab izražaj ERCC1 upućuje na vjerojatnost dobrog odgovora na KTP, a jak izražaj ERCC1 na slab odgovor i na taj način izbjeći toksičnost neučinkovite terapije.

8. SUMMARY

The utility of excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1) expression in small bronchoscopic biopsy of patients with lung adenocarcinoma in daily clinical practice

Background: ERCC1 is an endonuclease that belongs to the NER system involved in the DNA repair by nucleotide excision. It is activated in the repair of platinum-DNA adducts, produced by the action of platinum-based chemotherapy (PBC) and is one of the possible factors involved in PBC resistance. Targeted therapy for advanced lung adenocarcinoma (LAC) has narrowed the use of first-line PBC to about 50% of patients who are not candidates for tyrosine kinase inhibitors or immunotherapy. The aim of this retrograde study was to determine the level of immunohistochemical expression of ERCC1 in LAC and to examine the relationship with clinicopathologic variables, overall survival (OS) and response to PBC. We want to analyse prognostic and predictive value of ERCC1 before the era of targeted therapy and immunotherapy in Croatia, obtaining important information in everyday clinical practice. The prognostic significance of TTF-1 and Napsin A expression in LAC was also examined.

Material and methods: The study included 253 patients with LAC, patohistologicaly diagnosed on bronchoscopic biopsy from 2013 to 2015 at the University Hospital Split, Croatia. The original histological specimens were revised and results of *EGFR* testing were collected. Immunohistochemical analysis of ERCC1 was performed from paraffin blocks of tumor tissue in 129 patients. The expression of ERCC1 was analyzed semiquantitatively and the H-score was calculated for each patient. Median of H-score was determined to separate the weak (≤0.1) from the strong (> 0.1) ERCC1 expression. Histologic subtype, immunohistochemical expression of TTF-1, Napsin A, ERCC1 and ALK, as well as rtPCR determined *EGFR* status were compared with clinicopathologic variables and OS. All patients were treated with PBC, alone in patients with stage disease IV and combined with surgery/ radiotherapy in patients with stage disease I-II-III. Data were statistically analysed and the value of $p < 0.05$ was chosen as a statistically significant difference.

Results: The median age was 65 years, range 44 - 91 years. The majority of patients were male (63.6%), smokers (86.5%) and in stage disease IV (69.5%). The solid subtype was dominant (51.8%), and compared to other subtypes, associated with male sex ($p < 0.05$). TTF-1 was positive in 83.2% and Napsin A in 76.8% of cases; they were coexpressed in 93% of

cases. Negative expression of TTF-1 and Napsin A were associated with the presence of distant metastases ($p = 0.042$ and $p = 0.025$, respectively), and negative expression of Napsin A with a larger tumor ($p = 0.024$). Strong ERCC1 expression, found in 47.3% of cases, was associated with poorer clinical status expressed according to ECOG ($p = 0.023$), larger tumor ($p = 0.002$), positive lymph nodes ($p = 0.001$), the presence of distant metastases ($p = 0.005$) and higher stage of the disease ($p = 0.021$). ERCC1 expression and clinical status, expressed according to ECOG were independent prognostic factors ($p <0.001$ and $p = 0.008$, respectively). Weak ERCC1 expression was associated with a longer overall survival of patients with disease stage I-II-III treated with PBC combined with surgery or radiotherapy and patients with stage IV disease treated with PBC as the only therapy, compared to patients with strong ERCC1 expression ($p = 0.001$ and $p <0.001$, respectively). EGFR mutation was found in 9.9% of subjects, more often in women ($p = 0.024$), non-smokers ($p <0.001$) and older than 65 years ($p = 0.041$). The ALK mutation was found in 6.1% of patients, none of whom had an EGFR mutation.

Conclusion: Strong ERCC1 expression and negative expression of TTF-1 and Napsin A in LAC were unfavorable prognostic indicators. ERCC1 had a predictive value in patients treated with PBC in all stages of the disease, both in stage IV with PBC as the only therapy, and in stages I-II-III, with PBC combined with surgery or radiotherapy. Analysis of ERCC1 in LAC could help in making a therapeutic decision. Weak expression of ERCC1 indicates a chance of a good response to PBC, and strong expression of ERCC1 indicates a poor response to PBC, and toxicity of ineffective therapy should be avoided.

9. LITERATURA

1. IARC. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. GLOBOCAN 2012. Dostupno na: http://gco.iarc.fr/ [13.06.2020.]
2. IARC. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. GLOBOCAN 2018. Dostupno na. http://gco.iarc.fr/ [11-06-2020.]
3. Wong MSC, Lao XQ, Ho KF, Goggins WB, Tse SLA. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. Sci Rep. 2017; 7: 14300. doi: 10.1038/s41598-017-14513-7.
4. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L,i sur. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncol. 2013;14:1262–3. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70487-X.
5. Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(1):7-34. doi: 10.3322/caac.21551.
6. Šekerija M, Bubanović LJ, Glamočanin S, Novak P, Šelendić Đ. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; Registar za rak republike Hrvatske. Zagreb: 2019;41:22-24.
7. Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020. – 2024. Zagreb: Ministarstvo zdravstva; 2020. Dostupno na: https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2020%20Vijesti/NACIONALNI%20PROGRAM%20PREVENCIJE%20RAKA%20PLU%C4%86A.pdf [13.06.2020.]
8. Barbone F, Bovezi M, Cavallieri F, Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. Chest. 1997;112(6):1474-9.
9. Vukres VD, Uhernik AI, Mihel S. Status i učestalost pušenja. U: Benjak T, ur. Istraživanje o uparabi duhana u odrasloj populaciji Republike Hrvatske. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2015:7.
10. Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O´ Hagan, Hamra GB, i sur. Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort study of workers in France, the UK and the USA (INWORKS). BMJ. 2015;351:h5359. Doi: 10.1136/bmj.h5359.
11. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, i sur. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137:668–84.

12. Minna JD. Lung tumors. U: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, ur. Harrison´s principles of internal medicine. 13. izd. New York: McGraw Hill;1994. Str. 1067-1074.
13. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines. Chest. 2007;132(3):149S-160S.
14. Samaržija M, Jakopović M, Boban M, Bošković L, Lovasić IB, Juretić A. Smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća nemalih stanica. Liječ Vjesn. 2017;139:365-371.
15. Travis WD, Noguchi M, Yatabe Y, Brambilla E, Nicholson AG, Alsner SC, i sur. Adenocarcinoma. U: Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, ur. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC; 2015. Str. 26–37.
16. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. Chest 2007;132:29S-55S
17. Nitadori J, Bograd AJ, Kadota K, S. Sima CS, P. Rizk NP, Morales EA, i sur. Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2cm or smaller. J Natl Cancer Inst. 2013;105:1212–1220.
18. Tsao MS, Marguet S, Le Teuff G, Lantuejoul S, Shepherd FA, Seymour L, i sur. Subtype classification of lung adenocarcinoma predicts benefit from adjuvant chemotherapy in patients undergoing complete resection. J Clin Oncol. 2015;33(30): 3439–3446. doi: 10.1200/JCO.2014.58.8335.
19. 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):8039-45.
20. Barletta JA, Perner S, Iafrate AJ, Yeap BY, Weir BA, Johnson LA, i sur. Clinical significance of TTF-1 protein expression and TTF-1 gene amplification in lung adenocarcinoma. J Cell Mol Med. 2009;13:1977–86.
21. Zhang P, Han YP, Huang L, Li Q, Ma D: Value of napsin A and thyroid transcription factor-1 in the identification of primary lung adenocarcinoma. Oncol Lett. 2010;1:899–903. doi: 10.3892/ol_00000160.

22. Stoll LM, Johnson MW, Gabrielson E, Askin F, Clark DP, Li QK. The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. Cancer Cytopathol. 2010;118:441–49. doi: 10.1002/cncy.20108
23. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS, Jagirdar J. Napsin A, a new marker for lung adenocarcinoma is complementary and more sensitive and specific than thyroid transcription factor 1 in the differential diagnosis of primary pulmonary carcinoma: Evaluation of 1674 cases by tissue microarray. Arch Pathol Lab Med. 2012;136:163–71. doi.org/10.5858/arpa.2011-0320-OA
24. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL: Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63 and CK5/6. Am J Surg Pathol. 2011;35:15–25.
25. Ma Y, Fan M, Dai L, Kang X, Liu Y, Sun Y, i sur. The expression of TTF-1 and napsin A in early-stage lung adenocarcinoma correlates with the results of surgical treatment. Tumour Biol. 2015;36(19):8085–92. doi: 10.1007/s13277-015-3478-z.
26. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathogy. 10. izd. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2018. Str.538.
27. Brcic L, Jakopovic M, Misic M, Seiwerth F, Kern I, Smojver-Jezek S, i sur. Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. Diagn Pathol. 2016;11:90.
28. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic s, Giaccone G, i sur. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J Thorac Oncol. 2013;8:823–59. doi: 10.1097/JTO.0b013e318290868f.
29. Couraud S, Souquet PJ, Paris C, Do P, Doubre H, Pichon E, i sur. BioCAST/IFCT-1002: epidemiological and molecular features of lung cancer in never-smokers. Eur Respir J. 2015;45(5):1403-1414. doi: 10.1183/09031936.00097214
30. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, i sur. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the college of American

Pathologists, the International Association for the Study ofLung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. J ThoracOncol. 2018; 13: 323–358. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.004

31. Wu YL, Planchard D, Lu S, Sun H, Yamamoto N, Kim DW, i sur. Pan-Asian adapted Clinical Practice Guidelines for the management of patients with metastatic non-small-cell lung cancer: a CSCO–ESMO initiative endorsed by JSMO, KSMO, MOS, SSO and TOS. Ann Oncol. 2019;30:171–210. doi:10.1093/annonc/mdy554.
32. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, i sur. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018;(4):192–237 doi:10.1093/annonc/mdy275
33. Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. J Thorac Dis. 2010;2(1):48–51.
34. Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM, Jakobsen JN, Stricker K, Grauslund M, i sur. Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in *EGFR*-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. Cancers. 2019;11(7);923. doi.org/10.3390/cancers11070923
35. NCCN Guidelines Version 3.2020 Non-Small Cell Lung Cancer. Fort Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network Inc.; 2020. [12.06.2020.] Dostupno na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx
36. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, i sur. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non–small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18:1472-82.
37. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, i sur. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol. 2012;30:863-70.
38. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 8. izd. Oxford, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
39. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumours. 7. izd. Hoboken, NJ: John Wiley&Sons; 2011.
40. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, i sur. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982;5(6):649-55.

41. Ganz PA, Figlin RA, Haskell CM, Soto N, Siau J. Supportive care versus supportive care and combination chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer. Does chemotherapy make a difference?. Cancer. 1989;63:1271-8.
42. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, i sur. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non–small-cell lung cancer. New Engl J Med. 2002:346;92-8.
43. Scagliotti GV, Parikh P, Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, i sur. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non–small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2008;26:3543-51.
44. Sandler A, Yi J, Dahlberg S, Kolb MM, Wang L, Hambleton J, i sur. Treatment outcomes by tumor histology in Eastern Cooperative Group Study E4599 of bevacizumab with paclitaxel/carboplatin for advanced non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2010;5:1416-23.
45. Torti D, Trusolino L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. EMBO Mol Med. 2011;3:623-36.
46. Pacheco JM, Gao D, Smith D, Purcell T, Hancock M, Bunn P, i sur. Natural History and Factors Associated with Overall Survival in Stage IV ALK-Rearranged Non–Small Cell Lung Cancer. J Torac Oncol. 2019;14(4):691-700.
47. Jakopović M, Bitar L, Krpina K, Muršić D, Seiwerth F, Janković M, i sur. Imunoterapija u tretmanu ne-sitnostaničnog raka pluća. Croatian J Oncol. 2017;45:60-64.
48. Berghmans T, Grigoriu B, Sculier JP, Meert AP. Immune checkpoint inhibitors (antibodies to PD1 and PD-L1), a new therapeutic weapon against non-small cell bronchial carcinoma. Rev Mal Respir. 2018; 35:197-2059. doi: 10.1016/j.rmr.2017.11.007.
49. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, i sur. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. N Engl J Med. 2018;378:2093-2104. doi: 10.1056/NEJMoa1801946.
50. Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomised trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. Ann Thorac Surg. 1995;60:615–22.

51. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. 2007;132:234S–42S. doi: 10.1378/chest.07-1378.
52. Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, i sur. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 1999;17:2692–9. doi: 10.1200/JCO.1999.17.9.2692.
53. Baumann P, Nyman J, Hoyer M, Wennbeng B, Gagliardi G, Lax I, i sur. Outcome in a prospective phase II trial of medically inoperable stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiotherapy. J Clin Oncol. 2009;27:3290–6. doi:10.1200/JCO.2008.21.5681
54. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 128-130.
55. Hubner RA, Riley RD, Billingham LJ, Popat S. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) status and lung cancer outcomes: a meta-analysis of published studies and recommendations. PLoS One. 2011;6:e25164. doi.org/10.1371/journal.pone.0025164.
56. Olaussen KA, Postel-Vinay S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. Ann Oncol. 2016;27:2004-2014.
57. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. Clin Cancer Res. 2008;14:1291-1295.
58. Gene cards. The human gene database. ERCC1 gene.[Internet]. Dostupno na: www.genecards.org › cgi-bin › carddisp › gene=ERCC1 [12.06.2020.].
59. Gregg SQ, Robinson AR, Niedernhofer LJ. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. DNA Repair. 2011;10:781–91. DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.04.026.
60. Bohanes P, Labonte MJ, Lentz HJ. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer. 2011;10(3):157–64. doi:10.1016/j.clcc.2011.03.024.
61. Smith DH, Kanstrup Fiehn AM, Fogh L, Christensen J, Hansen TP, Stenvang J, i sur. Measuring ERCC1 protein expression in cancer specimens: validation of a novel antibody. Sci Rep. 2014;4: 4313. doi: 10.1038/srep04313.

62. Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. Biochim Biophys Acta. 2010; 1806:172-182. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.07.004.
63. Kuhlmann JD, Wimberger P, Bankfalvi A, Keller T, Scholer S, Aktas B, i sur. ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance. Clin Chem. 2014;60(10):1282–9. doi.org/10.1373/clinchem.2014.224808
64. Han Y, Lui J, Sun M, Zhang Z, Liu C, Sun Y. A significant statistical advancement on the predictive values of ERCC1 polymorphisms for clinical outcomes of platinum-based chemotherapy in non-small cell lung carcinoma: an update meta-analysis. Dis Markers. 2016;2016:7643981. doi.org/10.1155/2016/7643981.
65. Prochnow S, Wilczak W, Bosch V, Clautitz TS, Muenscher A. ERCC1, XPF and XPA-locoregional differences and prognostic value of DNA repair protein expression inpatients with head and neck squamous cell carcinoma. Muenscher AClinOral Investig. 2018;29. doi.org/10.1007/s00784-018-2751-0.
66. Booton R, Ward T, Ashcroft L, Morris J, Heighway J, Thatcher N. ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapyregimens in advanced non-small cell lung cancer. J Thorc Oncol. 2007;2:902–6. doi:10.1097/JTO.0b013e318155a637.
67. Ozdemir O, Ozdemir P, Veral A, Uluer H, Ozhan MH. ERCC1 expression does not predict survival and treatment response in advanced stage non-small cell lungcancer cases treated with platinum based chemotherapy. Asian Pac JCancer Prev. 2013;14(8):4679–83. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.8.4679.
68. Lee SM, Falzon M, Blackhall F, Spicer J, Nicolson M, Chaudhuri A, i sur. Randomized prospective biomarker trialof ERCC1 for comparing platinum and non-platinum therapy in advancednon-small-cell lung cancer: ERCC1 trial (ET). J Clin Oncol. 2017;35:402–11. doi: 10.1200/JCO.2016.68.1841.
69. Friboulet RE, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S. ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl j Med. 2013;348;1101-1110. doi: 10.1056/NEJMoa1214271.
70. Postel-Vinay S, Soria JC. ERCC1 as Predictor of Platinum Benefit in Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2017;35(4):384–6. doi.org/10.1200/JCO.2016.70.5053

71. Smith, D, Fiehn A, Fogh L, Christensen J, Tine Plato Hansen TP, Stenvang J, i sur. Measuring ERCC1 protein expression in cancer specimens: Validation of a novel antibody. Sci Rep. 2014;4:4313. doi.org/10.1038/srep04313.
72. Takemoto S, Nakamura Y, Gyoutoku H, Senju H, Ogawara D, Ikeda T, i sur. Phase II trial of a non-platinumtriplet for patients with advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC) overexpressing ERCC1 messenger RNA. Thorac Cancer. 2019;10(3):452–458. doi.org/10.1111/1759-7714.12958.
73. Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. DNA Repair. 2010; 9:745-753.
74. Arora S, Heyza J, Zhang H, Kalman-Maltese V, Tillison K, Floyd AM, I sur. Identification of small molecule inhibitors of ERCC1-XPF that inhibit DNA repair and potentiate cisplatin efficacy in cancer cells. Oncotarget. 2016;7(46):75104–75117. doi: 10.18632/oncotarget.12072.
75. Carter P, Alifrangis C, Cereser B, Chandrasinghe P, Del Bel Belluz L, Herzog T, i sur. Does molecular profiling of tumors using the Caris molecular intelligence platform improve outcomes for cancer patients? Oncotarget. 2018;9: 9456–9467.
76. Olaussen KA, Dunat A, Fouret P, et al: DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med. 2006;355:983-991. doi: 10.18632/oncotarget.24258.
77. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. Clin Cancer Res. 2008;14:1291–5. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2238.
78. Besse B, Olaussen KA, Soria JC. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? J Clin Oncol. 2013;31:1050-60.
79. Ryu JS, Memon A, Lee SK. ERCC1 and personalized medicine in lung cancer. Ann Transl Med. 2014;2:32.
80. Jukica L. Karcinom pluća u bioptičkom materijalu u KBC-u Split od 2012. do 2016. godine - analiza preživljenja. Split; Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2017.
81. Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, i sur. SEER Cancer Statistics Review(CSR) 1975-2015. National Cancer Institute. Bethesda. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/sections.html

82. Zheng S, Wang R, Zhang Y, Pan Y, Cheng C, Zheng D, i sur. Former smokers with non-small-cell lung cancers: a comprehensive investigation of clinicopathologic characteristics, oncogenic drivers, and prognosis. Cancer Med. 2016;(8):2117–2125. doi: 10.1002/cam4.764.
83. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does Lung Adenocarcinoma Subtype Predict Patient Survival? A Clinicopathologic Study Based on the New International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/ European Respiratory Society International Multidisciplinary Lung Adenocarcinoma Classification. J Thorac Oncol. 2011;6(9):1496-504. doi: 10.1097/JTO.0b013e318221f701.
84. Sousa V, Bastos B, Silva M, Alarcão AM , Carvalho L. Bronchial-pulmonary adenocarcinoma subtyping relates with different molecular pathways. Rev Port Pneumol. 2015;21(5):259-270 doi:10.1016/j.rppnen.2014.05.006
85. Solis LM, Behrens C, Raso MG, Lin HY, Kadara H, Yuan P, i sur. Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome. Cancer. 2012;118:2889–99. doi: 10.1002/cncr.26584.
86. Matsuzawa R, Kirita K, Kuwata T, Umemura S, Matsumoto S, Fujii S, i sur. Factors influencing the concordance of histological subtype diagnosis from biopsy and resected specimens of lung adenocarcinoma. Lung Cancer. 2016;94:1-6. doi:10.1016/j.lungcan.2016.01.009.
87. Loo PS,Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. J Thorac Oncol. 2010;5(4):442-7. doi:10.1095/JTO.0b013e3181d40fac.
88. Zhang P, Han Y.P, Huang L, Li Q, Ma DL. Value of napsin A and thyroid transcrip-tion factor-1 in the identification of primary lung adenocarcinoma. Oncol Lett. 2010;1:899–903. doi: 10.3892/ol_00000160.
89. Stoll LM, Johnson MW, Gabrielson E, Askin F, Clark DP, Li QK. The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. Cancer Cytopathol. 2010;118:441–49. doi: 10.1002/cncy.20108
90. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL: Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an

immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63 and CK5/6. Am J Surg Pathol. 2011; 35: 15–25.

91. Piljić Burazer M, Mladinov S, Ćapkun V, Kuret S, Glavina Durdov M. The Utility of Thyroid Transcription Factor 1 (TTF-1), Napsin A, Excision Repair Cross-Complementing 1 (ERCC1), Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression in Small Biopsy in Prognosis of Patients with Lung Adenocarcinoma - A Retrograde Single-Center Study from Croatia. Med Sci Monit. 2017;23:489-497. doi: 10.12659/msm.899378.
92. Kim JH, Kim HS, Kim BJ, Han B, Choi DR, Kwon JH. Prognostic Impact of TTF-1 Expression in Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. J Cancer. 2018; 9(22):4279–4286. doi: 10.7150/jca.26830
93. Myong NH: Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in human lung carcinomas: its prognostic implication and relationship with expressions of p53 and Ki-67 proteins. J Korean Med Sci. 2003; 18: 494–500. doi:10.3346/jkms.2003.18.4.494.
94. 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 adenocarci-noma. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7:8039–45.
95. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, i sur. validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. J Thorac Oncol. 2013;8:52–61. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182769aa8
96. Yu Y, Ding Z, Zhu L, Teng H, Lu S. Frequencies of ALK rearrangements in lung adenocarcinoma subtypes: a study of 2299 Chinese cases. Springerplus. 2016;5(1):894. doi:10.1186/s40064-016-2607-5
97. Yamashita F, Azuma K, Yoshida T, Yamada K, Kawahara A, Hattori S, i sur. Prognostic value of EGFR mutation and ERCC1 in patients with non-small cell lung cancer undergoing platinum-based chemotherapy. PLoS One. 2013;8:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0071356.
98. Yang JJ, Zhang XC, Su J, Xu CR, Zhou Q, Tian HX, i sur. Lung cancers with concomitant EGFR mutations and ALK rearrangements: diverse responses to EGFR-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation.Clin Cancer Res. 2014;20(5):1383-92. doi: 10.1158/1078-0432.

99. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? Arch Pathol Lab Med. 2010;134:66–72.
100. Goldstraw P. IASLC Staging Manual in Thoracic Oncology. 2. izd. Orange Park, FL: Rx Press; 2009.
101. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, i sur. Lung adjuvant cisplatine valuation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. J Clin Oncol. 2008;26:3552–3559. doi: 10.1200/JCO.2007.13.9030.
102. Cobo M, Isla D, Massuti B, Montes A, Sanchez JM, Provencio M, i sur. Customizing cisplatin based on quantitativeexcision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial innon-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2007;25(19):2747–54. doi: 10.1200/JCO.2006.09.7915.
103. Tao H, Zhang Y, Li Q, Chen J. Methodological quality evaluation of systematic reviews or meta-analyses on ERCC1 in non-small cell lung cancer: a systematic review. J Cancer Res Clin Oncol. 2017;143:2245–2256. https://doi.org/10.1007/s00432-017-2516-1
104. Chabanon RM, Muirhead G, Krastev DB, Adan J , Morel D, [1 2], Marlène Garrido M, i sur. PARP inhibition enhancestumor cell-intrinsic immunity in ERCC1–deficient non-small cell lung cancer. J Clin Invest. 2019;129(3):1211–28. doi: 10.1172/JCI123319

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1964. godine u Splitu, gdje sam završila osnovno i srednješkolsko gimnazijsko obrazovanje. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1991. godine i za vrijeme studija bila asistent iz medicinske kemije na Zavodu za kemiju i biokemiju. Nakon završenog studija, zapošljavam se u D.Z. Split do početka 1995. godine, kada sam rapoređena na rad u D.Z Biograd n/m i njegovim područnim ambulantama u Tkonu, Preku, Neviđanima i Gračacu. Od 1996. do ožujka 1997. godine sam radila za American Refugee Committe (ARC) u amblanti za ratne izbjeglice na otoku Obonjanu, a nakon toga do 1999. nastavljam rad u ambulanti opće prakse u Pučišćima na otoku Braču (D.Z. Supetar). Krajem 1999. godine dobivam specijalizaciju iz Kliničke citologije na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC-a Split, gdje i danas radim kao klinički citolog nakon položenog specijalističkog ispita 2004. godine.

Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila sam poslijediplomski znanstveni studij: Opća onkologija, 1996. godine, poslijediplomski tečaj 1. kategorije: Osnove abdominalnog ultrazvuka, 1997. godine i poslijediplomski stručni studij: Klinička citologija, 2001. godine. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu završila sam tečaj: Vještina medicinske edukacije i znanstvenog rada, 2014. godine te na istom sudjelujem kao stručni suradnik u nastavi - predmet patologija. Objavila sam sedam znanstvenih radova, od toga pet u bazi Current Contents. Članica sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog citološkog društva.