

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

Klinička medicina



**UČESTALOST I PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ GENSKIH ALTERACIJA U  
TUMORSKIM ĆELIJAMA I NJIHOVA POVEZANOST SA KLINIČKO-  
PATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA RANIM  
STADIJUMOM ADENOKARCINOMA BRONHA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Branislav Perin

Kandidat: Asist. dr Vladimir Stojšić

Novi Sad, 2017. godine

*Zahvaljujem se mentoru profesoru dr Branislavu Perinu na izuzetno stručnoj i prijateljskoj saradnji i na nesebičnoj podršci prilikom izrade ovog rada. Veliku zahvalnost dugujem docentu dr Bojanu Zariću koji mi je od samog nastanka ideje svojim angažovanjem, i nesebičnim savetima, pomogao u realizaciji ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem porodici za podršku, strpljenje, razumevanje i toleranciju. Zahvaljujem se i svim kolegama koji su svojim sugestijama i predlozima doprineli kvalitetu ovog rada.*

*Autor*

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Vladimir Stojšić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Branislav Perin, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	"Učestalost i prognostički značaj genskih alteracija u tumorskim ćelijama i njihova povezanost sa kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha"

Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina, Novi Sad
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet, Novi Sad, Hajduk Veljkova 9

Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 8; broj stranica 126; broj slika 0; broj grafikona 21; broj tabela 20; broj referenci 177.
Naučna oblast: NO	Medicina.
Naučna disciplina: ND	Klinička medicina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	neoplazme bronha; adenokarcinom; genetska predispozicija prema bolesti; tumorski biomarkeri; prognoza; stadijum neoplazmi; preživljavanje; preživljavanje bez povratka bolesti; mutacija; rana dijagnoza karcinoma
UDK	616.23-006.6-037:577.21
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

<p>Važna napomena:</p> <p>VN</p>	
<p>Izvod:</p> <p>IZ</p>	<p>Napredak na polju molekularne biologije omogućio je identifikaciju molekularnih markera za karcinom bronha sa vrednim prognostičkim i prediktivnim značajem i njihova uloga kod uznapredovalog, metastatskog oblika bolesti je u velikoj meri istražena, dok kod ranih stadijuma bolesti još uvek nije sasvim jasna. Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi učestalost najčešćih genskih alteracija u tumorskim ćelijama bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha, da se utvrdi pojedinačna zavisnost ispitivanih genskih alteracija u tumorskim ćelijama sa određenim kliničko-patološkim karakteristikama i da se utvrdi potencijalni prognostički značaj pojedinačne genske alteracije u tumorskim ćelijama na vreme preživljavanja bez povratka bolesti i ukupno vreme preživljavanja. Istraživanje je obuhvatilo 161 bolesnika sa adenokarcinomom bronha, stadijuma bolesti od I do IIIA, kod kojih je sprovedena radikalna hirurška resekcija u Institutu za plućne bolesti Vojvodine u periodu između 2007 i 2014 godine. U tumorskim uzorcima fiksiranim u parafinu određivane su mutacije EGFR, KRAS i PIK3CA gena, ALK i ROS1 rearanžman i PD1 i PD-L1 ekspresija. Kliničko-patološke karakteristike su preuzete iz registra za karcinom bronha Instituta za plućne bolesti Vojvodine. Ukupno preživljavanje je računato od dana operacije do dana smrti, a preživljavanje bez povratka bolesti je računato od dana operacije do momenta ponovne pojave bolesti. Od 161 testiranog tumorskog uzorka, prisustvo mutacija detektovano je</p>

kod 96 uzoraka (59.6%). Prisustvo mutacije KRAS gena detektovano je kod 69 (42.9%), mutacije EGFR gena kod 10 (6.2%), a mutacije PIK3CA gena kod 7 (4.3%) tumorskih uzoraka. ALK rearanžman je detektovan kod 3 (1.9%), a ROS1 rearanžman kod 7 (4.3%) tumorskih uzoraka. PD-1 ekspresija detektovana je u 71 tumorskom uzorku (45%), dok je PD-L1 ekspresija detektovana u 59 tumorskih uzoraka (36.6%). PD-1 ekspresija nije bila značajno povezana ni sa jednim od kliničko-patoloških karakteristika (uključujući KRAS, EGFR, ALK, ROS1 i PI3KCA status). PD-L1 ekspresija je bila značajno povezana sa tipom hirurgije ( $P = 0.01$ ) i sa prisustvom KRAS mutacije ( $P = 0.02$ ). Mutacioni status u domenu KRAS gena je bio značajno povezan sa godinama starosti ( $P = 0.004$ ), polom ( $P = 0.006$ ) i pušačkim statusom ( $P = 0.004$ ). Mutacioni status u domenu EGFR gena je bio značajno povezan sa pušenjem ( $P < 0.001$ ) i sa godinama starosti ( $P = 0.013$ ). Mutacioni statusi u domenu gena za ALK, ROS1 i PI3KCA nisu bili značajno povezani ni sa jednom od ispitivanih kliničko-patoloških karakteristika. Prisustvo PD-1 ekspresije je bilo značajno povezano sa preživljavanjem bez povratka bolesti ( $P = 0.03$ ) i ukupnim preživljavanjem ( $P = 0.01$ ). PD-L1 ekspresija, KRAS, EGFR, ALK, ROS1 i PIK3CA mutacioni statusi nisu bili značajno opvezani sa preživljavanjem bez povratka bolesti i ukupnim preživljavanjem. Najčešće detektovane genske alteracije su mutacije u domenu KRAS i EGFR gena. Prisustvo KRAS mutacije je značajno povezano sa godinama starosti ispitanika, polom i pušačkim statusom dok je prisustvo EGFR mutacije značajno povezano sa godinama starosti ispitanika i

	pušačkim statusom. Prisustvo PD-L1 ekspresije je značajno povezano sa vrstom hirurškog lečenja i sa prisustvom KRAS mutacija. Jedino prisustvo PD-1 ekspresije u tumorskim ćelijama predstavlja nezavistan prognostički faktor za preživljavanje bez povratka bolesti i ukupno preživljavanje bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	20.10.2016.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

# University of Novi Sad

## Faculty

### Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD
Author: AU	Vladimir Stojšić
Mentor: MN	Branislav Perin
Title: TI	"Frequency and prognostic value of gene alterations in tumor cells and their correlation with clinicopathological characteristics of patients with early stage lung adenocarcinoma"
Language of text: LT	Serbian.
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina, Novi Sad



Publication year: PY	2017.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Medical faculty, Hajduk Veljkova 9, Novi Sad

Physical description: PD	8 chapters, 126 pages, 0 pictures, 21 graphs, 20 tables, 177 references
Scientific field SF	Medicine.
Scientific discipline SD	Clinical medicine.
Subject, Key words SKW	Bronchial Neoplasms; Adenocarcinoma; Genetic Predisposition to Disease; Biomarkers, Tumor; Prognosis; Neoplasm Staging; Survival; Disease-Free Survival; Mutation; Early Diagnosis of Cancer
UC	616.23-006.6-037:577.21
Holding data: HD	Library of Medical faculty
Note: N	
Abstract: AB	Advances in the field of molecular biology gave us insight into biomarkers for lung cancer with great prognostic and predictive value and their role in advanced stage disease is well known while in early stage disease is yet to be proven. The aim of this study was to determine the frequencies of the most common gene alterations in patients with early stage lung adenocarcinoma, to determine the relationship between gene alterations in tumor cells and

clinicopathological characteristics and to determine prognostic value of each gene alteration regarding overall survival and disease free survival. One hundred sixty-one patients diagnosed with lung adenocarcinoma clinical stage I-IIIa who underwent radical surgical resection at the Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina between 2007 and 2014 were included in this study. Mutations in EGFR, KRAS and PIK3CA gene, ALK and ROS1 rearrangement and PD-1 and PD-L1 expression were determined in representative formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor block from each patient. Clinical data were extracted from the institutional lung cancer registry of the Institute for Pulmonary Diseases. Overall survival was calculated as time from the day of surgery to the day of death. Disease free survival was calculated as time from the day of surgery to the day of disease relapse. Among 161 tested tumor tissue, presence of mutation was found in 96 (59.6%) of them. There were 69 (42.9%) mutations in KRAS gene, 10 (6.2%) in EGFR gene and 7 (4.3%) in PIK3CA gene. ALK and ROS1 rearrangement were present in 3 (1.9%) and 7 (4.3%), respectively. PD-1 expression was determined in 71 (45.0%) tumor sample while PD-L1 expression was determined in 59 (36.6%). PD-1 expression was not correlated with any of the clinicopathological characteristics (including KRAS, EGFR, ALK, ROS1 and PIK3CA mutational status). PD-L1 expression correlated with type of surgery ( $P = 0.01$ ) and KRAS positivity ( $P = 0.02$ ). KRAS mutation status correlated with age ( $P = 0.004$ ), sex ( $P = 0.006$ ) and smoking status ( $P = 0.004$ ). EGFR status correlated with smoking

	<p>status (<math>P &lt; 0.001</math>) and age (<math>P = 0.013</math>). ALK, ROS1 and PIK3CA status were not correlated with any of the clinicopathological characteristics. PD-1 expression was significantly associated with disease free survival (<math>P = 0.03</math>) and overall survival (<math>P = 0.01</math>). PD-L1 expression, KRAS, EGFR, ALK, ROS1 and PIK3CA status were not associated with disease free survival and overall survival. The most frequent gene alteration are mutations in KRAS and EGFR gene. Presence of KRAS mutation is in correlation with patients age, sex and smoking status while presence of EGFR mutation is in correlation with patients age and smoking status. PD-L1 expression is in correlation with type of surgery and KRAS mutational status. Only presence of PD-1 expression represent an independent prognostic factor for disease free survival and overall survival.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>20.10.2016.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Epidemiologija karcinoma bronha .....	1
1.2 Podela karcinoma bronha.....	6
1.3. TNM sistem .....	8
1.3.1. TNM klasifikacija karcinoma bronha .....	8
1.4 MOLEKULARNI OSNOVI KARCINOGENEZE KARCINOMA BRONHA .....	11
1.4.1. GENSKA NESTABILNOST.....	11
1.4.1.1. MSI (Mikrosatelitska nestabilnost).....	12
1.4.1.2. CIN (hromozomska nestabilnost) .....	12
1.4.2. AMPLIFIKACIJA KAO MEHANIZAM ONKOGENEZE.....	13
1.4.2.1. EGFR amplifikacija .....	14
1.4.2.2. ERBB2 amplifikacija .....	15
1.4.2.3. MET amplifikacija .....	15
1.4.2.4. PIK3CA amplifikacija.....	16
1.4.2.5. FGFR1 amplifikacija.....	17
1.4.3. STRUKTURNE PROMENE KOJE VODE ONKOGENEZI PUTEM FUZIJE GENA .....	17
1.4.3.1. ALK fuzija .....	17
1.4.3.2. ROS1 fuzija.....	18
1.4.3.3. RET fuzija.....	19
1.4.4. MUTACIJE KOD KARCINOMA BRONHA.....	19
1.5. PREGLED GENOMSKE TEHNOLOGIJE .....	21
1.5.1. SEKVENCIONIRANJE PRVE GENERACIJE (First-Generation Sequencing) .....	21
1.5.2. SEKVENCIONIRANJE SLEDEĆE GENERACIJE (NGS - Next-Generation Sequencing) ..	22
1.5.3. Upotreba sekvencioniranja genoma .....	23
1.5.3.1. Sekvencioniranje celog genoma (Whole-Genom Sequencing).....	23
1.5.3.2. Ciljano sekvencioniranje (targeted Sequencing).....	23
1.5.3.3. Transkriptom (Transcriptome).....	24
1.5.3.4. Epigenom (Epigenome) .....	24
1.5.3.5. Upotreba NGS kod adenokarcinoma bronha .....	25
1.5.4. Nove tehnologije - Sekvencioniranje treće generacije (Third-Generation Sequencing).....	26

1.5.5. Kliničke implikacije NGS platformi .....	27
1.6. Prognostički faktori.....	27
1.6.1. Prognostički faktori kod karcinoma bronha.....	28
1.6.1.1. Stadijum bolesti .....	28
1.6.1.2. Performans status .....	28
1.6.1.3 Pušenje .....	29
1.6.1.4. Pol .....	31
1.6.1.5. Godine starosti .....	31
1.6.1.6. Ostali prognostički faktori .....	32
1.7. Genske alteracije kod karcinoma bronha.....	32
1.7.1. EGFR - Receptor Epidermalnog Faktora Rasta (Epidermal Growth Factor Receptor) .....	33
1.7.2. KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog).....	36
1.7.3. ALK - Kinaza Anaplastičnog Limfoma (Anaplastic Lymphoma Kinase) .....	39
1.7.4. ROS1 (c-ros oncogene 1) .....	41
1.7.5. PD-1/PD-L1 (Programmed cell death protein 1 (PD-1)/ Programmed death-ligand 1(PD-L1)).....	43
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	47
2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	47
2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	47
3. MATERIJAL I METODE .....	48
3.1. ISPITANICI.....	48
3.2. KARAKTERISTIKE I ANALIZE TUMORSKOG TKIVA .....	49
3.2.1. Analiza mutacija .....	49
3.2.2. IMUNOHISTOHEMIJA (IHC) .....	50
3.2.2.1. PD-1/PD-L1 IHC .....	50
3.2.2.2. ALK IHC .....	51
3.2.2.3. ROS1 IHC.....	51
3.2.3. FLUORESCENTNA IN SITU HIBRIDIZACIJA (FISH) .....	52
3.2.3.1. ALK FISH.....	52
3.2.3.2. ROS1 FISH .....	52
3.3. STATISTIČKA ANALIZA .....	52
4. REZULTATI.....	54
5. DISKUSIJA .....	76
6. ZAKLJUČCI.....	98

7. LITERATURA .....	99
8. LISTA SKRAĆENICA.....	118

## 1. UVOD

Karcinom bronha je jedan od najčešće dijagnostikovanih karcinoma i vodeći uzrok smrtnosti zbog karcinoma u ljudskoj populaciji (1,2). Ova bolest predstavlja globalni problem sa najvišom incidencom zabeleženom u centralnoj i istočnoj Evropi (1), delu sveta kojem, geografski gledano, na ograncima, pripada i Srbija, a posebno njena severna pokrajina Vojvodina.

Najveći broj slučajeva karcinoma bronha se otkriva u odmaklom i metastatskom stadijumu bolesti kada je prognoza loša, a šanse za izlečenje svedene na minimum. Hirurško lečenje i dalje predstavlja najbolji vid lečenja i nudi najveću šansu za izlečenje u slučaju kada se dijagnostikuje rani stadijum karcinoma bronha, međutim, i u tim slučajevima, česta je pojava ranog recidiva, odnosno relapsa bolesti (3).

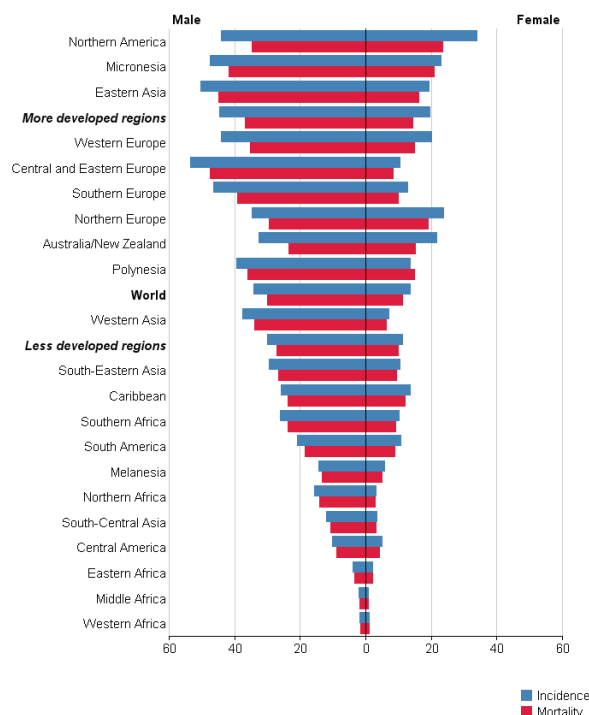
Napredak na polju molekularne biologije omogućio je identifikaciju molekularnih markera za karcinom bronha sa vrednim prognostičkim i prediktivnim značajem. Raznovrsne genske i epigenske mutacije su primećene kod karcinoma bronha i njihova uloga kod uznapredovalog, metastatskog oblika bolesti je u velikoj meri istražena, dok njihova uloga kod ranih stadijuma bolesti još uvek nije sasvim jasna.

U opštoj populaciji, svest o veličini i značaju problema karcinoma bronha je na veoma niskom nivou, a različite manifestacije ove bolesti i nespecifični simptomi koji je prate, otežavaju u velikoj meri njeno rano prepoznavanje i postavljanje dijagnoze. Uzimajući u obzir navedene okolnosti vezane za karcinom bronha, a pored toga i visoku stopu morbiditeta i mortaliteta, svetu su i dalje potrebna dobro koordinisana istraživanja iz domena karcinoma bronha, na svim nivoima, kako bi se ova bolest stavila pod kontrolu.

### 1.1 EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA

Nekoliko decenija unazad, incidenca karcinoma bronha je u porastu. Osamdesetih godina prošlog veka, procenjen broj novih slučajeva godišnje, na globalnom nivou, iznosio je oko 660000. Na početku druge decenije dvadeset i prvog veka, tačnije u 2012-oj godini, procenjen broj novih slučajeva bio je 1800000 (1). U odnosu na polove, karcinom bronha je najčešće dijagnostikovani karcinom kod muškaraca, dok se kod žena nalazi na trećem mestu, odmah iza karcinoma dojke i

kolorektalnog karcinoma (1,2). Socio-ekonomski posmatrano, karcinom bronha je učestaliji u siromašnim i slabije razvijenim delovima sveta gde je zabeležen porast konzumacije duvana kod slabo edukovane populacije i populacije sa niskim primanjima (2). Geografski gledano, globalno, najveća incidenca karcinoma bronha, što se tiče muške populacije, zabeležena je u centralnoj i istočnoj Evropi gde je 2012 godine uzrasno standardizovana incidence iznosila 53,5 novih slučajeva na 100000 stanovnika, dok se na drugom mestu po incidenci karcinoma bronha nalazi Istočna Azija sa 50,4 novih slučajeva na 100000 stanovnika. Kod žena najveća incidenca zabeležena je u Severnoj Americi i Severnoj Evropi. Najniže incidence kako kod muškaraca, tako i kod žena zabeležene su u Africi(1). Grafikon 1 prikazuje uzrasno standardizovanu incidencu i smrtnost karcinoma bronha, u svetu, na 100000 stanovnika.



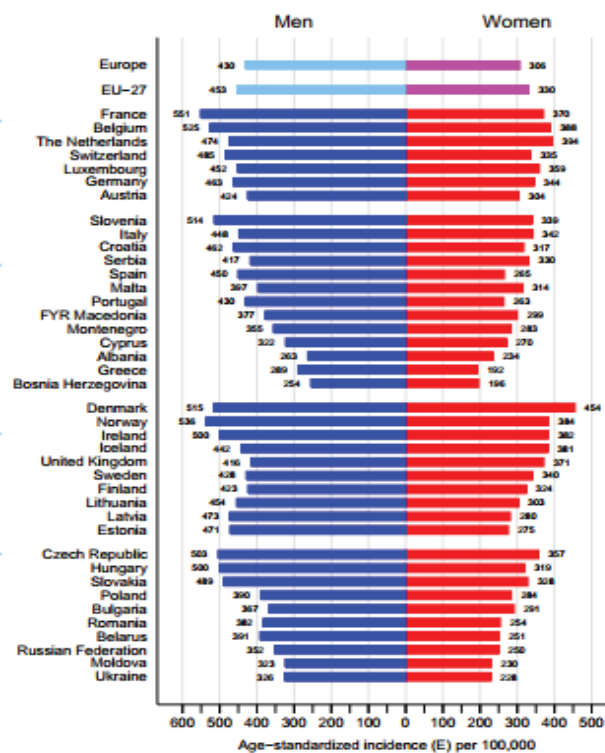
**Grafikon 1.** Uzrasno standardizovana incidenca i smrtnost karcinoma bronha na 100000 stanovnika (Svet)

**Izvor:** [https://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=lung](https://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=lung)

Sa procenjenom incidencom od preko 449000 novih slučajeva godišnje, karcinom bronha je jedan on najučestalijih maligniteta i na Evropskom kontinentu. Unutar Evropske Unije najveća incidenca



je u Mađarskoj i Poljskoj, a najniža u Švedskoj i na Kipru. Uzrasno standardizovana incidenca karcinoma bronha u Mađarskoj kod žena iznosi 42,9/100000, dok je kod muškaraca daleko veća i iznosi 115,3/100000. U Poljskoj incidenca karcinoma bronha kod žena je manja nego u Mađarskoj i iznosi 26,3/100000, dok je incidenca kod muškaraca vrlo visoka u odnosu na evropski prosek i iznosi 104,5/100000. Vrednosti incidence karcinoma bronha na 100.000 stanovnika na nivou EU iznose 22,9/100000 za žene i 70/100000 za muškarce. Najmanju incidencu u EU imaju Švedska, Portugal i Kipar. U Švedskoj je incidenca za žene 23,5/100.000, a za muškarce 27,3/100000, u Portugalu su vrednosti 8,5/100000 i 41,9/100000, respektivno, dok je na Kipru incidenca najmanja i za žene iznosi 6,8/100000 a za muškarce 33/100000 (4-6). Grafikon 2 prikazuje uzrasno standardizovanu incidencu karcinoma bronha na 100000 stanovnika kod žena i muškaraca u zemljama Evrope.

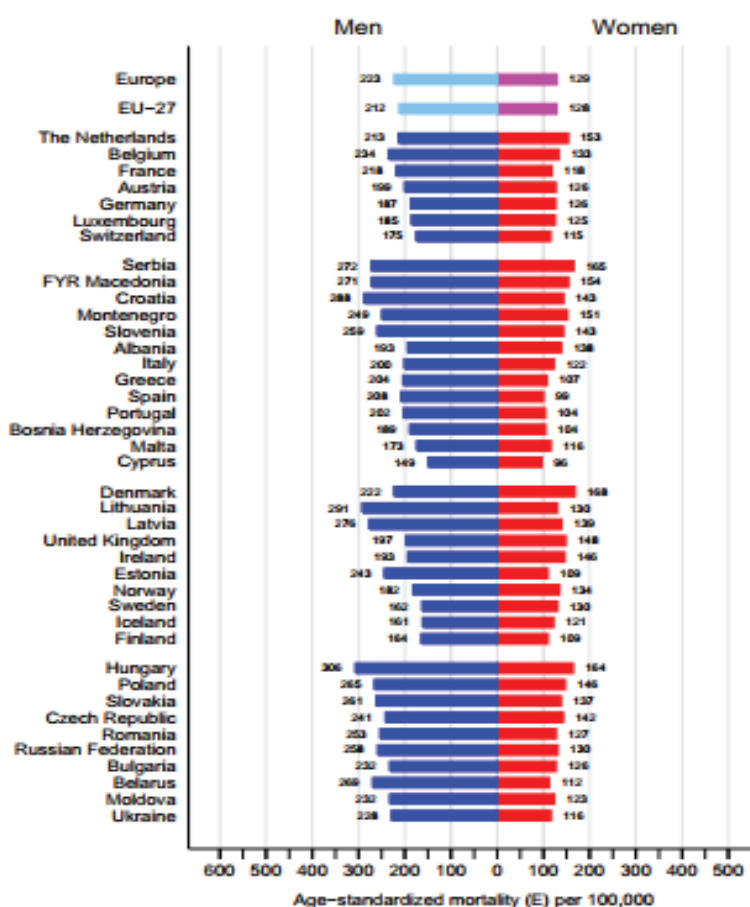


**Grafikon 2.** Uzrasno standardizovana incidenca karcinoma bronhana 100.000 stanovnika kod žena i muškaraca u zemljama Evrope

**Izvor:** [https://www.researchgate.net/publication/236041569\\_Reprint\\_of\\_Cancer\\_incidence\\_and\\_mortality\\_patterns\\_in\\_Europe\\_Estimates\\_for\\_40\\_countries\\_in\\_2012](https://www.researchgate.net/publication/236041569_Reprint_of_Cancer_incidence_and_mortality_patterns_in_Europe_Estimates_for_40_countries_in_2012)

Što se tiče situacije u našoj zemlji, prema Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, poslednjih nekoliko decenija prati se konstantan porast oboljevanja i umiranja od malignih tumora generalno. Što se tiče karcinoma bronha, u centralnoj Srbiji 2013. godine, on predstavljao vodeću malignu lokalizaciju i u oboljevanju i u umiranju muškog dela populacije, dok je kod žena karcinom bronha u Srbiji bio napetom mestu po učestalosti i na drugom mestu kao uzrok umiranja, odmah iza karcinoma dojke. Standardizovana stopa incidencije karcinoma bronha, na nivou centralne Srbije iznosila je 55,9 na 100000 stanovnika za muškarce i 19,0 na 100000 stanovnika za žene. Standardizovana stopa mortaliteta od karcinoma bronha na nivou centralne Srbije iznosila je 52,2 na 100000 stanovnika za muškarce i 16,7 na 100000 stanovnika za žene. U Vojvodini, prema registru za karcinom bronha Instituta za plućne bolesti Vojvodine, od 2010. godine beleži se relativno konstantan broj novoobolelih bolesnika od karcinoma bronha. Te 2010. godine, broj novoobolelih bio je 1126, dok je najveći broj novoobolelih zabeležen 2016. godine i iznosio je 1256. Od 1126 novoobolelih 2010. godine, 75,5% je bilo muškaraca i 24,5% žena, dok je 2016. godine od 1256 novoobolelih 66,6% bilo muškaraca, 33,4% žena.

Karcinom bronha je na prvom mestu u pogledu smrtnosti od karcinoma kod oba pola i odgovoran je, približno, za jedan od pet smrtnih slučajeva od svih karcinoma i samim tim ima ogroman udeo u celokupnom nacionalnom mortalitetu jedne zemlje (1). U Sjedinjenim Američkim Državama, početkom dvadeset i prvog veka, petogodišnje preživljavanje je iznosilo oko 16%. Preživljavanje kod karcinoma bronha u velikoj meri zavisi od stadijuma bolesti i ono u SAD iznosi 52%, 24% i 4% za rani stadijum, lokalno uznapredovali i odmakli, metastatski stadijum bolesti, respektivno (2). U Evropi, u prvoj deceniji dvadeset i prvog veka, petogodišnje preživljavanje kod karcinoma bronha iznosi oko 17%, slično situaciji zabeleženoj u SAD, a takođe je slično preživljavanje prema stadijumima bolesti pa je tako petogodišnje preživljavanje sa rani stadijum 52%, za lokalno uznapredovali 25%, a za odmakli, metastatski svega 4%. Geografski posmatrano, smrtnost od karcinoma bronha uglavnom prati incidencu karcinoma bronha kod pripadnika oba pola. Stopa mortaliteta od karcinoma bronha je najviša u istočnim zemljama Evrope poput Mađarske, Poljske, Letonije i Litvanije, a najniža u razvijenim zemljama poput Finske, Švedske, Portugala i Kipra. (4). Na grafikonu 3 je prikazana uzrasno standardizovana stopa mortaliteta na 100.000 stanovnika po polu za 2012. godinu u zemljama Evrope.



**Garfikon 3.** Uzrasno standardizovana stopa mortaliteta na 100.000 stanovnika po polu za 2012. u zemljama Evrope.

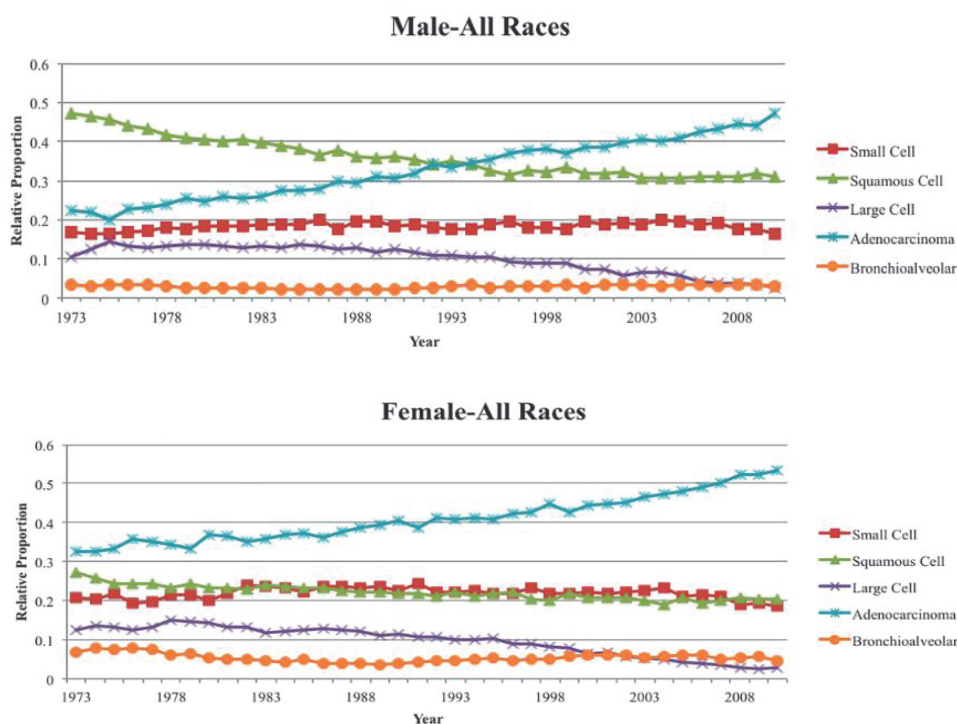
Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/236041569\\_Reprint\\_of\\_Cancer\\_incidence\\_and\\_mortality\\_patterns\\_in\\_Europe\\_Estimates\\_for\\_40\\_countries\\_in\\_2012](https://www.researchgate.net/publication/236041569_Reprint_of_Cancer_incidence_and_mortality_patterns_in_Europe_Estimates_for_40_countries_in_2012).

Pored stadijuma bolesti na preživljavanje utiču i druge kliničko-patološke karakteristike, a među njima su i pol, starost, tip karcinoma itd. Lošije preživljavanje zabeleženo je kod muškaraca, starije populacije i kod sitnoćelijskog tipa karcinoma bronha (5). Globalno posmatrano, stopa smrtnosti od karcinoma bronha je u padu 36% kod muškaraca u periodu od 1990 do 2011 godine, a kod žena 11% u periodu između 2002 i 2011 godine. Razlog za to, dobrim delom, leži u činjenici da je zabeležena smanjena upotreba duvana kao rezultat različitih programa edukacije i podizanja nivoa svesti o štetnosti duvanskog dima, kao i sprovođenja programa kontrole upotrebe duvana (6), a objašnjenje za ovo leži u činjenici da postoji logična korelacija smrtnosti od karcinoma bronha, godina starosti i pušenja duvana. Tokom istorije, muškarci su u ranijem uzrasnom dobu počinjali

da puše u poređenju sa ženama i pušili su količinski mnogo više, ali upravo snažne kampanje usmerene na prestanak pušenja dovele su kod muškaraca do pada mortaliteta, dok se takav efekat na žensku populaciju polako uočava, a njegov pun učinak se tek očekuje.

## 1.2 PODELA KARCINOMA BROHA

Prva histološka klasifikacija karcinoma bronha publikovana je pedesetih godina prošlog veka. Nakon toga, usledila su dva izdanja Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organisation - WHO) 1967 godine i 1982 godine (8). Najjednostavnija, a ujedno i najšira podela karcinoma bronha je podela nasitnoćelijski (mikrocelularni) i nesitnoćelijski karcinom bronha (nemikrocelularni) koji uključuje skvamozni (epidermoidni) karcinom, adenokarcinom i makrocelularni karcinom. Poslednja klasifikacija tumora pluća objavljena je od strane Svetske zdravstvene organizacije 2015 godine i ova klasifikacija donela je brojne, značajne promene u odnosu svoja prethodna izdanja, međutim osnovna podela na sitnoćelijski i nesitnoćelijski karcinom bronha ostala je i dalje zastupljena (9). Procentualno gledano sitnoćelijski karcinom bronha zastupljen je u svega 15% slučajeva, dok je nesitnoćelijski karcinom bronha zastupljen u 85% slučajeva. Skvamozni karcinom i adenokarcinom predstavljaju dva najzastupljenija histološka podtipa u grupi nesitnoćelijskog karcinoma bronha. Zastupljenost ova dva histološka podtipa se menjala u poslednjih nekoliko decenija, kako kod muškaraca tako i kod žena. U Sjedinjenim Američkim Državama sedamdesetih godina prošlog veka skvamozni karcinom je bio značajno zastupljeniji kod muškaraca u odnosu na adenokarcinom, a njegova zastupljenost iznosila je i do 50% dok je adenokarcinom bio zastupljen u svega 20%. Od tog vremena pa do prve decenije dvadeset i prvog veka beleži se pad zastupljenosti skvamoznog karcinoma na 30% dok je zastupljenost adenokarcinoma u porastu i iznosi 40%. Kod žena je adenokarcinom sve vreme najzastupljeniji tip karcinoma bronha sa relativno konstantnim trendom porasta. Adenokarcinom je kod žena 1970 godine bio zastupljen u oko 20% slučajeva, dok je 2010 godine ta zastupljenost oko 55% (10). Na grafikonu 4 prikazane su relativne proporcije zastupljenosti karcinoma bronha u Sjedinjenim Američkim Državama za period od 1973 do 2008 godine.



**Grafikon 4.** Relativne proporcije zastupljenosti karcinoma brona u Sjedinjenim Američkim Državama za period od 1973 do 2008 godine.

**Izvor:** <https://journals.plos.org/plosone/article/figure/image?size=medium&id=info:doi/10.1371/journal.pone.0121323.g001>

Slična situacija zabeležena je i u drugim delovima sveta. U Evropskim zemljama, među pripadnicima muškog pola, skvamozni karcinom bronha je sedamdesetih godina prošlog veka bio najzastupljeniji histološki podtip i od tada se konstantno prati trend opadanja učestalosti ovog podtipa karcinoma bronha kod muškaraca. Što se tiče adenokarcinoma, nakon relativno stabilne faze tokom sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka, ovaj histološki podtip, u gotovo svim Evropskim zemljama beleži trend porasta, a početkom dvadeset i prvog veka i u Evropi postaje najzastupljeniji histološki podtip karcinoma bronha u muškoj populaciji. U ženskoj populaciji situacija je za nijansu drugačija. Adenokarcinom sve vreme beleži konstantan porast, što su u pojedinim Evropskim zemljama, kao što su Holandija i Danska, a takođe i u drugim zemljama poput Kanade i Australije, zabeleženi početni znaci opadanja incidence adenokarcinoma bronha (11,12). U Autonomnoj Pokrajini Vojvodini, severnoj pokrajini Republike Srbije, prema registru za karcinom bronha Instituta za plućne bolesti Vojvodine, od 2010 godine, adenokarcinoma predstavlja najzastupljeniji histološki podtip nesitnoćelijskog karcinoma bronha sa udelom od

37,6%. Na drugom mestu je skvamozni karcinom koji je 2010. godine bio zastupljen kod 33,9% slučajeva novoobolelih. Narednih godina primećen je trend porasta adenokarcinoma bronha pa je 2013. godine on bio zastupljen kod 45,4% slučajeva novoobolelih bolesnika. Od te godine pa do 2016.godine prati se blag trend opadanja adenokarcinoma bronha u populaciji bolesnika sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine kada je njegova zastupljenost bila 40,8%.

## 1.3 TNM SISTEM

Određivanje stadijuma bolesti predstavlja postupak pomoću kojeg se određuje proširenost maligne bolesti. Pravilno i precizno određen stadijum bolesti prvenstveno utiče na odluku o daljem terapijskom postupku, a pored toga omogućava i svrstavanje bolesnika u određene kategorije sa prognostičkim implikacijama i pomaže u proceni rezultata terapije. Takođe, određivanje stadijuma bolesti omogućava poređenje rezultata među institucijama koje se bave istom problematikom (13). Američki udruženi komitet za kancer (American Joint Committee on Cancer - AJCC) i Međunarodna unija za borbu protiv raka (International Union Against Cancer - UICC) ustanovili su sistem za određivanje stadijuma kancera koje je nazvan TNM sistem, odnosno klasifikacija. Postoji više osnova za klasifikaciju karcinoma: anatomska, klinička i patološka proširenost bolesti, dužina trajanja simptoma i znakova, pol i godine pacijenta, histološki tip i gradus tumora. Svi navedeni faktori imaju uticaj na prognozu bolesti. TNM klasifikacija se primarno oslanja na anatomske proširenost bolesti. Ono što TNM klasifikaciju čini najprimenljivijom je to što ona odvojeno posmatra tri elementa, a to su tumor (T), limfni čvorovi (N) i metastaze (M), i potom ih zajedno svrstava u jedan stadijum (14).

### 1.3.1. TNM klasifikacija karcinoma bronha

Operativna grupa za karcinom bronha Američkog udruženog komiteta za kancer (American Joint Committee on Cancer Task Force on Lung Cancer) je 1973 godine predložila sistem za određivanje kliničkog stadijuma karcinom bronha, koristeći TNM sistem, baziran na 2155 slučajeva iz baze podataka bolnice M.D. Anderson (M. D. Anderson Cancer Center, Houston, USA.). Nakon toga, usledilo je nekoliko revizija, u rasponu od četiri do deset godina, i to 1974

godine (druga revizija), 1978 godine (treća revizija), 1987 godine (četvrta revizija), 1997 godine (peta revizija) i 2002 godine (šesta revizija) (15-17). Sve prethodno pomenute revizije imale su dosta nedostataka, a to se pre svega odnosilo na mali broj uključenih slučajeva u bazi podataka. Pored toga, baza podataka je bila sačinjena od slučajeva iz pretežno jednog referentnog centra i sadržala je slučajeve koji su uglavnom hirurški tretirani. Takođe, interna validacija je bila vrlo malo zastupljena, a eksterna nije ni postojala. Internacionalna Asocijacija za Istraživanje Karcinoma pluća (International Association for the Study of Lung Cancer - IASLC) je 1998 godine pokrenula projekat za određivanje stadijuma karcinoma pluća (Lung Cancer Staging Project) koji je imao za cilj prikupljanje što većeg broja slučajeva, širom sveta, u zajedničku bazu podataka, kako bi se mogla izvršiti opširna validacija i u skladu sa tim predložiti izmene za predstojeću sedmu reviziju TNM sistema (18). Sedma revizija TNM sistema za karcinom bronha startovala je 01.01.2010. godine i donela je sa sobom veoma velika i značajna unapređenja u odnosu na sve prethodne revizije. Baza podataka za sedmu reviziju obuhvatala je, do tada, najveći broj slučajeva, preko 100000, bila je internacionalnog karaktera i uključeni su bili slučajevi tretirani svim modalitetima lečenja. Stadijumi bolesti su bili usklađeni sa prognozom više nego ikada ranije (19). Najveće promene su obuhvatile T deskriptor (20) i M deskriptor (21), dok je N deskriptor ostao nepromenjen, ali je po prvi put urađena njegova validacija na internacionalnom nivou (22). U tabeli 1 prikazan je princip određivanja deskriptora T prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije, u tabeli 2 prikazan je princip određivanja deskriptora N prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije dok je u tabeli 3 prikazan je princip određivanja deskriptora M prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije. U tabeli 4 prikazan je princip određivanja stadijuma bolesti prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije, a u odnosu na T, N i M deskriptor.

**Tabela 1.** Princip određivanja deskriptora T prema sedmoj TNM klasifikaciji

<b>Tx</b>	Primarni tumor nije utvrđen, ili je pozitivan nalaz malignih ćelija u sputumu ili u ispirku bronha, bez vizualizacije radiološkim tehnikama i bronhoskopijom.
<b>T0</b>	Primarni tumor nije evidentiran
<b>Tis</b>	<i>Crcinoma in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor 3cm ili manji u najvećem dijametri, okružen plućnim tkivom ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopski vidljive invazije proksimalno od lobarnih bronha, lokalizovan van glavnog bronha.
<b>T1a</b>	Tumor 2cm ili manji. Kao T1a klasifikuje se tumor površnog širenja bilo koje vilične sa invazijom ograničenom na zid bronhija, koji se proksimalno širi i u glavni bronh.
<b>T1b</b>	Tumor veći od 2cm, ali ne više od 3cm u najvećem dijametri.
<b>T2</b>	Tumor veći od 3cm, ali manji od 7cm, ili tumor koji zahvata glavni bronh na udaljenosti od 2cm ili većoj od karine traheje, zahvata visceralnu pleuru, udružen je sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi nahilarnu regiju, ali ne zahvata cela pluća.
<b>T2a</b>	Tumor veći od 3cm, ali manji od 5cm u najvećoj dimenziji
<b>T2b</b>	Tumor veći od 5cm, ali manji od 7cm u najvećoj dimenziji
<b>T3</b>	Tumor veći od 7cm ili direktno (zahvatanje) zida grudnog koša (uključujući i tumor gornjeg sulkusa), dijafragme, freničnog nerva, medijastinalne pleure, parijetalnog perikarda; ili tumor u glavnom bronhu na manje od 2cm distalno od karine treheje bez zahvatanja karine; ili udružen sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom celog plućnog krila ili odvojeni tumorski nodus/i u istom režnju kao i primarni tumor
<b>T4</b>	Tumor bilo koje veličine koji zahvata: medijastinum, srce, velike krvne sudove, traheju, rekurentni nerv, jednjak, kičmene pršljenove i karinu traheje, odvojeni nodusi u različitom režnju istog pluća kaoprimarni tumor.

**Tabela 2.** Princip određivanja deskriptora N prema sedmoj TNM klasifikaciji

<b>Nx</b>	Regionalne limfne žlezde nisu određivane.
<b>N0</b>	Nema metastaza u regionalnim limfni čvorovi.
<b>N1</b>	Metastaze u ipsilateralnim peribronhijalnim i/ili ipsilateralnim hilarnim limfni čvorovi i intrapulmonalane limfni čvorovi uključujući rastom direktno zahvatanje
<b>N2</b>	Metastaze u ipsilateralnim medijastinalnim i/ili subkarinalnim limfnim čvorovi
<b>N3</b>	Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim, kontralateralnim hilarnim, ipsilateralnim ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima.



**Tabela 3.** Princip određivanja deskriptora M prema sedmoj TNM klasifikaciji

<b>M0</b>	Nema udaljenih metastaza.
<b>M1</b>	Udaljene metastaze.
<b>M1a</b>	Odvojeni tumorski nodus/i u kontralateralnom plućnom krilu, tumor sa pleuralnim nodusima, maligni pleuralni izliv i perikardni izliv.
<b>M1b</b>	Udaljene vanplućne metastaze

**Tabela 4.** Određivanje stadijuma bolesti prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije.

<b>T/M</b>	<b>Podgrupa</b>	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
T1	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3	T3	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4	T4	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1	M1a	IV	IV	IV	IV
	M1b	IV	IV	IV	IV

## 1.4 MOLEKULARNI OSNOVI KARCINOGENEZE KARCINOMA BRONHA

### 1.4.1. Genska nestabilnost

Karcinom bronha predstavlja grupu bolesti koju karakteriše visok nivo genomske nestabilnosti i složene promene na molekularnom nivou. Danas je poznato da je akumulacija multiplih genskih abnormalnosti povezana sa nastankom i progresijom karcinoma bronha. Genska nestabilnost, koja može izazvati ove abnormalnosti, je uopšten naziv koji se odnosi na hromozomsku nestabilnost (Chromosomal instability - CIN) i mikrosatelitsku nestabilnost (Microsatellites instability - MSI). Ove nestabilnosti obuhvataju ceo, ili jedan deo hromozoma uključujući delecije, duplikacije, insercije i translokacije. Oba fenomena, hromozomska nestabilnost i mikrosatelitska nestabilnost doprinose fenotipskoj nestabilnosti i promenljivosti ćelija raka (23).

#### *1.4.1.1. MSI (Mikrosatelitska nestabilnost)*

Mikrosateliti, takođe poznati i kao jednostavne ponavljajuće sekvence (Simple Sequence repeats - SSRs) predstavljaju kratka ponavljanja sekvenci DNK (Dezoksiribonukleinska kiselina) (manje od 10 parova baza). Najčešći mikrosatelit u ljudskoj populaciji je binukleotid CA, koji se pojavljuje preko deset hiljada puta u ljudskom genomu. Dužina mikrosatelita varira od osobe do osobe, i svaka jedinka ima mikrosatelite određene dužine. Mikrosateliti, obeležje genske nestabilnosti, nastaku kao posledica abnormalnosti MMR gena, kao na primer hMSH2 i hMLH1, koji onemogućuju popravku greški nastalih prilikom DNK replikacije. Mikrosateliti su inicijalno otkriveni kod kolorektalnog karcinoma i odmah je uočen njihov klinički značaj i povezanost sa pojavom naslednog ne-polipoidnog karcinoma kolona. Nasuprot tome, kod karcinoma bronha, hromozomska nestabilnost ima značajniju ulogu u karcinogenezi u odnosu na pojavu mikrosatelita. Kod karcinoma bronha, učestalost mikrosatelita varira od 0% do 69% kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha i od 0% do 76% kod sitoćelijskog karcinoma bronha (24,25).

#### *1.4.1.2. CIN (hromozomska nestabilnost)*

Većina ćelija raka poseduje abnormalan broj hromozoma, često u obliku triploidije i tetraploidije, a kao dodatak izmenjenom broju hromozoma, ćelije raka poseduju i strukturalne hromozomske aberacije kao što su inverzije, delecije, duplikacije i translokacije. Aneuploidija, definisana kao numerička i strukturalna abnormalnost hromozoma nastaje najčešće zbog hromozomske nestabilnosti. Aneuploidija i hromozomska nestabilnost mogu posredovati u evoluciji popucacije ćelija raka putem tzv. selekcionog pritiska i povezane su sa lošijom prognozom. Hromozomska nestabilnost igra veoma važnu ulogu u procesu karcinogeneze karcinoma bronha na taj način što ubrzava homozigotske i heterozigotske delecije tumor supresor gena i dovodi do efektivne amplifikacije onkogeno. U određenim studijama uočeno je da karcinom bronha često pokazuje gubitak heterozigotnosti kao rezultat hromozomske nestabilnosti posebno na specifičnim delovima hromozoma 12p, 14q i 17q. Takođe, gubitak heterozigotnosti na lokusu 3p, koji sadrži gene povezane sa antioksidantnom odbranom organizma, nije samo povezan sa razvojem karcinoma bronha već i sa pojačanom osetljivošću na DNK oštećujuće agense (npr. zračenje) (26-28).

Mnogobrojni mehanizmi tokom ćelijskog ciklusa su uključeni u pojavu hromozomske nestabilnosti i aneuploidije kod karcinoma bronha i to su: greška u mitotičkim kontrolnim punktovima, mutacije i amplifikacije kinetohora i delova centrozoma kao i mutacije gena za popravku DNK. Mitotski kontrolni punktevi se aktiviraju kada kinetohora nije zakačena za deobno vreteno te na taj način vrši deregulaciju procesa metafaze i anafaze. Gubitak funkcije mutacije, ili smanjena genska ekspresija gena za mitotske kontrolne punkteve (MAD1/MAD2), dovodi do pogrešne segregacije hromozoma i na taj način doprinosi aneuploidiji. Pored toga, mitotski kontrolni punktevi su takođe povezani sa odgovorom na oštećenje DNK, a neispravna funkcija mitotskih kontrolnih punktova dovodi do rezistencije ćelije raka na lekove čiji je mehanizam dejstva oštećenje DNK. Za centromere se zna da one održavaju genomsku stabilnost tokom ćelijske deobe, obezbeđujući pravilnu segregaciju replikovanih hromozoma u dve ćerke ćelije (29). STK15, kodiran od Aurora kinaze A (AURKA), je amplifikovan i prekomerno eksprimovan kod većine humanih karcinoma rezultujući u amplifikaciji centrozoma, hromozomskoj nestabilnosti i tumorigenezi. Aurora kinaza je serin/treonin kinaza koja ima funkciju u regulaciji procesa mitoze i njena disfunkcija ometa normalnu funkciju mitotskih kontrolnih punkteva te na taj način omogućava aberantnim ćelijama da uđu u proces mitoze i ćelijske deobe. Prekomerna ekspresija Aurora kinaze može dovesti do aneuploidije što rezultuje u nemogućnosti održanja integriteta samog hromozoma. U jednoj studiji aurora kinaza je bila visoko eksprimovana u 50% nesitnoćelijskih karcinoma bronha što bi moglo ukazivati na njenu ulogu tumor markera. Kliničke studije sa lekovima koji imaju ulogu inhibitora Aurora kinaze su trenutno u toku (30).

#### 1.4.2. Amplifikacija kao mehanizam onkogeneze

Genska amplifikacija predstavlja ekspanziju broja genskih kopija u ograničenom delu hromozomskog kraka. U nekim tumorima amplifikacija preovlađuje, a često je i povezana sa prekomernom ekspresijom amplifikovanih gena što sve dovodi do rasta ćelija raka i rezistencije ćelija raka na antitumorsku terapiju. Genomske analize velikog broja uzoraka kancera pokazale su da većina (otprilike 75%) genskih amplifikacija je fokalna (od 50 do 300 parova baza) i uključuje na prvom mestu onkogene koji kodiraju signalne proteine neophodne za ćelijsku proliferaciju i preživljavanje. Ova saznanja jasno upućuju na to da genska amplifikacija promoviše formiranje

tumora, njegovo održavanje i rezistenciju na lekove. Genska amplifikacija je čest mehanizam onkogenske aktivacije kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha i ima snažan efekat na nivo ekspresije proteina. Uzimajući u obzir ulogu genske amplifikacije u nastanku karcinoma bronha i njegovoj progresiji, sama genska amplifikacija je češće povezana sa određenim kliničko-patološkim karakteristikama i agresivnijim ponašanjem tumora. Amplifikacija ErbB(erythroblastic leukemia viral oncogenehomologue) familije proteina koja kod ljudi uključuje četiri člana Her1 (EGFR, ErbB1), Her2 (Neu, ErbB2), Her3 (ErbB3) i Her4 (ErbB4), MET (met proto-oncogene), MYC (myc proto-oncogene) i FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) gena je povezana sa lošijom prognozom kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha, a takođe, amplifikacija gena je identifikovana kao jedan od mehanizama rezistencije na terapiju (31).

#### *1.4.2.1. EGFR amplifikacija*

Određivanje broja kopija EGFR gena pomoću fluorescentne in situ hibridizacije ima prognostički i dijagnostički značaj kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha. Tumori sa velikim brojem kopija gena za EGFR predstavljaju 30% nesitnoćelijskog karcinoma bronha. Za razliku od EGFR mutacija koje su povezane sa prisustvom određenih kliničko-patoloških karakteristika kao što su pripadnost Azijatskoj rasi, ženski pol, negativan pušački status i histološki tip adenokarcinoma, prisustvo povećanog broja kopija gena za EGFR nije povezano sa prisustvom određenih kliničko-patoloških karakteristika. Karcinom bronha sa velikim brojem kopija gena za EGFR pokazuje lošiju prognozu u odnosu na karcinom bronha sa malim brojem kopija kako u uznapređovalom tako i u ranom stadijumu bolesti. EGFR amplifikacija uglavnom postoji istovremeno sa EGFR mutacijama kod adenokarcinoma bronha, što sugerise da prvo dolazi do pojave mutacije, a nakon toga do amplifikacije gena tokom progresije tumora i njegovog metastaziranja. Ova hipoteza je jasno ilustrovana u kliničkoj studiji IPASS (Iressa Pan-Asia Study) u kojoj je primećeno slaganje između EGFR mutacija i visokog broja kopija gena kod skoro 90% bolesnika. Međutim, iako je broj kopija EGFR gena ispitivan kao prediktivni biomarker za osetljivost tumora na EGFR tirozin kinaza inhibitore u nekoliko studija, njegova prediktivna uloga i dalje ostaje dovoljno nerazjašnjena. Analizom IPASS studije pokazano je da je prediktivna vrednost EGFR amplifikacije bila zavisna

od prisustva EGFR mutacije. Pa ipak, slično mehanizmu EGFR mutacija, amplifikacija EGFR gena može u potpunosti aktivirati EGFR tirozin kinazu i njen nishodni signalni put (32, 33).

#### *1.4.2.2. ERBB2 amplifikacija*

ERBB2 je takođe član familije EGFR tirozin kinaza. Amplifikacija ERBB2 gena, mapirana na 17q11.2-q12 je primećena kod oko 2% neselektovanih nesitnoćelijskih karcinoma bronha sa porastom učestalosti i do 11% kod loše diferentovanih adenokarcinoma. Postoje podaci da otprilike 40% tumora sa ERBB2 amplifikacijom poseduje istovremeno i EGFR amplifikaciju ili EGFR mutaciju. ERBB2 amplifikacija dobro korelira sa prekomernom ekspresijom proteina c-erbB2 i povezana je sa većim stepenom diferencijacije tumora, sa višim stadijumom bolesti i kraćim preživljavanjem. Nažalost, ovaj receptor, kao potencijalna meta za ciljanu terapijuse nije pokazao najbolje. Lek trastuzumab u kombinaciji sa gemcitabinom i cisplatinom nije omogućio benefit za bolesnike sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha čiji su tumori imali ERBB2 amplifikaciji ili prekomernu ekspresiju. Međutim, velik broj kopija gena ERBB2 ima pozitivan efekat na efikasnost EGFR tirozin kinaza inhibitora u prisustvu EGFR mutacije i/ili amplifikacije što bi moglo da ima značaj kod preciznije selekcije bolesnika koji bi imali najveći benefit od primene EGFR tirozin kinaza inhibitora (29,34).

#### *1.4.2.3. MET amplifikacija*

MET, proto-onkogen lokalizovan na 7q31, kodira transmembranski tirozin kinaza receptor za faktor rasta hepatocita (HGF - Hepatocyte growth factor). Vezivanje HGF za MET dovodi do strukturalnih promena koje kao rezultat imaju aktivaciju MET tirozin kinaze kao i velikog broja signalnih puteva. Studije pokazuju da MET amplifikacija doprinosi rastu i preživljavanju karcinoma bronha. Učestalost MET amplifikacije je retka i prisutna je u svega 1.4% do 7.3% bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha. Visok nivo MET amplifikacije je povezan sa višim stepenom diferencijacije tumora i sa višim stadijumom bolesti. MET amplifikacija je češće

povezana sa prisustvom EGFR amplifikacije, najverovatnije zbog toga što se oba gena nalaze na hromozomu 7. Kod bolesnika sa ranim stadijumom karcinoma bronha koji je hirurški operisan, prisustvo MET amplifikacije se pokazao kao negativan prognostički faktor u pogledu preživljavanja. Prisustvo MET amplifikacije, na visokom nivou, u linijama ćelija koje su rezistentne na EGFR tirozin kinaza inhibitore sugerise da bi prisustvo MET amplifikacije moglo igrati važnu ulogu u primarnoj rezistenciji na EGFR tirozin kinaza inhibitore. Sa druge strane, MET amplifikacija je prisutna u oko 20% tumora sa stečenom rezistencijom na EGFR tirozin kinaza inhibitore. Smatra se da nesitnoćelijski karcinom bronha prevazilazi rezistenciju na EGFR tirozin kinaza inhibitore preko MET amplifikacije, aktivacije ERBB3 člana EGFR familije reseptora i PI3K/AKT signalnog puta za preživljavanje ćelija (29, 35).

#### *1.4.2.4. PIK3CA amplifikacija*

PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) je glavni signalni put koji učestvuje u održavanju rasta, preživljavanja, mobilnosti i metabolizma ćelija raka. Amplifikacija PI3K se češće javlja kod pripadnika muškog pola, pušača i histološki prisutnog skvamoznog karcinoma. Generalno, učestalost amplifikacije gena PIK3CA kod skvamoznog karcinoma iznosi od 33% do 70%, dok kod adenokarcinoma iznosi od 2% do 19%. Veliki broj kopija gena PIK3CA je prisutan isključivo kod skvamoznog karcinoma. Takođe, prisustvo amplifikacije PIK3CA je učestalije nego prisustvo genomskih mutacija kod karcinoma bronha. Prisustvo amplifikacije gena PIK3CA sa EGFR i KRAS mutacijama u tumorskim ćelijama je učestalije kod skvamoznog karcinoma nego kod adenokarcinoma. Značaj PI3K signalnog puta kao terapijskog cilja kod skvamoznog karcinoma bronha je ispitivana od strane *Cancer Genome Atlas Research Network* kada je utvrđena učestalost alteracije PI3K/AKT u 47% tumora, a kod čak 38% tumora utvrđeno je prisustvo PIK3CA amplifikacije. Ovaj nalaz je bio veoma zanimljiv s obzirom na činjenicu da je ciljana terapija pokazana efikasnost jedino kod adenokarcinoma. Povezanost histološkog tipa skvamoznog karcinoma bronha i PI3K signalnog puta se trenutno ispituje u kliničkim studijama sa PI3K inhibitorima. Što se tiče somatskih mutacija gena PIK3CA, one su zastupljene u svega 1-3% slučajeva nesitnoćelijskog karcinoma bronha i u pogledu tipa nesitnoćelijskog karcinoma bronha, češće su kod skvamoznog karcinoma nego kod adenokarcinoma (36,37).

#### 1.4.2.5. *FGFR1* amplifikacija

Familija FGFR tirozin kinaza se sastoji od 4 kinaze (FGFR 1-4) i igra važnu ulogu u ćelijskom rastu, preživljavanju i rezisenciji na hemioterapiju. Amplifikacija FGFR lokusa na hromozomu 8p12 je opisana kod nekoliko tipova tumora. Kod karcinoma bronha, FGFR amplifikacija je učestalija kod skvamoznog karcinoma nego kod adenokarcinoma, a incidenca FGFR amplifikacije kod skvamoznog karcinoma bronha iznosi i do 25%. Postoje podaci da je FGFR1 amplifikacija povezana sa pušačkim statusom i to u dozno zavistnom obliku što bi moglo da znači da je FGFR1 amplifikacija onkogeno aberacija nastala pod uticajem duvanskog dima iz cigareta. FGFR1 amplifikacija dovodi do aktivacije nishodnih signalnih puteva PI3K/AKT i RAS/MAPK tako da FGFR1 selektivna inhibicija dovodi do apoptoze ćelija raka kod kojih postoji amplifikacija FGFR1 gena. Amplifikacija FGFR1 gena ima i značajnu prognostičku ulogu. Naime, pokazano je da bolesnici kod kojih je skvamozni karcinom bronha u ranom stadijumu hirurški odstranjen imaju lošije preživljavanje mada postoje i podaci da prisustvo amplifikacije FGFR1 nema nikakav uticaj na preživljavanje. Određivanje FGFR1 amplifikacije kao i efikasnost ciljane terapije sa FGF/FGFR inhibitorima se trenutno ispituje u okviru kliničkih studija (38).

### 1.4.3. Strukturne promene koje vode onkogenezi putem fuzije gena

#### 1.4.3.1. *ALK* fuzija

Tokom 2007 godine *Soda* i saradnici su otkrili fuziju gena koja se sastoji od EML4 (Echinoderm Microtubule Associated protein Like 4) dela i ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) dela u maloj podgrupi nesitnoćelijskog karcinoma bronha. Endogeno, ALK gen se normalno ne eksprimuje u većini adultnih tkiva uključujući i tkivo pluća, međutim, EML4-ALK fuzija vodi ektopičnoj ekspresiji i konstitutivnoj aktivaciji kinaze anaplastičnog limfoma i njegovih nishodnih signalnih puteva što sve dovodi do nekontrolisane ćelijske proliferacije i preživljavanja. Učestalost ALK fuzije, odnosno rearanžmana, kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha je oko 4% (od 1.5% do 7.5%) što predstavlja oko 40000 novih slučajeva u svetu godišnje. ALK fuzija nastaje kao rezultat različitih tipova hromozomskog rearanžmana, a svi oni vode aberantnoj aktivaciji ALK-a. EML4-ALK fuzija je najčešći tip fuzije kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha i rezultat je paracentrične

inverzije (intrahromozomskog rearanžmana) koji uključuje kraći krak hromozoma 2. Mnoge studije pokazale su i druge, ređe, partnere kinaze anaplastičnog limfoma kao što su KIF5B (kinesin family member 5B), TFG (TRK-fused gene), KLC1 (kinesin light chain 1) i drugi. Uprkos postojanja različitih partnera za ALK fuziju, većina njih vodi ligand nezavisnoj aktivaciji tirozin kinaze. Do danas je, kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha, identifikovano oko 20 EML4-ALK varijanti. Svi EML4-ALK fuzionni proteini sadrže intracelularni tirozin kinazni domen ALK-a. Nije poznato da li neka određena EML4-ALK varijanta ima bolju ili lošiju senzitivnost na ALK inhibitore. Svi ALK rearanžmani detektuju se, na prvom mestu, pomoću fluorescentne in situ hibridizacije, mada se danas koriste i imunohistohemijske metode kao i polimeraza lančana reakcija. Polimeraza lančana reakcija je potencijalno brza dijagnostička metoda sa visokom senzitivnošću, međutim, poteškoće u dobijanju visoko kvalitetne DNK ograničava kliničku upotrebu ove metode. Senzitivnost imunohistohemije zavisi od afiniteta antitela koja se koriste za detekciju ALK fuzije, mada i pored toga senzitivnost i specifičnost ove metode se kreće od 90% do 100% i od 95% do 98%, respektivno (39,40).

#### *1.4.3.2. ROS1 fuzija*

Prisustvo rearanžmana ROS1 gena (c-ros oncogene 1) u tumorskim ćelijama bolesnika sa adenokarcinomom bronha se u poslednje vreme izdvaja kao posebna molekularna grupa kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha. ROS1 rearanžman rezultuje formiranjem fuzionih proteina koji vode konstitutivnoj aktivaciji domena tirozin kinaze i koji sledstveno aktiviraju nishodne signalne puteve poput PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK i STAT3, dovodeći do nekontrolisanog ćelijskog rasta, preživljavanja, i izbegavanja apoptoze. ALK rearanžmani ROS1 rearanžman su veoma slični što potvrđuje podatak da oni zapravo dele čak 49% aminokiselinskih sekvenci u tirozin kinaznom domenu. Poput ALK-a, detekcija ROS1 rearanžmana se vrši fluorescentnom in situ hibridizacijom ali i drugim metodama, a do danas je detektovano devet partnera koji učestvuju u ROS1 rearanžmanu kod adenokarcinoma bronha. Ono što je takođe primećeno za ROS1 rearanžman je to da se on izuzetno retko može naći istovremeno prisutan sa EGFR, KRAS mutacijama ili ALK fuzijom što praktično znači da je prisustvo ROS1 rearanžmana uzajamno isključivo sa prethodno pomenutim genskim alteracijama (41,42).



### 1.4.3.3. RET fuzija

RET (Ret proto-oncogene) kodira receptor tirozin kinaze koji pripada familiji neurotrofnih faktora. Prisustvo RET rearanžmana je detektovano u tumorskim ćelijama bolesnika sa nesitnoćelijskog karcinoma bronha i do danas su poznata 4 fuzionarna partnera za RET i to su RET-KIF5B, CCDC6 (coiled-coil domain containing 6), TRIM33 (tripartite motif containing 33) i NCOA4 (nuclear receptor coactivator 4), a oni su detektovani kod adenokarcinoma bronha. RET-KIF5B je najčešća varijanta RET rearanžmana i prisutan je u oko 90% slučajeva. U ovom slučaju tačka prekida je u eksonu 15 i 16 ili 22-24 za KIF5B, a u eksonu 8, 11 ili 12 za RET. Učestalost RET rearanžmana kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha je veoma niska i kreće se od 0.9% do 1.9% kod nesitnoćelijskog karcinoma, dok je u podtipu adenokarcinoma učestalost od 1.2% do 2%. Uprkos niskoj incidenci RET rearanžmana, značaj u njegovom određivanju može biti veliki s obzirom da je ustanovljeno da se RET rearanžman gotovo nikada ne nalazi istovremeno prisutan sa drugim genomskim mutacijama poput EGFR, KRAS, ERBB2, BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) ili EML4-ALK fuzijom. Za RET rearanžman je takođe dokazano da ima snažnu povezanost sa pušačkim statusom u tom smislu što je preko 80% RET rearanžmana prisutno kod nepušača. Za detekciju RET rearanžmana danas se koriste PCR, IHC i FISH. PCR metoda je visoko senzitivna, relativno jeftina i lako dostupna, ali pomoću nje se mogu detektovati samo već poznate varijante RET rearanžmana. Imunohistohemijsko određivanje RET rearanžmana je problematično s obzirom da ne postoji jasna razlika prilikom bojenja RET pozitivnih i RET negativnih tumora. RET rearanžman kao potencijalna meta za ciljanu terapiju se trenutno ispituje u brojnim kliničkim studijama sa malim molekulima tirozin kinaza inhibitora koji su prethodno pokazali određenu aktivnost in vitro (43,44).

### 1.4.4. Mutacije kod karcinoma bronha

Spoznaja o postojanju genskih alteracija u ćelijama tumora dovela je do zaključka da bi benefit od molekularne ciljane terapije mogli imati oni bolesnici u čijim tumorskim ćelijama postoje one alteracije koje su osjetljive na dejstvo ciljane terapije. S obzirom da se u tumorima akumulira niz

različitih genskih alteracija, analiza sekvence kancerskog genoma igra ključnu ulogu u unapređivanju našeg razumevanja biologije kancera, dijagnostike i terapije. Ultimativni cilj je razvijanje personalizovane terapije, skrojene prema individualnim karakteristikama svakog bolesnika, a bazirane na prediktivnim faktorima i toksičnosti.

Mutacije se definišu kao promene u normalnom redosledu parova baza. Za razliku od urođenih mutacija koje se prenose sa roditeljskih ćelija na ćelije potomaka, normalne ćelije našeg organizma stiču somatske mutacije tokom procesa deobe tokom postnatalnog života i te mutacije nisu nasledne. Mutacije predstavljaju promene DNK sekvence koje uključuju zamene baza, promene u broju kopija (amplifikacije ili delecije), i strukturalne promene (translokacije ili hromozomski rearanžman). Tačkaste mutacije ili zamena jedne baze (SNV - single nucleotide variants) su najčešće DNK alteracije koje mogu dovesti do ispoljavanja različitih efekata. Tihe mutacije (Silent mutations) menjaju DNK sekvencu bez detektabilnog efekta na fenotip. U oba slučaja, smislenih mutacija (Sense mutations) i besmislenih mutacija (Nonsense mutations), postoji zamena jedne aminokiseline za drugu. Mutacije okvira čitanja (Frameshift mutations) nastaju dodavanjem ili oduzimanjem nukleotida i na taj način dovode do pogrešnog očitavanja okvira koji se sastoji od grupa od po tri baze za svaku aminokiselinu. Ove mutacije dovode do pojave smislenih ili besmislenih alteracija kodona što u nastavku dovodi do pojave aberantnih i nefunkcionalnih proteina. Proces od prekursora mRNK (messenger RNA) do zrele forme RNK odvija se uklanjanjem introna i dodavanjem eksona u procesu koji se naziva spajanje (eng. Splicing). Mutacije prilikom spajanja nastaju kao posledica promene na specifičnom mestu introna dovodeći do prisustva introna, jednog ili više njih, u zreloj mRNK što kasnije dovodi do pojave aberantnih i nefunkcionalnih proteina. Promene u broju kopija su promene u broju gena od dve kopije koje su normalno prisutne u diploidnom genomu. Rearanžmani nastaju kada se DNK jednog segmenta odvoji i spoji na DNK segment negde drugde u genomu bilo na istom ili drugom hromozomu i u zavisnosti od toga postoje intrahromozomalne translokacije ili interhromozomalne translokacije (45).

Iako somatske mutacije nastaju nasumično u celom genomu, podgrupa somatskih mutacija nastaje u ključnom setu gena dovodeći do prednosti rasta. Ove pogonske mutacije (Driver mutations) podležu pozitivnoj selekciji tokom evolucije kancera i uključene su u onkogenezu. Prolazne mutacije (Passenger mutations) sa druge strane, nastaju tokom deobe ćelije i biološki su inertne.

Jedan od najvažnijih izazova u studijama na kancerskom genomu jeste razlikovanje pogonskih od prolaznih mutacija (45).

## 1.5. PREGLED GENOMSKE TEHNOLOGIJE

### 1.5.1. Sekvencioniranje prve generacije (First-Generation Sequencing)

Sekvencioniranje DNK je proces preciznog određivanja redosleda nukleotida unutar DNK molekule. Među prvim metodama DNK sekvencioniranja, poznato i kao sekvencioniranje prve generacije, najuspešnija je bilo Sangerovo sekvencioniranje. Prvi korak prilikom sekvencioniranja prema Sangerovom metodu je preparacija identične jednolančane DNK sa kratkim oligonukleotidom zakačenim na istu poziciju u svakom molekulu. Ovaj kratak oligonukleotid ima ulogu prajmera za DNK sintezu i komplementaran je jednolančanoj DNK koja ima ulogu šablona. Obe DNK se potom inkubiraju sa DNK polimerazom uz prisustvo mešavine četiri deoksinukleotid trifosfata (dNTPs - deoxynucleotide triphosphates; dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i malom količinom istih deoksinukleotid trifosfata obeleženih fosforom (P) - ddNTPs. S obzirom na DNK polimeraza ne pravi razliku između dNTPs i ddNTPs, značajno veća količina dNTPs omogućava inkorporaciju nekoliko stotina nukleotida pre nego što dođe do inkorporacije ddNTP, a kao rezultat togadobijama grupu novih molekula različite dužine. Svaki od tih novih molekula se završava sa ddNTP kao indikacija da je nukleotid prisutan na ekvivalentnom mestu u odnosu na DNK šablon. Mešavina sa svakom od ddNTPs se ubacuje u jednu od četiri paralelene ploče od poliakrilamida gde se molekuli razdvajaju u odnosu na njihovu molekularnu masu i na taj način omogućavaju određivanje DNK sekvence vizualizacijom traka pomoću autoradiografije. Autoradiografija je postala metoda izbora prilikom DNK sekvencioniranja zahvaljujući njenoj lakoj izvodljivosti i pouzdanosti u odnosu na druge tehnologije. Napredak u fluorescentnoj tehnologiji danas omogućuje obeležavanje terminalnih ddNTPs sa fluorescentnim bojama i razvoj automatskog sekvencioniranja. Otkriće termostabilne DNK polimeraze dovelo je do unapređenja Sangerove metode sledstvenim razvojem polimeraza lančane reakcije (PCR - Polymerase Chain Reaction) i termalnog sekvencioniranja. Ciklus termalnog sekvencioniranja ima nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalni pristup, a to se ogleda pre svega u tome što ovaj metod koristi dvolančanu DNK

umesto jednolančane te na taj način zahteva manju količinu DNK. Proces rada modernog metoda sekvencioniranja prema Sangeru uključuje kombinaciju PCR, deoksinukleotide i ddNTPs svaki obeležen posebnom bojom koja se specifična za svaku bazu. Bojom obeleženi fragmenti različite dužine tokom prolaska kroz region njihove detekcije se razdvajaju putem kapilarne elektroforeze u skladu sa njihovom veličinom, a fluorofore bivaju ekscitirane putem laserskih zraka u sekvenceru emitujući na taj način fluorescenciju četiri različite boje što se koristi za određivanje redosleda baza u DNK sekvenci (46).

Uprkos efikasnosti i velikoj preciznosti, a takođe i značajnim unapređenjima od samog uvođenja ove metode sekvencioniranja, prva generacija sekvencioniranja je ograničena njenom visokom cenom, velikim obimom posla i velikom količinom utrošenog vremena sa mali protok što se definiše kao mala količina podataka po jedinici vremena. Ova metoda može maksimalno proizvesti 48 kilobaza (kb) na svaka dva sata i kao takva pogodna je sekvencioniranje nižih organizama dok nije naročito pogodna za sekvencioniranje ljudskog genoma koji se sastoji od otprilike 3 gigabaze (gb).

### 1.5.2. Sekvencioniranje sledeće generacije (NGS - Next-Generation Sequencing)

Sekvencioniranje sledeće generacije (NGS) predstavlja širok pojam koji opisuje različite tehnologije koje imaju karakteristiku velikog protoka, niske cene i značajno bržeg sekvencioniranja u poređenju sa prvom generacijom. I dok metoda sekvencioniranja prema Sangeru omogućava ispitivanje samo jednog modaliteta genskih alteracija koje se dešavaju u kancerskoj ćeliji, NGS omogućava istovremenu detekciju svih genomskih alteracija, uključujući mutacije, promene u broju kopija, promene u ekspresiji gena i sve to u razumnom vremenskom okviru. Veliko paralelno sekvencioniranje (MPS - Massive parallel sequencing) doprinelo je postizanju velikog broja pročitanih sekvenci što je sledstveno dovelo do većeg protoka i značajnog sniženja cene. Prve platforme koje su postale komercijalno dostupne koristile su pirosekvencioniranje (eng. pyrosequencing) kao alternativnu metodu DNK sekvencioniranja baziranu na merenju neorganoskog pirofosfata (pyrophosphate - PPi) koji se generiše tokom sinteze DNK. U ovoj metodi, DNK fragment od interesa, prajmer sekvencioniranje se metodom hibridizacije pripaja jednolančanoj DNK i potom inkubira sa DNK polimerazom, adenzin

trifosfat (ATP) surfulirazom, luciferazom i enzimima za degradaciju nukleotida. Deoksinukleotidi se dodaju u ponovljenim ciklusima i inkorporiraju u rastući DNK lanac na komplementarnim mestima u odnosi na DNK šablon lanac. Tokom ovog procesa pirofosfat se oslobađa u ekvivalentnoj količini sa inkorporiranim deoksinukleotidima. ATP surfuliraza katalizuje reakciju konverzije PPi i adozin fosfosulfata u ATP i sulfat. ATP obezbeđuje energiju za oksidaciju luciferina u oksiluciferin uz pomoć luciferaze, dovodeći do nastanka svetlosti koja se može detektovati pomoći foto-diode ili CCD kamera (Charged Couple Device camera). Inkorporirani deoksinukleotidi podležu degradaciji između ciklusa uz pomoć enzima za degradaciju nukleotida, najčešće apiraze. Ukupna reakcija polimerizacije na sobnoj temperaturi traje ok 3 do 4 sekunde (47,48).

### 1.5.3. Upotreba sekvencioniranja genoma

#### *1.5.3.1. Sekvencioniranje celog genoma (Whole-Genom Sequencing)*

Sekvencioniranje celog genoma (Whole-Genom Sequencing - WGS) predstavlja analizu kompletne DNK sekvence od jednom, obezbeđujući najobimniju karakterizaciju genoma. Sekvencioniranje celog genoma je postalo dostupno nakon objavljivanja projekta humanog genoma (Human Genome Project) koji je generisao reference za sekvencioniranje humanog genoma i natak način omogućena je detekcija velikog broja genomskih alteracija kao i nekodirajućih somatskih mutacija. Prvi put sekvenca kancerskog genoma je objavljena 2008 godine kod bolesnika sa citogenetski normalnom akutnom mijeloidnom leukemijom. Ubrzo nakon toga počele su studije sa sekvencioniranjem genoma karcinoma bronha (46,49).

#### *1.5.3.2. Ciljano sekvencioniranje (targeted Sequencing)*

Ciljano sekvencioniranje je alternativa sekvencioniranju celog genoma koja omogućava generisanje manje tzv. sirovih sekvenci, ali povećanu pokrivenost regiona od interesa uz manju cenu troškova. Sekvencioniranje celog eksoma (WES - Whole-exome sequencing) je proces koji se koristi sa evaluaciju malog procenta genoma koji kodira proteine. Još jedan značajan pristup je upotreba tzv. kancer specifičnih panela u kojima se sekvencioniraju prethodno selektovani geni.

Ciljano sekvencioniranje se može izvesti i upotrebom *multiplex PCR*, koji simultano vrši amplifikaciju dve ili više ciljane DNK sa jedinstveno obeleženom sondom u jednom reakcionom sudu. Neki od benefita ove metode su smanjena količina potrebnog materijala, kraće vreme trajanja analize, niža cena u odnosi na *singleplex* metode. Tokom 2009. i 2010. godine Sequist i saradnici su metodom ciljanog sekvencioniranja analizirali 552 nesitnoćelijska karcinoma, a panel za testiranje je obuhvatao 16 gena, i to: AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog1), APC (adenomatous polyposis coli), BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B), ERBB2 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3), EGFR (epidermal growth factor receptor), IDH1 (isocitrate dehydrogenase 1), JAK2 (Janus kinase 2), KIT (v-kit Hardy Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog), KRAS (Kirsten rat sarcoma), NOTCH1, NRAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog), PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3.kinase, catalytic subunit alpha), PTEN (phosphatase and tensin homolog), TP53 (tumor protein 53), a takođe je vršena analiza prisustva ALK translokacije (50). Kod 170 bolesnika je detektovano prisustvo mutacija pogodnih za lečenje ciljanom terapijom i oni su, u skladu sa detektovanom mutacijom, uključeni u lečenje u okviru kliničkih studija.

#### *1.5.3.3. Transkriptom (Transcriptome)*

Transkriptom predstavlja kompletan set informacione RNK (mRNA) i nekodirajućih RNK transkripta proizvedenih u ćeliji. Najdirektniji metod određivanja transkriptoma je konverzija informacione RNK u komplementarnu DNK (cDNA) nakon čega sledi sekvencioniranje klona. Poređenje između cDNA i genomske sekvence će dovesti do identifikacije gena čija informaciona RNK je prisutna u transkriptomu. Sa razvojem NGS platformi, došlo je do značajnog porasta protoka i mogućnosti identifikacije aberantnih sekvenci i nekodirajućih RNK čije se molekule transkribuju sa genomske DNK bez sledstvene translacije u proteine uključujući i mikroRNK (microRNA), malih interferirajućih RNK (small interfering RNA) i dugih nekodirajućih RNK (51).

#### *1.5.3.4. Epigenom (Epigenome)*

Epigenom je kompletan zapis hemijskih modifikacija na DNK i histonskim proteinima koji reguliše ekspresiju proteina unutar genoma. Ove modifikacije nastaju bez unutrašnjih promena u

samoj primarnoj sekvenci DNK i neophodne su za ključne biološke procese, uključujući diferencijaciju, genomsko utiskivanje jednog od dva alela gena roditelja kako bi osigurali monoalelsku ekspresiju i prigušivanje velikih hromozomskih domena poput X hromozoma. Najčešći mehanizam epigenetske modifikacije obuhvataju DNK metilaciju, modifikaciju histona i transkripciju malih nekodirajućih RNK. DNK metilacija promotor gena je posredovana DNK metiltransferazom i vodi prigušivanju direktnom inhibicijom transkripcije vezujućeg faktora za njegovo odgovarajuće mesto. Čelije kancera generalno ispoljavaju globalu hipometilaciju i promotor specifičnu hipermetilaciju. Globalna hipometilacija je odgovorna za aktivaciju proto-onkogeni i gubitak alaleskog utiskivanja dok je promotor hipermetilacija odgovorna za smanjenu gensku ekspresiju, dovodeći do pojave alternativnih puteva za prigušivanje ključnih tumor supresor gena. Epigenetske modifikacije su uključene u dodavanje druge šanse za inicijaciju kancera preko prigušivanja preostalih aktivnih alela prethodno mutiranih tumor supresor gena (52,53).

#### *1.5.3.5. Upotreba NGS kod adenokarcinoma bronha*

Nekoliko studija je ispitivalo primenu NGS platformi kod adenokarcinoma bronha. Imielinski i saradnici su uradili kombinaciju WES i WGS na 183 plućna adenokarcinoma i poredili to sa normalnim tkivom iz okoline tumora. Studija je obuhvatila 159 uzoraka u kojima je urađen samo WES, u 23 uzorka urađen je i WES i WGS, a u samo jednom uzorku urađen je WGS. Eksonske mutacije su bile značajno učestalije kod pušača nego kod nepušača, a najčešći obrazac mutacija je bio C (citozin)-u-T (timin) tranzicija i C (citozin)-u-A (adenin) transverzija. Dvadeset i pet gena je bilo značajno mutirano u kohorti, a samo dva su bila udružena sa značajnim smanjenjem preživljavanja bez progresije. Govindan i saradnici su evaluirali WGS i transkriptom 17 bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha, 16 adenokarcinoma i 1 krupnoćelijski karcinom. Onovni cilj ove studije bio je da se uporede genomski profili pušača i nepušača. Populacija ispitanika se sastojala od 12 pušača od kojih je jedan bio umeren pušač (eng. light smoker) i 5 nepušača. Broj tačkastih mutacija po jednoj megabazi (Mb) je bio značajno veći kod pušača (medijana 10.5 po Mb) nego kod nepušača (0.6 po Mb), a jedini ispitanik koji je bio umereni pušač je imo 0.3 mutacije po Mb. Karakteristike samih mutacija su se takođe razlikovale u odnosu na pušački status sa C (citozin)-u-A (adenine) transverzijom koja je nađena dominantno kod pušača i C (citozin)-u-T (timin) tranzicijom kod nepušača. U proseku je bilo 11 mutacija koje su mogle biti tretirane

lekovima, za svakog bolesnika. Sekvencioniranje transkriptoma otkrilo je 14 visoko pouzdanih fuzija uključujući i novu KDELR2-ROS1 fuziju koja je detektovana kod nepušača, a koja bi mogla biti prediktor osetljivosti na terapiju lekom krizotinib. Ciljano sekvencioniranje sa visokim brojem proverâ pročitanih sekvenci, sa ciljem da se validiraju promene detektovane sekvencioniranjem celog genoma, omogućilo je i procenu promena u frekvenci alela (VAFs - variant allele frequencies). Na osnovu distribucije VAFs moguće je odrediti broj i veličinu klonalne populacije u svakom tumoru posebno. Deset tumora imalo je multiklonalni obrazac dok je sedam tumora imalo monoklonalni obrazac, bez jasne razlike u odnosu na pušački status. Ovakav pronalazak sugerise da bi u budućnosti terapiju trebalo usmeriti na dominantne klonove i subklonove, jer ciljanje samo dominantnih klonova dovodi na kraju do neuspeha usled selekcije slabije tretirane populacije kancerskih ćelija (29).

#### 1.5.4. Nove tehnologije - Sekvencioniranje treće generacije (Third-Generation Sequencing)

Uprkos značajno povećanom protoku koji je omogućio NGS, vreme do dobijanja rezultata je i dalje dugačko kao posledica velikog broja skeniranja. Sekvencioniranje treće generacije ili sekvencioniranje jednog molekula (single-molecule sequencing - SMS) predstavlja analizu sekvence pojedinačnog molekula bez prethodnog kloniranja. Ovakav pristup ima određenih prednosti u odnosu na NGS, pre svega u prevazilaženju potencijalnih greški tokom PCR amplifikacije, a to doprinosi povećanoj dužini čitanja i skraćenom vremenu do rezultata. Još jedna od prednosti sekvencioniranja treće generacije je manja količina potrebnog materijala za analizu što je naročito značajno za bolesnike sa ne resektabilnim tumorima gde su uzorci tkiva uglavnom mali za NGS. Dve najrazvijenije SMS platforme su Heliscope i Pacific Biosciences. Obe platforme koriste tehnologiju koja se bazira na laserom ekcitiranom fluorescentnom signalu sa obeleženih nukleotida (54).



### 1.5.5. Kliničke implikacije NGS platformi

Jedna od prednosti velike akumulacije podataka o kancerskom genomu je unapređenje razumevanja biologije kancera sa ciljem razvijanja novih klinički relevantnih lekova. Upotreba genomskih informacija je značajno promenila dizajn kliničkih studija iz domena karcinoma bronha, sa sve većom upotrebom ciljane terapije za one bolesnike koji bi trebalo da imaju najveći benefit, a sve to na osnovu prisutnih specifičnih molekularnih abnormalnosti. Iako je nekoliko gena izmenjeno u značajnom broju tumora i otkriveno pomoću sekvencioniranja prve generacije i ili citogenetskim analizama, ostaje veliki broj gena koji su izmenjeni u manjim frekvencama i koji se teže detektuju prvenstveno zbog sekvencioniranja ograničenog broja gena u velikim kohortama ispitanika ili svih kodiranih gena kod malog broja ispitanika. Primena NGS platformi sa integrisanom analizom genoma, transkriptoma i epigenoma omogućuje obimniji pristupispitovanja tumorigeneze sa mogućnošću detekcije abnormalnosti koje su manje učestale i za koje postoji mala šansa da bi se otkrile sekvencioniranjem prve generacije (55).

### 1.6. Prognostički faktori

Prognostički faktor se definiše kao faktor, određen pre započetog tretmana, koji ima uticaj na bolesnikov ishod nezavisno od vrste primenjenog tretmana. Kada se govori o prognostičkim faktorima u onkologiji, za ishod bolesnika najčešće se uzima preživljavanje (ukupno preživljavanje - Overall survival - OS), preživljavanje bez progresije bolesti (Progression free survival - PFS) kod bolesnika koji nisu podobni za hirurško lečenje i preživljavanje bez povratka bolesti (Disease free survival - DFS) kod bolesnika koji su podvrgnuti radikalnom hirurškom tretmanu.

Prognostički faktori imaju više uloga, a neke od najznačajnijih su: uloga u individualnoj prognozi bolesnika, uloga u odabiru odgovarajuće terapije, omogučuvavanje poređenja različitih grupa bolesnika, definisanje ulaznih kriterijuma u kliničkim ispitivanjima, a određeni prognostički faktori mogu omogućiti bolji uvid u proces bolesti i usmeriti buduća istraživanja

Prognostički faktori se klasifikuju na sledeći način:

- Anatomska proširenost bolesti: opisuje proširenost osnovne bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Standardno ona podrazumeva TNM klasifikaciju ali može da uključuje i određivanje tumor markera kao što su PSA kod karcinoma prostate i CEA kod kolorektalnog karcinoma.
- Profil tumora: uključuje patološke (gradus/stepen diferencijacije) i molekularne osobine tumora, kao i obrazce genetske ekspresije. Ovi faktori mogu biti prediktivni, prognostički ili prateći dijagnostički markeri.
- Profil pacijenta: uključuje faktore koje se odnose na bolesnika. Tu spadaju demografski (npr. pol i starost) i stečeni faktori (npr. imunodeficijencija i performans status).
- Okruženje: se odnosi na dostupnost, i kvalitet terapijskih modaliteta.

Kada se govori o prognostičkim faktorima važno je naglasiti na koji ishod utiču i u kom trenutku toka bolesti. Anatomska proširenost osnovne bolesti, na primer, koja se koristi u TNM klasifikaciji, je prognostički faktor za dužinu preživljavanja (56).

## 1.6.1. Prognostički faktori kod karcinoma bronha

### *1.6.1.1. Stadijum bolesti*

Najzastupljeniji i najviše korišćen prognostički faktor kod karcinoma bronha je stadijum bolesti prema TNM klasifikaciji. Ovo je ujedno i faktor koji je na prvom mestu kada se planira terapija bolesnika sa karcinomom bronha. Prema kliničkom stadijumu bolesti petogodišnje preživljavanje za bolesnike u IA stadijumu iznosi u preko 50%, dok je za bolesnike u IV stadijumu bolesti petogodišnje preživljavanje manje od 5% (18).

### *1.6.1.2. Performans status*

Performans status drugi najčešće korišćen prognostički faktor. Za odrađivanje performans statusa onkoloških bolesnika najčešće su u upotrebi dve skale, ECOG (Eastern Cooperative Oncology

Group skala i Karnofsky skala (57,58). ECOG/ skala je najčešće u upotrebi. Ova skala ima raspon od 0 do 5, gde 0 predstavlja bolesnika koji je kompletno pokretan, bez ograničenja i bez simptoma, dok 5 predstavlja smrtni ishod (tabela 5).

Tabela 5. ECOG performans status

Stepen	ECOG performans status
0	Bez tegoba. Potpuno aktivan, izvršava sve životne aktivnosti kao i pre bolesti bez ograničenja
1	Ima simptome, ali je kompletno aktivan. Povremeno ograničen u teškoj fizičkoj aktivnosti. Sposoban za izvršenje lakog posla ili sedeće prirode, npr. lak posao u kući ili kancelarijski posao.
2	Ima simptome. Pokretan i kompletno brine o sebi, ali je radno nesposoban. Van kreveta više od 50 % u toku dana.
3	Ima simptome i u krevetu provodi više od 50% dana, ali nije vezan za postelju. Ograničeno sposoban za zbrinjavanje.
4	Kompletno nesposoban. Ne može da brine o sebi. U potpunosti vezan za stolicu ili krevet.
5	Smrtni ishod

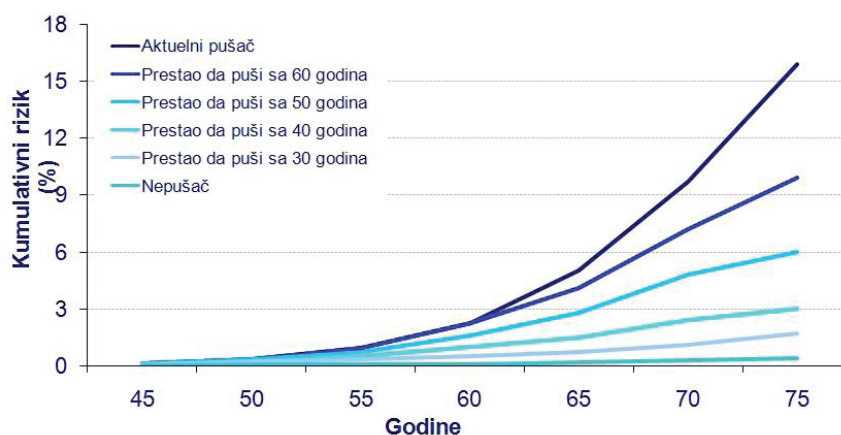
Druga skala koja je nešto manje u upotrebi od ECOG skale je Karnofsky skala koja ima raspon od 10 (moribundan bolesnik) do 100 (kompletno aktivan, bez simptoma).

Za performans status se pokazalo da, pored stadijuma bolesti, predstavlja značajan, nezavistan, prognostički faktor. Bolesnici koji imaju lošiji performans status imaju i lošiju prognozu bolesti, ali i lošije tolerišu primenjenu terapiju u odnosu na bolesnike sa boljim performans statusom (58,59).

### 1.6.1.3 Pušenje

Pušački status jasno predstavlja negativan prognostički faktor kod bolesnika kod kojih je postavljena dijagnoza karcinoma bronha u IIIB i IV stadijumu bolesti. Oko 80% karcinoma bronha kod muškaraca i čak 83% kod žena uzrokovano je pušenjem. Aktuelni pušači imaju 15 puta veći rizik da umru od karcinoma bronha u odnosu na osobe koje nikada u životu nisu pušile. Rizik za

nastanak karcinoma bronha u vezi je sa dužinom pušačkog staža i količinom popušenih cigareta. Pušački staž se meri indeksom pakla-godina i pokazao se kao obrnuto proporcionalan ukupnom preživljavanju kod bolesnika koji boluju od karcinoma bronha. Bolesnici koji su nepušači imaju bolju prognozu u odnosu na bolesnike koji su pušači. Takođe, jasna razlika u preživljavanju postoji i između trenutnih i bivših pušača (58,60). Nepušači imaju bolju prognozu od pušača i kada je u pitanju rani stadijum karcinoma bronha. Nakon hirurškog lečenja nepušači imaju bolje preživljavanje u odnosu na pušače, a takođe imaju i manje postoperativnih komplikacija. Postoje dokazi da početak pušenja u mlađoj dobi nosi dodatne rizike i povećava smrtnost u odnosu na početak pušenja u zreloj dobi dok prestanak pušenja, sa druge strane, donosi značajno poboljšanje zdravlja i smanjuje rizik od nastanka karcinoma bronha čak i kod osoba koje su dugogodišnji pušači (61,62). Pripadnici muškog pola sa dugogodišnjim pušačkim stažom imaju kumulativni rizik od 15.9% za smrt uzrokovanu karcinomom bronha do 75. godine života. Za muškarce koji prestanu da puše u šezdesetoj, pedesetoj, četrdesetoj ili tridesetoj godini života kumulativni rizik za smrt od karcinoma bronha pada na 9.9%, 6%, 3% i 1.7% respektivno. Na grafikonu 5 prikazan je kumulativni rizik za smrt od karcinoma bronha u odnosu na uzrast i prestanak pušenja. Prestanak pušenja kod pripadnica ženskog pola ima iste benefite kao i kod muškaraca, dovodeći do smanjenja kumulativnog rizika za smrt uzrokovanu karcinomom bronha do 75. godina života. Kumulativni rizik kod žena koje su višegodišnji pušači iznosi 9.5%, a pada na 5.3% i 2.2% kod žena koje prestanu da puše u šezdesetoj i pedesetoj godini života respektivno (63,64).



**Grafikon 5.** Efekti prestanka pušenja u određenoj dobi na kumulativni rizik od smrti uzrokovane karcinomom bronha do 75. godine života.

**Izvor:** <https://www.quora.com/How-do-I-know-if-smoking-is-affecting-someones-lungs-Are-there-any-medical-tests>

#### *1.6.1.4. Pol*

Pol kao jedan od fundamentalnih, bioloških faktora svakako privlači pažnju. Epidemija karcinoma bronha kod pripadnika ženskog pola počela je kasnije nego kod pripadnika muškog pola. I dok se kod muškaraca poslednjih godina primećuje pad incidence oboljevanja od karcinoma bronha kod žena je taj broj i dalje u porastu. Svake godine, značajno veći broj muškaraca, u odnosu na žene, umire od karcinoma bronha, međutim razlika između polova konstantno pokazuje trend smanjenja (2,65). Mnoge studije su pokazale da je ženski pol pozitivan prognostički faktor u pogledu preživljavanja od karcinoma bronha bez obzira na stadijum bolesti i druge pridružene faktore kao što su godine starosti, pušački status, histologija tumora (66-68). Da je ženski pol nezavistan, pozitivan prognostički faktor potvrdila je i meta-analiza iz 2011 godine (69). Ova studija obuhvatila je 39 studija sa ukupno 86.800 bolesnika. Rezultati ove studije pokazali su da žene sa karcinomom bronha imaju bolje preživljavanje u odnosu na muškarce bez obzira na primenjenu statističku metodu (univarijantna ili multivarijantna analiza), stadijum bolesti, histološki tip tumora i pušački status.

#### *1.6.1.5. Godine starosti*

Godine starosti su prepoznate kao prognostički faktor kod svih malignih oboljenja, dakle, ne samo kod karcinoma bronha. Uzimajući u obzir činjenicu da je životni vek ljudske populacije u porastu imamo i povećanu incidencu karcinoma bronha u starijoj populaciji. Smatra se da 60% svih bolesnika, koji boluju od karcinoma bronha, spada u grupu starijih od 65 godina, tako da se za karcinom bronha može reći da je bolest koja pripada starijoj populaciji (1,6,70,71). Kada su godine starosti u pitanju onda je grupa bolesnika u starijoj životnoj dobi poseban problem u onkologiji. Tretman ovih bolesnika, iako čine većinu populacije obolele od karcinoma bronha, je često veliki izazov za kliničare i predmet velikih debata. Mogući razlozi za to su pre svega veća učestalost

komorbiditeta kod starije populacije kao i manje očekivana dužina preživljavanja (69). U jednoj retrospektivnoj studiji koja je obuhvatila više od 1.200 bolesnika potvrđena je korelacija između godina starosti i komorbiditeta. Međutim, u pogledu preživljavanja nije bilo značajne razlike između grupe starijih i grupe mlađih bolesnika, iako je gripa starijih primila manje hemioterapije (72).

#### ***1.6.1.6. Ostali prognostički faktori***

U literaturi postoji veliki broj publikacija o potencijalnim biomarkerima kod karcinoma bronha koji se još uvek ne primenjuju rutinski u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Često, nezavisna prognostička vrednost tih potencijalnih biomarkera nije do kraja ustanovljena kao ni njihov odnos sa već dokazanim prognostičkim faktorima. Međutim, za neke od njih je predloženo da imaju pozitivnu prognostičku vrednost: p53 normalans status, odusutvo EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ekspresije, niska VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ekspresija, odsustvo KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) mutacije, TTF1 (Thyroid Transcription Factor - 1) pozitivnost, niska ekspresija klase III beta-tubulina (kod hirurški lečenih bolesnika), i to je sve potkrepljeno rezultatima studija meta-analize (73).

### **1.7. Genske alteracije kod karcinoma bronha**

Napredak na polju molekularne biologije je omogućio identifikaciju molekularnih markera za karcinom bronha sa vrednim prediktivnim i prognostičkim značajem. Procenjuje se da je oko 10 do 20 genetskih dešavanja, uključujući i promene onkogeni i tumor supresor gena, već prisutno u momentu kada karcinom bronha postaje klinički evidentan. Raznovrsne genetske i epigenetske mutacije su primećene kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha, posebno adenokarcinoma. Genske alteracije se odnose uglavnom na mutacije koje su odgovorne za nastanak, odnosno iniciranje i održavanje ćelija raka. Ove mutacije se često nalaze u genima koji kodiraju signalne proteine, a koji su ključni za održavanje normalnog ćelijskog rasta i preživljavanja. Prisustvo mutacije u

ovim genima će dodeliti prednost rasta ćelijama raka, favorizujući njihov opstanak tokom progresije tumora (74-76).

Prvi korak prilikom razvoja novih terapijskih opcija za bilo koju bolest, pa tako i za karcinom broha, je upravo razumevanje molekularnih dešavanja koja su dovela do samog nastanka bolesti i kasnije njenog opstanka i progresije. Ispitivanje genskih alteracija daje neprocenjivi podstrek za razvoj novih, ciljanih, terapijskih opcija za karcinom broha i ima značaj, ne samo za razvoj novih terapijskih opcija, već i za utvrđivanje biomarkera za ranu dijagnozu karcinoma bronha, njegovu prognozu, kao i predikciju odgovora na određeni terapijski režim (77).

Istraživačka mreža TCGA (The Cancer Genome Atlas) i druge grupe su identifikovale nekoliko genskih alteracija (mutacija, amplifikacija, rearanžmana) koje su posebno zastupljene i značajne kod adenokarcinoma bronha, a to su: EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), MET (mesenchymal-epithelial transition factor), EML4-ALK (Echinoderm microtubule associated protein-like protein 4 - Anaplastic Lymphoma Kinase), ROS1 (c-ros oncogene 1), RET (rearranged during transfection), BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) i TP53 (tumor suppressor protein 53) (78). Smatra se da čak 60% svih adenokarcinoma poseduje neku od genskih alteracija, a alteracije u EGFR, KRAS i ALK genu odnose polovinu svih slučajeva.

### **1.7.1. EGFR - Receptor Epidermalnog Faktora Rasta (Epidermal Growth Factor Receptor)**

Gen receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) nalazi se na hromozomu 7p11.2 i član je Her1 familije transmembranskih receptora faktora rasta. EGFR se sastoji iz tri dela, N-terminalnog ekstracelularnog domena za koji se vezuje ligand, transmembranskog lipofilnog segmenta i C-terminalnog intracelularnog dela koji sadrži domen tirozin kinase. EGFR tirozin kinaza modulira ćelijsku proliferaciju i preživljavanje preko autoaktivacije samog EGFR, ili preko dva nishodna signalna puta: PIK3CA/AKT1/MTOR i RAS/RAF1/MAP2K1/MAPK1 (79,80). Vezivanje specifičnog liganda vodi homodimerizaciji ili heterodimerizaciji sa posledičnom autofosforilacijom intracelularnog receptorskog domena tirozin kinase. Aktivirana tirozin kinaza

zatim angažuje odgovarajuće, prethodno pomenute, komponente nishodnih signalnih puteva koji su uključeni u mnogobrojne ćelijske procese poput ćelijske proliferacije, preživljavanja, invazije i ćelijske pokretljivosti i anti-apoptoze. Aktivirajuće EGFR mutacije nalaze se u rasponu od eksona 18 do eksona 21 gena za EGFR, a 90 % svih mutacija čine delecija u eksonu 19 i tačkasta mutacija u eksonu 21 (L858R), dok se mutacije ređe detektuju u eksonu 18 (G719X) i druga mutacija u eksonu 21 (L861G) (80,81). Mutacija u eksonu 20 je relativno retka i ne pripada grupi aktivirajućih mutacija već pripada grupi rezistentnih mutacija (82). Podela mutacija u domenu EGFR gena na aktivirajuće i rezistentne izvršena je na osnovu njihove osetljivosti na lekove prve generacije inhibitora tirozin kinaze (gefitinib, erlotinib). Velike, internacionalne studije potvrdile su da je prisustvo aktivirajućih mutacija u domenu EGFR gena prediktivan znak odgovora na terapiju sa inhibitorima tirozin kinaze (83,84).

Postoje određene kliničko-patološke karakteristike tumora i bolesnika za koje je dokazano da su češće povezani sa EGFR mutacijama. Što se tiče tumora, EGFR mutacije su najčešće kod adenokarcinoma, a što se bolesnika tiče, EGFR mutacije su češće kod nepušača, bolesnika ženskog pola i bolesnika koji su pripadnici azijske rase (85)

Incidenca EGFR mutacija varira među različitim populacijama ljudi. Kod kavkaske rase prisustvo EGFR mutacija je zastupljeno u 10-15% slučajeva bolesnika koji boluju od uznapredovalog, metastatskog adenokarcinoma bronha, dok je kod azijske rase EGFR pozitivnost prisutna i u preko 50% slučajeva, u nekim studijama i do 75% (86). Gledano po geografskim regionima najveća incidence EGFR mutacija zabeležana na dalekom istoku, Azija-Pacifik 47%, dok je najniža incidenca zabeležena u Australiji, 12% (87). Incidenca mutacija u domenu EGFR gena kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha, koji su hirurški lečeni, nije poznata u meri u kojoj je poznata za uznapredovali, metastatski stadijum bolesti. Jedan od razloga je taj što se u kliničkoj praksi testiranje tumorskog tkiva na prisustvo mutacija u domenu EGFR gena, u većini zemalja, ne izvodi rutinski kod ranog stadijuma bolesti već samo kod uznapredovalog (88). Međutim, u pojedinim delovima sveta, istraživači su testirali i određivali učestalost EGFR mutacija kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha. MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) grupa je 2008 godine objavila rezultate testiranja tumora 296 operisanih bolesnika kod kojih je utvrdila prisustvo EGFR mutacije u 14% slučajeva (89). Ista grupa je 2012 godine objavila rezultate testiranja tumora 1118 bolesnika koji su imali rani stadijum adenokarcinoma



bronha i hirurški u lečeni i ovaj put EGFR pozitivnost je dokazana u 20% slučajeva (90). U jednoj studiji kod pripadnika crne rase, kod kojih je hirurški odstranjen adenokarcinom bronha u ranom stadijumu, učestalost EGFR mutacija je bila 19% (91).

Mutacije u domenu EGFR gena zauzimaju cenralno mesto većine istraživanja koja imaju za cilj da utvrde prediktivni i prognostički značaj ovih mutacija kod karcinoma bronha. Prediktivni značaj postojanja aktivirajućih EGFR mutacija, u tumorima bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim adenokarcinomom bronha, koji su na terapiji sa tirozin kinaza inhibitorima, je potvrđen u nekoliko velikih internacionalnih kliničkih studija. Ciljana terapija inhibitorima tirozin kinaze, međutim, kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha, nije pokazala značajan benefit za ove bolesnike, za razliku od benefita koji viđamo kod lečenja bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim adenokarcinomom bronha (92).

Prisustvo mutacija u EGFR genu se pokazalo kao pozitivan prognostički faktor kod bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim adenokarcinomom bronha bez obzira na vrstu terapije koju su primili (93-96), međutim, ima i studija u kojima prisustvo EGFR mutacije nije dovelo do bolje prognoze kod bolesnika na hemioterapiji (97).

Prognostički značaj mutacija u domenu receptora epidermalnog faktora rasta kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha, koji su hiruršku lečeni, do danas nije u potpunosti razjašnjen. Novija studija Japanskih istraživača pokazala je da je EGFR pozitivan status nezavistan prognostički faktor za ukupno preživljavanje (Overall Survival - OS) i preživljavanje bez bolesti (Disease Free Survival - DFS) kod stadijuma Ib adenokarcinoma bronha (98). U još dve studije japanskih istraživača, koje su sprovedene kod operisanih bolesnika sa adenokarcinomom bronha u ranom stadijumu, dokazano je da je ukupno preživljavanje, nakon relepsa bolesti, bilo duže kod bolesnika čiji su tumori imali mutiran EGFR gen (99, 100). U ranije pomenutoj studiji istraživača iz MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), koja je obuhvatila 1118 uzoraka ranog stadijum adenokarcinoma bronha nakon hirurške resekcije, ukupno preživljavanje je statistički značajno bilo duže u grupi bolesnika kod kojih je potvrđeno prisustvo mutacije u EGFR genu (90). Nasuprot tome, u jednoj studiji italijanskih istraživala koja takođe je ispitala preživljavanje bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha koji su imali mutiran EGFR gen, u odnosu na one bolesnike bez prisustva mutacije, nije nađena statistički

značajna razlika u ukupnom preživljavanju između ove dve grupe ispitanika. Štaviše, prisutvo mutacije u EGFR genu je bilo povezano sa trendom lošije prognoze (101). Tokom 2014 godine, objavljena je jedna velika meta-analiza kineskih istraživača, koja je sprovedena sa namerom da se utvrdi prognostički značaj prisustva EGFR mutacija kod ranog stadijuma karcinoma bronha koji su hirurški resecirani. Ukupan broj bolesnika obuhvaćenih ovom meta-analizom bio je 4122. Rezultati ove meta-analize, u pogledu preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja, ukazivali su na to da prisustvo EGFR mutacije nema prognostički značaj kod grupe bolesnika sa hirurški reseciranim ranim stadijumom karcinoma bronha, međutim, potrebne su dobro dizajnirane prospektivne studije ne bi li se sa većom sigurnošću potvrdili ovakvi rezultati (92).

### 1.7.2. KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) je najčešća genska alteracija kod adenokarcinoma bronha. KRAS pripada familiji RAS (Rat sarcoma) gena (Kirsten rat sarcoma - KRAS, Neuroblastoma rat sarcoma - NRAS i Harvey rat sarcoma - HRAS). Oni kodiraju familiju membranskih proteina koji imaju ulogu u regulaciji ćelijskog rasta, odnosno proliferacije, diferencijacije i apoptoze na taj način što ulaze u interakciju sa mnogim efektorskim signalnim putevima poput STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) i PI3K (phosphoinositide 3-kinase). RAS proteini stiču svoj onkogeni potencijal kada dođe do zamene aminokiselina na poziciji 12, 13 ili 61 kao rezultat tačkaste mutacije u okviru gena. Ova tačkasta mutacija dovodi do konstitutivne aktivacije RAS signalnog puta. KRAS mutacija predstavlja 90% svih RAS mutacija kod adenokarcinoma bronha, a čak 97% od KRAS mutacija kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha uključuju kodon 12 i 13 (80,102).

Incidenca KRAS mutacija kod karcinoma bronha kreće se od 8% do 24%, prema nekim studijama i do 30% (102,103). U jednoj velikoj epidemiološkoj studiji u Latinskoj Americi koju je sprovedla CLICaP (The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer) grupa, testirano je 5738 uzoraka karcinoma bronha i incidenca KRAS mutacije bila je 14% kod bolesnika da adenokarcinomom (104). Kod pripadnika crne rase, KRAS mutacija je detektovana u 17% slučajeva za razliku od kavkaseke rase gde je incidenca KRAS mutacija nešto veća, i detektovana je u 26% slučajeva (92)

Dok su EGFR mutacije češće kod nepušača, KRAS mutacije su snažno povezane sa pušačkim statusom. U studiji u kojoj je analizirano 500 uzoraka adenokarcinoma bronha KRAS mutacija je bila zastupljena u 15%, 22% i 25% kod nepušača, bivših pušača i aktivnih pušača, respektivno (105). Grupa istraživača iz MSKCC (Memorial Sloan Ketterin Cance Centre) je sprovela studiju genotipizacije 3026 uzoraka adenokarcinoma bronha i konstatovala KRAS mutaciju kod 34% bolesnika koji su bili pušači i 6% kod bolesnika koji su bili nepušači (106). Takođe, pored pušaškog statusa, KRAS mutacija je češće prisutna kod bolesnika starije životne dobi, bolesnika ženskog pola i bolesnika pripadnika kavkaske rase (107).

Do danas ne postoji ustanovljen pristup terapiji bolesnika sa KRAS mutiranim tumorima. U toku su kliničke studije koje ispituju različite inhibitore KRAS mutiranih adenokarcinoma, a ciljani signalni putevi su RAS/RAF/MEK i PI3K/AKT/mTOR. Studija faze II sa lekom Selumetinib (MEK1/MEK2 inhibitor) kod bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim, KRAS pozitivnim adenokarcinomom bronha, demonstrirala je bolje vreme preživljavanja bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje kod bolesnika koji su primali docetaksel + selumetinib, naspram grupe bolesnika koja je samo primala docetaksel (108).

Zvanične preporuke ne savetuju rutinsko testiranje tumora na prisustvo KRAS mutacija. Prisustvo KRAS mutacije u tumoru je uzajamno isključivo sa postojanjem drugih aktivirajućih mutacija kao što su EGFR mutacije i ALK rearanžman, tako da je najveći značaj u određivanju prisustva KRAS mutacija upravo isključenje postojanja drugih, manje zastupljenih mutacija, kao i eventualnog razloga za loš odgovor na terapiju tirozin kinaze inhibitorima kod bolesnika sa EGFR mutiranim tumorima jer ispoljavanje KRAS mutacije predstavlja jedan od vidova rezistencije tumora na TK inhibitore (109).

Prognostički značaj prisustva KRAS mutacije kod ranog stadijuma karcinoma bronha, koji je hirurčki resektiran, ispitala je grupa holandskih autora devedestih godina prošlog veka (110). U ovoj studiji, na malom broju ispitanika, nije postojala statistički značajna razlika između grupe bolesnika sa prisutnom KRAS mutacijom i grupe bolesnika bez prisustva KRAS mutacije u pogledu pola, pušačkog statusa, stadijuma bolesti. Međutim, grupa bolesnika sa KRAS mutiranim tumorom je statistički značajno imala lošije preživljavanje u odnosu na drugu grupu. Krajem prošlog veka objavljena je kombinovana analiza osam kliničkih studija koja je obuhvatila 881

slučaj bolesnika sa karcinomom bronha. Učestalost KRAS mutacije bila je 25%, i premda su studije obuhvaćene ovom analizom bile izuzetno heterogene, rezultati sugerišu da je preživljavanje kod bolesnika čiji tumori poseduju KRAS mutaciju bilo kraće (111). Tokom 2013-te godine *Shepherd* i saradnici objavili su zbirnu analizu o prognostičkom i prediktivnom efektu KRAS mutacije kod ranog stadijuma karcinoma bronha, kod bolesnika koji su učestvovali u četiri velike kliničke studije sa adjuvantnom hemioterapijom (112). Od ukupno testiranih 1718 uzoraka i 1534 dostupna rezultata testiranja u 300 uzoraka je potvrđena KRAS mutacija (19%). Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju i preživljavanju bez bolesti bolesnika sa KRAS mutiranim tumorima u odnosu na one bolesnike kod kojih nije dokazano prisustvo mutacija u domenu KRAS gena. Nadal i saradnici su u studiji na 179 uzoraka adenokarcinoma bronha u ranom stadijumu, bolesnika koji su hirurški lečeni, dokazali da je prisustvo KRAS mutacije povezano sa statistički značajnim lošijim preživljavanjem bez bolesti i ukupnim preživljavanjem. Univarijantnom analizom je ustanovljeno da je jedan podtip KRAS mutacije, G12C mutacija, bila povezana sa lošijim preživljavanjem bez bolesti i ukupnim preživljavanjem u odnosu na ostale podtipove KRAS mutacije i u odnosu na divlji tip (wild type) KRAS mutacije (113). Slično ovoj studiji, Renaud i saradnici su utvrđivali prognostički značaj drugog podtipa KRAS mutacije, G12V mutacije, kod 841 hirurški reseciranog adenokarcinoma bronha bolesnika kavkaskе rase. Rezultati su ukazivali na to da je podtip G12V mutacija KRAS gena povezana sa značajno lošijim preživljavanjem bez bolesti i ukupnim preživljavanjem (114). Zheng je 2016 godine, sa saradnicima, objavio rezultate studije sprovedene u Kini na pripadnicima azijske rase (115). Od 1368 uzoraka reseciranog adenokarcinoma bronha u ranom stadijumu, 113 je bilo pozitivno na prisustvo KRAS mutacije (8.3%). Statističkom obradom podataka nije nađena značajna razlika u preživljavanju bez bolesti i ukupnom preživljavanju u odnosu na prisustvo različitog podtipa KRAS mutacije. Prisustvo KRAS mutacije u tumoru se nije činio kao loš prognostički znak, ipak, bolesnici muškog pola, sa većim stadijum bolesti i oni bolesnici čiji su tumori bili lošije diferentovani su živeli kraće. S obzirom da je klinička značajnost prisustva KRAS mutacije i dalje nedovoljno razjašnjana, a rezultati studija, koje su se bavile ovom problematikom, ne konzistentni, tokom 2016 godine, grupa kineskih naučnika objavila je rezultate jedne velike meta-analize koja je obuhvatila 41 studiju, a cilj je bio sa se utvrdi prognostički značaj prisustva KRAS mutacije kod karcinoma bronha. Od 13103 uključena slučaja, kod 2374 je detektovano prisustvo KRAS mutacije (18%). KRAS mutacija je bila povezana sa određenim kliničko-patološkim

karakteristikama, a to su bili: histološki tip adenokarcinoma bronha i pušački status. Distribucija u odnosu na rasu bolesnika se kretala od 4.4% do 24.4 % sa bolesnike azijske rase, dok je kod bolesnika kavkaske rase KRAS mutacija bila zastupljena od 6,7% do 47.4%. Na osnovu zbirne analize trideset i sedam studija, koje su poredile ukupno preživljavanje bolesnika sa mutiranim KRAS genom u odnosu na bolesnike sa divljim tipom KRAS gena, dokazano je da bolesnici sa KRAS mutiranim genom u svojim tumorima imaju lošije ukupno preživljavanje. Takođe je pokazano da je prisustvo KRAS mutacije daleko lošiji prognostički faktor za pripadnike azijske rase u odnosu na pripadnike kavkaske rase. Kada su se iz zbirne analize izdvojili samo slučajevi sa ranim stadijumom karcinoma bronha, koji su radikalno hirurški lečeni, preživljavanje bez progresije bolesti je bilo značajnije lošije kod bolesnika sa KRAS mutiranim tumorima sugerišući da prisustvo KRAS mutacije kod ranog stadijuma karcinoma bronha predstavlja loš prognostički znak (116).

### **1.7.3. ALK - Kinaza Anaplastičnog Limfoma (Anaplastic Lymphoma Kinase)**

Kinaza anaplastičnog limfoma (Anaplastic Lymphoma Kinase - ALK) pripada grupi receptora tirozin kinaze i prvenstveno je bila opisana kod anaplastičnog limfoma po kojem je i dobila ime. Kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha, kinaza anaplastičnog limfoma je otkrivena 2007 godine, kada su Sodai saradnici otkrili inverziju na kraćem kraku hromozoma broj 2 koja je rezultovala fuzijom N-terminalnog dela gena EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) sa ALK genom (117). Od tada, pa do danas, otkriveno je nekoliko oblika EML4-ALK fuzije, rearanžmana, odnosno translokacije, ali karakteristično je da svaki od tih oblika sadrži deo domena EML4 gena i intracelularni domen tirozin kinaze ALK gena.

EML4-ALK fuzija spada u retke genske alteracije kod karcinoma bronha. Incidenca EML4-ALK fuzije kod adenokarcinoma bronha kreće se, u zavisnosti od studija i načina detekcije ove mutacije, od 3% do 13% (80,117,118). U kavaskoj i azijskoj populaciji ALK mutirani nesitnoćelijski karcinom bronha najčeće je zastupljen između 4% i 5% (119,120). U studiji koja je objavljena 2016 godine, a koja je sprovedena u Institutu za plućne bolesti Vojvodine, *Zarić* i saradnici su ispitivali povezanost kliničko-patoloških karakteristika, prisustva ALK mutacije i podtipa adenokarcinom bronha kod hirurški lečenih bolesnika pripadnika istočno evropske kavkaske

populacije (121). ALK pozitivnost utvrđena imunohistohemijom bila je prisutna u 6.2% slučajeva, a zatim je ALK pozitivnost potvrđena fluoroscentnom in-situ hibridizacijom u 5.1% slučajeva.

Za utvrđivanje prisustva ALK mutacije danas su najviše u upotrebi imunohistohemija i fluorescentna in-situ hibridizacija koja i dalje predstavlja zlatni standard u dijagnostici ALK pozitivnosti kod karcinoma bronha, mada se ALK pozitivnost može određivati i polimeraza lančanom reakcijom, a ređe, u standardnoj kliničkoj praksi, i sekvencioniranjem sledeće generacije (122).

Prisustvo ALK rearanžmana kod bolesnika sa karcinomom bronha povezano je sa određenim kliničko-patološkim karakteristikama, a to su mlađa životna dob, negativan pušački status i histološki tip adenokarcinoma (81,121,123).

EML4-ALK fuzija je uzajamno isključiva sa prisustvom EGFR i KRAS mutacije izuzimajući veoma retke slučajeve kada se ove mutacije mogu naći zajedno u jednom tumoru (109,124).

Kao i EGFR, ALK takođe spada u grupu mutacija oje mogu biti meta prilikom primene ciljane terapije. Terapija bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim ALK pozitivnim adenokarcinomom bronha doživela je pravu revoluciju sa pojavom leka krizotinib (Crizotinib) koji predstavlja ALK, ROS1 i MET inhibitor prve generacije. Veliki broj multinacionalnih, randomizovanih kliničkih studija je dokazao benefit primene leka krizotinib kod bolesnika sa ALK pozitivnim adenokarcinomom bronha u uznapredovalom, metastatskom stadijumu bolesti (125-127). Međutim, samo prisustvo ALK mutacije kod uznapredovalog, metastatskog adenokarcinoma bronha se smatra negativnim prognostičkim faktorom. U studiji sprovedenoj u Južnoj Koreji, koja je objavljena 2012 godine, Lee i saradnici su sprovedli retrospektivnu analizu u kojoj su poredili ukupno preživljavanje (OS) kod bolesnika sa ALK mutiranim uznapredovalim adenokarcinomom bronha, u eri pre postojanja ALK inhibitora, naspram bolesnika sa EGFR mutiranim uznapredovalim adenokarcinomom bronha i bolesnika sa uznapredovalim adenokarcinomom bronha koji nosi divlji tip (wild type) ALK i EGFR gena (128). Bolesnici sa ALK pozitivnim tumorom su imali najkraće preživljavanje poredeći sve tri grupe ispitanika. Ova razlika u preživljavanju je bila statistički visoko značajna u poređenu bolesnika sa ALK pozitivnim tumorima naspram bolesnika sa EGFR pozitivnim tumorima, dok je statistička značajnost nije primećena između ALK pozitivne grupe bolesnika i grupe bolesnika sa divljim tipom ALK gena.

Prognostički značaj ALK rearanžmana ispitivan je i kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha. U našoj zemlji, testiranje ranih stadijuma adenokarcinoma bronha na prisustvo ALK, EGFR i drugih mutacija još nije deo standardne kliničke prakse. U jednoj studiji objavljenoj 2012 godine, Paiki saradnici su između ostalog ispitivali i prognostički značaj prisustva ALK rearanžmana kod 735 hirurški lečenih bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha (129). Nisu primećene statistički značajne razlike kako u ukupnom preživljavanju tako i u preživljavanju bez bolesti između bolesnika sa ALK mutiranim tumorima i bolesnika sa divljim tipom ALK gena. ALK rearanžman se nije pokazao kao prognostički značajan faktor kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. U jednoj retrospektivnoj studiji sprovedenoj na *Mayoklinici* u Sjedinjenim Američkim Državama (Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA) dokazano je da je prisustvo ALK rearanžmana značajno povezano sa lošijim preživljavanjem bez bolesti kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha (130). ''*The Lungscape ALK project*'' je dizajniran kako bi se odredila učestalost i prognostički značaj prisustva ALK rearanžmana kod hirurški resekiranih bolesnika sa adenokarcinomom bronha stadijuma od I do III. Analiza ALK statusa je sprovedena imunohistohemijom i fluorescentnom in-situ hibridizacijom kod 1281 bolesnika. Ukupno preživljavanje i preživljavanje bez bolesti je bilo značajno duže kod ALK pozitivnih bolesnika u poređenju sa ALK negativnim bolesnicima (131).

#### 1.7.4. ROS1 (c-ros oncogene 1)

ROS1 (c-ros oncogene 1) takođe pripada grupi receptora tirozin kinaze, strukturno je veoma sličan kinazi anaplastičnog limfoma (ALK), čak 77% aminokiselinskog sastava ROS1 i ALK receptora tirozin kinaze je identično, a kodiran je od strane ROS1 gena koji se nalazi na hromozomu broj 6. ROS1 fuzija, odnosno rearanžman je prvi put otkriven kod glioblastoma 1987 godine, a tek 2007 godine ova genska alteracija je otkrivena i kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha. Do danas je otkriveno devet partner proteina sa kojima ROS1 stupa u fuziju, a najčešći među njima je CD74. ROS1 rearanžman svoje dejstvo ispoljava preko aktivacije PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT i MAPK/ERK, a rezultat aktivacije ovih niskhodnih signalnih puteva je preživljavanje ćelija raka i njihova proliferacija (132,133). Incidenca ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa karcinomom bronha kreće se od 0.7% do 1.7% (134,135). Kod usko selektovane populacije frekvencija ROS1 rearanžmana je veća nego u ne selektovanoj populaciji (136). Sredinom 2015 godine, Zhu i saradnici, objavili su veliku meta-analizu koja je obuhvatila 9898 bolesnika sa nesitnoćelijskim

karcinomom bronha, a cilj je bio utvrđivanje kliničko-patoloških karakteristika ROS1 pozitivnih bolesnika (137). Kod 6868 bolesnika sa histološkim tipom adenokarcinoma bronha frekvencija ROS1 rearanžmana je bila 2.4%, dok je kod drugih histoloških tipova, ne-adenokarcinoma, frekvencija bila svega 0.2%. Nešto veća frekvencija ROS1 rearanžmana primećena je kod pripadnika azijske rase u odnosu na kavkasku rasu.

Detekcija prisustva ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa adenokarcinomom bronha, slično detekciji ALK rearanžmana, najčešće se vrši pomoću tri metode: imunohistohemijom, fluorescentnom in-situ hibridizacijom i polimeraza lančanom reakcijom (138).

Bolesnici sa karcinomom bronha čiji tumori u sebi imaju prisutan ROS1 rearanžman imaju određene kliničko-patološke karakteristike. Te kliničko-patološke karakteristike su veoma slične onim koje se nalaze kod ALK pozitivnih bolesnika i podrazumevaju mlađu životnu dob, negativan pušački status i histološki tip adenokarcinoma iako se ROS1 rearanžman može naći i kod skvamoznog i krupnoćelijskog karcinoma bronha (137,139).

Uprkos sličnim kliničko-patološkim karakteristikama, ROS1 rearanžman se ne preklapa sa drugim genskim alteracijama kao što su ALK i EGFR tako da i u ovom slučaju postoji uzajamna isključivost (133).

S obzirom na prisutnu izrazitu homologiju ROS1 i ALK domena tirozin kinaze pretpostavka je bila da bi lekovi iz grupe tirozin kinaza inhibitora koji ispoljavaju odličan efekat kod ALK pozitivnih bolesnika, isti takav učinak, ili sličan, imali i kod ROS1 pozitivnih bolesnika. Krizotinib je pokazao značajnu antitumorsku aktivnost kod bolesnika sa ROS1 pozitivnim, uznapredovalim, metastatskim stadijumom nesitnoćelijskog karcinoma bronha (140).

Do danas se veoma malo zna o prognostičkom značaju prisustva ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa karcinomom bronha. U jednoj kliničkoj studiji sprovedenoj u Kini, *Cai* i saradnici su ispitivali efekat prisustva ROS1 rearanžmana kod bolesnika da karcinomom bronha na preživljavanje i dobili rezultate da bolesnici sa prisustvom ROS1 rearanžmana imaju lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike u čijim tumorima nije detektovano prisustvo ROS1 rearanžmana (141). Prognostički značaj ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa adenokarcinomom bronha ispitan je u jednoj Nemačkoj studiji (142). Bolesnici koji su imali adenokarcinom bronha u IV stadijumu bolesti i



kod kojih je dokazano prisustvo ROS1 rearanžmana su poređeni sa bolesnicima koji su takođe imali adenokarcinom bronha u IV stadijumu bolesti i prisustvo neke druge genske alteracije (EGFR, KRAS, ALK). Rezultati analize preživljavanja pokazali su da bolesnici sa ROS1 rearanžmanom statistički duže žive od bolesnika sa nekom drugom genskom alteracijom. Uopšteno govoreći, uloga ROS1 rearanžmana kao prognostičkog faktora kod uznapredovalog, metastatskog karcinom bronha i dalje nije jasno utvrđena, a dokaz za to su ne konzistentni rezultati studija koje su se bavile to problematikom.

O prognostičkom značaju ROS1 rearanžmana kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha do danas se veoma malo zna. Grupa kineskih naučnika je ispitala ulogu ROS1 rearanžmana u grupi bolesnika iz Istočne Azije kod kojih je bio dokazan nesitnoćelijski karcinom bronha u IIIA-N2 stadijumu bolesti i koji je bio hirurški zbrinut. Od 204 bolesnika, ROS1 rearanžman je detektovan kod njih četvoro. Statističkom analizom je pokazano da je ukupno preživljavanje ROS1 pozitivne grupe bolesnika bilo značajno kraće u odnosu na grupu kod koje nije potvrđeno prisustvo ROS1 rearanžmana (143).

### 1.7.5. PD-1/PD-L1 (Programmed cell death protein 1 (PD-1)/ Programmed death-ligand 1(PD-L1))

Važan deo ljudskog imunskog sistema je sposobnost da prepozna sopstvene ćelije i spreči imunske ćelije da izvrše napad na njih. Da bi u tome uspeo, imunski sistem koristi "kontrolne punktove" (*checkpoints*) - molekule koji se nalaze na površini imunskih ćelija i koje moraju biti "uključene" da bi imunska reakcija otpočela. Ćelije raka ponekad koriste te "kontrolne punktove", "isključe ih" i na taj način izbegavaju napad imunskih ćelija. Imunoterapija je, u poslednjih nekoliko godina, dovela do revolucije na polju lečenja bolesnika sa karcinomom bronha sa pojavom novih molekula zvanih inhibitori kontrolnih punktova (*checkpoint inhibitors*). Inhibitori kontrolnih punktova su monoklonska antitela koja imaju ulogu u blokadi interakcije imunske ćelije i ćelije raka na mestu kontrolnog punkta čime omogućavaju imunskom sistemu da prepozna ćelije raka i uništi ih (102,144).

PD-1 pripada grupi transmembranskih proteina tip I i nalazi se eksprimiran na površini T-ćelija, B-ćelija, ćelija prirodnih ubica, aktiviranih monocita i dendritičnih ćelija. PD-L1 predstavlja ligand za PD-1, a takođe pripada familiji transmembranskih proteina tip I. PD-L1 može biti eksprimiran na T-ćelijama, B-ćelijama, dendritičnim ćelijama, makrofagima, a može biti eksprimiran i na površini tumorskih ćelija. Pored PD-L1 postoji još jedan ligand za PD-1, a to je PD-L2 koji se uglavnom nalazi eksprimiran na površini antigen prezentujućih ćelija i T-pomoćnih ćelija (145). Nekoliko studija je potvrdilo da sumanipulacija kompleksom PD-1/PD-L1 i povećana ekspresija samog liganda PD-L1 načini pomoću kojih ćelije raka dovode do inhibicije imunskog sistema na taj način izbegavaju imunski napad. Uloga liganda PD-L2 u inhibiciji imunskog odgovora do danas nije sasvim razjašnjena (146).

Učestalost PD-L1 ekspresije kod nesitnoćelijskog karcinoma bronha se kreće između 20% i 50%, nezavisno od histološkog tipa (147,148). Učestalost PD-L1 ekspresije kod bolesnika sa ranim stadijumom karcinoma bronha, a posebno učestalost PD-L1 ekspresije kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha do danas nije dovoljeno poznata. U jednoj studiji sprovedenoj na Tajvanu, ispitivana je učestalost PD-L1 ekspresije kod bolesnika sa hirurški reseciranim adenokarcinomom bronha u prvom stadijumu bolesti. Od 163 bolesnika, šezdeset i pet njih je imalo tumore sa prisutnom PD-L1 ekspresijom (39.9%)(149).

Brojne studije su ispitivale povezanost prisustva PD-L1 ekspresije u tumorima bolesnika sa karcinomom bronha i određenih kliničko-patoloških karakteristika. Jedna velika meta-analiza, objavljena od strane kineskih naučnika 2015. godine, pokazala je da je kod 1550 bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha prisustvo PD-L1 ekspresije u tumorskim ćelijama bilo povezano sa stepenom diferencijacije tumora, dok druge kliničko-patološke karakteristike kao što su pol, pušački status, histološki tip tumora, TNM status nisu bile u korelaciji sa prisustvom PD-L1 ekspresije (150). Povezanost određenih kliničko-patoloških karakteristika i PD-L1 ekspresije kod ranog stadijuma karcinoma bronha ispitana je u jednoj studiji koja je sprovedena u Japanu i koja je uključila 164 bolesnika kod kojih je hirurškim putem odstranjen karcinom bronha. PD-L1 ekspresija je bila znatno učestalija kod pripadnika ženskog pola, nepušača i bolesnika sa histološkim tipom adenokarcinoma bronha (151).

Imunoterapija ima za cilj da podstakne imunski sistem da kontroliše ili eventualno uništi tumor. Kao rezultat te ideje, tokom prethodnih par godina, došlo je do razvoja velikog broja lekova iz grupe inhibitora kontrolnih punktova. Svi oni su pokazali značajnu aktivnost u lečenju bolesnika sa karcinomom bronha u odmaklom, metastaskom stadijumu bolesti, bilo da se daju kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugom vrstom terapije. Ovaj revolucionarni napredak zasnovan je prvenstveno na inhibiciji kontrolnog punkta PD-1 i njegovog liganda PD-L1 (144). Aktivnost imunoterapije i trenutno se ispituje u velikom broju randomizovanih multicentričnih kliničkih studija i to uglavnom kod bolesnika sa uznapredovalim karcinomom bronha. Međutim, znatno je manji broj onih studija koje se bave ovom problematikom kod bolesnika sa ranim stadijumom karcinoma bronha.

I dok je danas sve više podataka o produženom vremenu preživljavanja kod bolesnika sa karcinomom bronha kod kojih je prisutna PD-L1 ekspresija i kod kojih je sprovedena terapija sa lekovima iz grupe inhibitora kontrolnog punkta, sam prognostički značaj prisustva PD-L1 ekspresije u ćelijama karcinoma bronha nije sasvim jasan. Jedna velika meta-analiza studija, sprovedena od strane kineskih naučika, pokušala je da utvrdi prognostički značaj prisustva PD-L1 ekspresije kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha (152). Kliničke studije, koje su bile obuhvaćene ovom meta-analizom, uključivale su bolesnike sa karcinomom bronha u svim stadijumima bolesti. Zbirna analiza nije pokazala povezanost između prisustva PD-L1 ekspresije i dužine ukupnog preživljavanja. Analiza podgrupa je pokazala da je PD-L1 ekspresija bila povezana sa lošijim ukupnim preživljavanjem kineskih bolesnika. Još jedna, nešto manja, meta-analiza studija sprovedena od strane kineskih naučnika pokazala je da je prisustvo PD-L1 ekspresije negativan prognostički znak kod bolesnika sa karcinomom bronha. Rezultati ove studije ukazivali su na to da bolesnici kod čijih tumora je registrovana PD-L1 ekspresija kraće žive u odnosu na bolesnike sa tumorima bez PD-L1 ekspresije, bez obzira na rasnu pripadnost (153). Da je ekspresija PD-L1 liganda loš prognostički znak kod bolesnika sa karcinomom bronha potvrđeno je u još dve kliničke studije (154-156). Sa druge strane, u pojedinim studijama je dokazano da ekspresija PD-L1 liganda predstavlja pozitivan prognostički znak i da bolesnici u čijim tumorima je detektovana PD-L1 ekspresija imaju bolje ukupno preživljavanje (147). Mali je broj kliničkih studija koje su se isključivo bavile prognostičkim značajem PD-L1 ekspresije kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. U studiji koju su sproveli *Zhang* i

saradnici, pozitivna PD-L1 ekspresija je bila značajno povezana sa većim stadijumom i lošijom diferencijacijom adenokarcinoma bronha. Takođe, bolesnici sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom su imali kraće vreme preživljavanja bez progresije kao i ukupno preživljavanje. Nasuprot ovim rezultatima, Yangi saradnici su dokazali da je prisustvo PD-L1 ekspresije kod bolesnika sa adenokarcinomom bronha u prvom stadijumu bolesti bilo povezano sa dužim vremenom preživljavanja bez progresije (149).

U novoj eri personalizovane medicine, selekcija bolesnika koji će imati benefit od specifične terapije je od vitalnog značaja te je iz tog razloga veoma važno sprovoditi aktivno skrining bolesnika na poznate i klinički dokazane biomarkere.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi učestalost najčešćih genskih alteracija u tumorskim ćelijama bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.
2. Utvrditi pojedinačnu zavisnost ispitivanih genskih alteracija u tumorskim ćelijama sa određenim kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.
3. Utvrditi potencijalni prognostički značaj pojedinačne genske alteracije u tumorskim ćelijama na vreme preživljavanja bez povratka bolesti i ukupno vreme preživljavanja kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.

### 2.2. Hipoteze istraživanja

Hipoteze istraživanja su:

1. Najčešće genske alteracije u tumorskim ćelijama bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha su KRAS i EGFR mutacija.
2. Prisustvo pojedinih genskih alteracija u tumorskim ćelijama je češće kod određenih kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha
3. Prisustvo EGFR mutacije predstavlja pozitivan, a KRAS mutacije negativan prognostički faktor kako za vreme preživljavanja bez povratka bolesti tako i na ukupno vreme preživljavanja

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Ispitanici

Studija je bila delom retrospektivnog, a delom prospektivnog karaktera. Studija je sprovedena u Institutu za plućne bolesti Vojvodine, Klinika za pulmološku onkologiju, Sremska Kamenica, Vojvodina, Srbija i u Departmanu za Medicinu I, Medicinski Univerzitet u Beču, Austrija, a u skladu sa potpisanim protokolom o saradnji između dve institucije. Ova studija je obuhvatila sto šezdeset i jednog bolesnika sa adenokarcinomom bronha, kliničkog stadijuma bolesti I-IIIa, kod kojih je sprovedena radikalna hirurška resekcijana Klinici za Grudnu hirurgiju Instituta za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica, Vojvodina, Srbija, u periodu između 2007 i 2014 godine. Ispitanici pre hirurškog lečenja nisu primili hemioterapiju, ciljanu terapiju niti radioterapiju. Klinički podaci bolesnika su preuzeti iz institutskog registra za karcinom bronha i medicinske dokumentacije bolesnika.

Uključujući kriterijumi:

1. Osoba starija od 18 godina
2. Patohistološki dokazan adenokarcinom bronha
3. Hirurški reseciran adenokarcinom bronha
4. Stadijum bolesti od IA do IIIa (TNM klasifikacija – sedma revizija)
5. Adekvatna količina tumorskog tkiva za planirana testiranja (parafinski blok ili minimum 10 pločica)
6. Dostupnost kliničko-patoloških podataka: pol, starost, pušenje, ECOG status TNM status i stadijum bolesti, primena adjuvantne hemioterapije.

Isključujući kriterijumi:

1. Patohistološki dokazan skvamozni karcinom, adeno-skvamozni, krupnoćeljski ili sitnoćeljski karcinom bronha.
2. Stadijum bolesti IIIB ili IV.
3. Neadekvatna količina materijala za potrebna testiranja.

## 3.2. Karakteristike i analize tumorskog tkiva

Za potrebe planiranog istraživanja, patolog Instituta za plućne bolesti Vojvodine je zamoljen da obezbedi odgovarajući parafinski blok tumorskog tkiva koje je fiksirano u formalinu (FFPE - formalin-fixed, paraffin embedded). Svi uzorci tumorskog tkiva dobijeni su u vreme hirurške operacije, a pre eventualnog započinjanja bilo kakve adjuvantne terapije. Parafinski blokovi su čuvani na sobnoj temperaturi, a njihova identifikacija je izvršena putem jedinstvenog identifikacionog broja. HE (hematoksilin i eozin) bojenje isečka svakog tumorskog bloka je pripravljeno u cilju patohistološke potvrde adenokarcinoma bronha. U nastavku, isecci tumorskog tkiva su korišćeni za dalje analize koje su planirane u okviru ove studije.

### 3.2.1. Analiza mutacija

Somatske mutacije gena za receptor epidrmlnog faktora rasta (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR), KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) gena i PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) genasu određivane pirosekvencioniranjem (Pyrosequencing).

Izolacija genomske DNK je urađena koristeći set *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Polimeraza lančana reakcija (Polymerase Chain Reaction – PCR) je korištena uz upotrebu *PyroMark PSCR Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) za amplifikaciju DNK regiona od interesa, a proizvodi amplifikacije su podvrgnuti elektroforezi u agarozu gelu u cilju potvrde uspešnosti amplifikacije DNK segmenata. Prajermeri za polimerazu lančanu reakciju i

pirosekvencioniranje za EGFR i KRAS mutacije su korišteni prema uputstvu proizvođača (Qiagen, Hilden, Germany). Proizvodi polimeraza lančane reakcije su sekvencionirani pomoću pirosekvencioniranja "PyroMark Q24 system" (Qiagen, Hilden, Germany), a rezultati su analizirani pomoću "PyroMark Q24 software" (version 2.0.6, Qiagen, Hilden, Germany). Sve mutacije su potvrđene ponovljenim testiranjem.

### 3.2.2. Imunohistohemija (IHC)

Imunohistohemijska ispitivanja tumorskog tkiva su sprovedena i evaluirana u ISO sertifikovanoj laboratoriji Departmana za Medicinu I, Medicinskog Univerziteta u Beču, Austrija.

#### 3.2.2.1. PD-1/PD-L1 IHC

Od svakog tumorskog bloka isečen je 4 µm deo isečak koji je postavljen na staklenu pločicu, deparafiniran i rehidriran. Kako bi se smanjilo nespecifično pozadinsko bojenje, pločice su inkubirane 10 minuta u 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Za povratak epitopa, uzorci su zagrevani 10 minuta u etilendiamintetrasirćetnoj kiselini (EDTA) (pH 8.0; PD-1) ili 10 mM citratnog pufera (pH 6.0; PD-L1) u ekspres loncu. Nakon inkubacije u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi sa *Ultra V Block* (UltraVision LP detection system, Lab Vision Corporation), tkivo je inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi sa monoklonalnim antitelom specifičnim za PD-1 (mouse monoklonal antibody, EH33, Cell Signaling) ili PD-L1 (rabbit monoklonal antibody, E1L3N, Cell Signaling). Vezivanje antitela je detektovano pomoću *UltraVision LP* detekcionog sistema prema preporukama proizvođača (Lab Vision Corporation). Razvoj boja je izvršen pomoću 3-3'-diaminobenzidina i dodatnog bojenja sa hematoksilinom. Delovi uzoraka nesitnoćelijskog karcinoma bronha za koje se zna da eksprimuju PD-1 i/ili PD-L1 su poslužili kao pozitivna kontrola. Ekspresija PD-1 i PD-L1 je evaluirana prema slepom principu u odnosu na kliničke podatke bolesnika.

PD-1 status je procenjivan na limfocitima, a vrednost je izražena u procentima u odnosu na ukupnu površinu tumora. PD-L1 status je procenjivan na tumorskim ćelijama, a vrednost je izražena kao procenat u odnosu na sve tumorske ćelije. Jedino uzorci sa brojem ćelija  $\geq 100$  su razmatrani u



finalnoj analizi i jedino tumorske ćelije sa parcijlno ili kompletno obojenom membranom su uzete za evaluaciju. Imunske ćelije su okarakterisane kao PD-1 pozitivne ukoliko je detektovani intenzitet bojenja bio prisutan u  $\geq 1\%$  ćelija. Na isti način, tumorske ćelije su okarakterisane kao PD-L1 pozitivne ukoliko je bilo koji intenzitet bojenja detektovan u  $\geq 1\%$  ćelija. Rezultati bojenja su korelirani a kliničko-patološkim karakteristikama i preživljavanjem bolesnika.

### **3.2.2.2. ALK IHC**

Isecci svakog tumorskog bloka debljine 4  $\mu\text{m}$  su prvenstveno zagrevani do  $62^\circ\text{C}$ , a zatim su podvrgnuti automatskoj imunohistohemijskoj analizi, kompanije Ventana (Ventana Medical Systems, Inc.), sa prethodno razblaženim Ventana anti-ALK (D5F3) zečijim monoklonskim antitelom zajedno sa Optiview DAB imunohistohemijskim setom za detekciju i Optiview setom za amplifikaciju na Benchmark XT stejneru. Rezultati imunohistohemijskog bojenja su određeni na onovu sledećih kriterijuma: 0, bez bojenja; 1+, slabo citoaplazmatsko bojenje u  $\geq 10\%$  tumorskih ćelija; 2+ umereno, glatko citoplazmatsko bojenje; 3+ intenzivno, granulirano citoplazmatsko bojenje. Imunohistohemijski pozitivan rezultat je bio 2+ i 3+, dok je imunohistohemijski rezultat bio negativan u slučaju rezultata 0 i 1+.

### **3.2.2.3. ROS1 IHC**

Od svakog tumorskog bloka isečen je 4  $\mu\text{m}$  debeo isečak koji je postavljen na staklenu pločicu, deparafiniziran i rehidriran. Nakon povratka antigena (zagrevanje u 1.0mM EDTA pH 9.0 na  $121^\circ\text{C}$  u trajanju od 10 minuta) i blokiranja sa 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pločice su ostavljene na sobnoj temperature da reaguju sa zečijim monoklonskim antitelom protiv ROS1 (klon D4D6, 1:250 razblaženje; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Nakon toga pločice su inkubirane sa imunohistohemijskim setom za detekciju (UltraVision Quanto Detection System, Thermo Scientific, Fremont, CA) i potom kontrabojene sa hematoksilinom. Tkivo plućnog parenhima u pozadini je korišćeno kao negativna kontrola. Rezultati imunohistohemijskog bojenja su određeni na onovu sledećih kriterijuma: 0, bez bojenja; 1+, slabo citoaplazmatsko bojenje u  $\geq 10\%$  tumorskih ćelija; 2+ umereno, glatko citoplazmatsko bojenje; 3+ intenzivno, granulirano citoplazmatsko bojenje. Imunohistohemijski pozitivan rezultat je bio 2+ i 3+, dok je imunohistohemijski rezultat bio negativan u slučaju rezultata 0 i 1+.

### 3.2.3. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

Fluorescentna in situ hibridizacija je urađena kao kontrolna analiza u tumorskim uzorcima kod kojih je imunohistohemijski dokazano prisustvo rearanžmana u domenu ALK i ROS1 gena. Imunohistohemijski negativni tumorski uzorci na prisustvo ALK i ROS1 rearanžmana nisu dalje analizirani fluorescentnom in situ hibridizacijom.

#### 3.2.3.1. ALK FISH

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH - Fluorescent in situ hybridization) sprovedena je na tumorskom tkivu fiksiranom u formalinu i ugrađenom u parafinskom bloku (FFPE - formalin-fixed, paraffin embedded) sa specifičnim setom za ALK lokus (Vysis LSI ALK dual-color, break-apart rearrangement probe; Abbott Molecular, Abbott Park, IL) prema uputstvu proizvođača. FISH pozitivni slučajevi su definisani kao oni kod kojih je detektovano više od 15% razdvojenog signala ili izolovani crveni signal u tumorskim ćelijama.

#### 3.2.3.2. ROS1 FISH

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH - Fluorescent in situ hybridization) sprovedena je na tumorskom tkivu fiksiranom u formalinu i ugrađenom u parafinskom bloku (FFPE - formalin-fixed, paraffin embedded) sa specifičnim setom za ROS1 lokus (ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany), prema uputstvu proizvođača. Tumorske ćelije, odnosno njihova jedra, kod kojih je detektovan jedan ili više FISH signal od svake boje su popisane. Ćelije koje su označene kao rearanžman-pozitivne bile su one ćelije kod kojih je detektovan signal razdvajanja ili izolovano zeleni signal. Uzorak je smatran kao ROS1 pozitivan ukoliko je u njemu bilo prisutno više od 15% rearanžman-pozitivnih tumorskih ćelija.

## 3.3. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka prilikom izrade ove disertacije korišćen je paket IBM SPSS Statistics 20. Analiza podataka je obuhvatila metode deskriptivne i inferencijalne statistike.

Numerička obeležja su prikazana putem srednjih vrednosti (medijana, aritmetička vrednost) i mera varijabiliteta (standardna devijacija, opseg vrednosti). Atributivna obeležja su prikazana korišćenjem frekvencija i procenata. Za univarijantnu analizu je upotrebljena primena  $\chi^2$  testa za atributivna obeležja, a za numerička obeležja je se korišćen Studentov t-test i jednosmerna analiza varijanse (ANOVA). Multivarijantna analiza je obuhvatila primenu binarnog i nominalnog logističkog regresionog modela, a u interpretaciji rezultata je korišćen odnos šansi (Odds ratio) zajedno sa 95% intervalom poverenja. Za dokazivanje korelacije između varijabli korišćen je Pirsonov test korelacije (Pearson's Correlation) za numerička obeležja, a za kategorijska obeležja Spirmanov test (Spearman rank correlation). Statistički značajnim je smatrana vrednost nivoa značajnosti  $p < 0,05$ .

Ukupno preživljavanje (Overall survival) je računato od dana operacije do dana smrti. Preživljavanje bez povratka bolesti (Disease free survival) je računato od dana operacije do momenta ponovne pojave bolesti. Kriva preživljavanja je određivana Kaplan-Meier-ovim metodom.

## 4. REZULTATI

Ovo istraživanje obuhvatilo je uzorke tumora i kliničke podatke bolesnika kod kojih je hirurškim putem odstranjen adenokarcinom bronha u ranom stadijumu bolesti (stadijum IA do IIIA) i kod kojih pre hirurškog lečenja nije sprovedeno nikakvo anti-tumorsko lečenje. Od ukupno 161 bolesnika, bilo je 90 (55.9%) muškaraca i 71 (44.1%) žena. Prosečna starost bolesnika iznosila je  $61 \pm 8.5$  godina (opseg 37-80 godina). Većina bolesnika su bili pušači, njih 100 (62.1%), bivših pušača je bilo 41 (25.5%), dok je najmanje bilo nepušača, svega njih 20 (12.4%). Srednja vrednost indeksa paklo-godina (pack-years) iznosila je 38.2 (pakla po godini). U tabeli br. 6 prikazane su demografske karakteristike bolesnika.

Tabela 6: Demografske karakteristike bolesnika

Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>Pol</b>	
Muškarci	90 (55.9%)
Žene	71 (44.1%)
<b>Uzrast (godine)</b>	
Srednja vrednost	$61 \pm 8.5$
Opseg	37-80 godina
<b>Pušenje</b>	
Nepušač	20 (12.4%)
Aktuelni pušač	100 (62.1%)
Bivši pušač	41 (25.5%)
<b>Pack – year index</b>	
Srednja vrednost	38.2
Opseg	0 – 157.5

Broj bolesnika sa ECOG performans statusom 1 bio je 114 (70.8%), četrdeset i pet bolesnika (28.0%) je imalo ECOG performans status 0, dok je svega 2 (1.2%) bolesnika imalo ECOG performans status 2 (tabela 7).

Tabela 7: Prikaz ECOG performans statusa bolesnika

Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>ECOG performans status</b>	
<b>0</b>	45 (28.0%)
<b>1</b>	114 (70.8%)
<b>2</b>	2 (1.2%)

Najveći broj bolesnika bio je dijagnostikovao u IIIA stadijumu bolesti (23.7%), a zatim slede IIA (21.7%), IIB (20.5%), IB (18.6%) i IA (15.5%). Stadijum bolesti, T i N deskriptor detaljno su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8: T deskriptor, N deskriptor i stadijum bolesti.

Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>T</b>	
T1a	15 (9.3%)
T1b	18 (11.2%)
T2a	48 (29.8%)
T2b	38 (23.6%)
T3	38 (23.6%)
T4	4 (2.5%)
<b>N</b>	
0	97 (60.2%)
1	40 (24.8%)
2	24 (14.9%)
<b>STADIJUM</b>	
IA	25 (15.5%)
IB	30 (18.6%)
IIA	35 (21.7%)
IIB	33 (20.5%)
IIIA	38 (23.7%)

Kod većine bolesnika, njih 113 (70.2%), sprovedena je lobektomija kao metoda hirurškog lečenja, kod 26 bolesnika (16.1%) urađena je pneumonektomija, dok je kod 11 bolesnika (6.8%) urađena bilobektomija i kod isto toliko bolesnika, njih 11 (16.1%), urađena je segmentektomija. Ađuvantna hemioterapija sprovedena je kod 46% bolesnika. Vrste hirurškog tretmana prikazane su u Tabeli 9, dok je primena ađuvantne hemioterapije prikazana u Tabeli 10.

Tabela 9: Vrsta sprovedenog hirurškog tretmana

Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>Vrsta hirurškog tretmana</b>	
Segmentektomija	11 (16.1%)
Lobektomija	113 (70.2%)
Bilobektomija	11 (16.1%)
Pneumonektomija	26 (16.1%)

Tabela 10: Primena adjuvantne hemioterapije

Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>Ađuvantna hemioterapija</b>	
Da	74 (46.0%)
Ne	87 (54.0%)

Prisustvo DNK mutacija u domenu KRAS, EGFR i PI3KCA gena je određivano putem pirosekvencioniranja. Prisustvo mutacija u domenu ALK i ROS1 gena je određivano imunohistohemijski i putem fluorescentne in-situ hibridizacije. Od stotinu šezdeset i jednog testiranog tumorskog uzorka, prisustvo ispitivanih mutacija je detektovano u 96 uzoraka (59.6%). Prisustvo mutacije u domenu KRAS gena detektovano je kod 69 tumorskih uzoraka (42.9%). Od prisutnih 69 mutacija u domenu KRAS gena 61 je bila u kodonu 12,13 (88.4%), dok je 8 mutacija bilo u kodonu 61 (11.6%) (Tabela 11). Prisustvo EGFR mutacije kod 10 tumorskih uzoraka (6.2%). Pet mutacija detektovano je i eksonu 19, tri mutacije su detektovane u eksonu 21, a dve mutacije su detektovane u eksonu 18 (Tabela 12). PIK3CA mutacija detektovana je kod 7 tumorskih uzoraka (4.3%). ALK rearanžman je detektovan imunohistohemijski u 3 tumorska uzorka (1.9%),

a sva tri uzorka su potvrđena kao pozitivna i fluorescentnom in situ hibridizacijom (3 od 161, 1.9%). Prisustvo rearanžmana u ROS1 genu detektovano je imunohistochemijski u 7 tumorskih uzoraka (4.3%), a fluorescentna in situ hibridizacija je potvrdila prisustvo ROS1 rearanžmana u jednom od sedam IHC pozitivnih uzoraka (1 od 161, 0.9%). Na grafikonu 6 prikazano je procentualna zastupljenost mutacija u našem ispitivanom uzorku. Detaljan prikaz svih mutacija prikazan je na grafikonu 6.

Grafikon 6: Procentualna zastupljenost genskih alteracija u ispitivanom uzorku

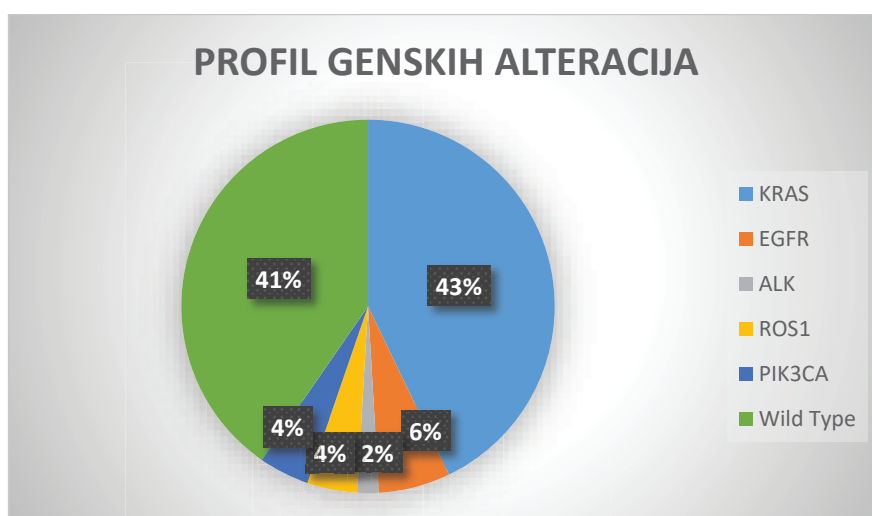


Tabela 11: Detaljan prikaz KRAS mutacionog statusa

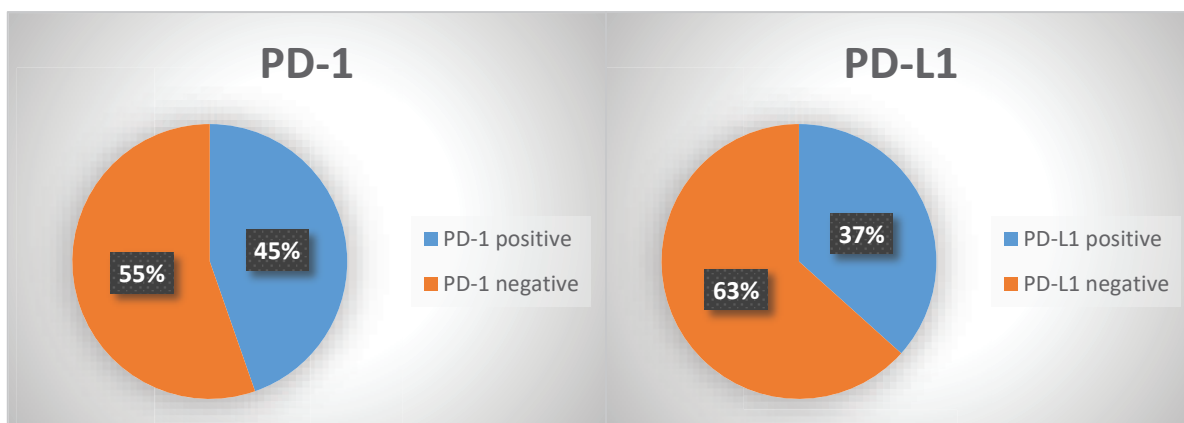
Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>KRAS (n=69)</b>	
Kodon 12,13	61 (88.4%)
Kodon 61	8 (11.6%)

Tabela 12: Detaljan prikaz EGFR mutacionog statusa

Karakteristika	Podaci (frekvence)
<b>EGFR (n=10)</b>	
Ekson 18	2 (20.0%)
Ekson 19	5 (50.0%)
Ekson 21	3 (30.0%)

PD-1 ekspresija na tumor-infiltrirajućim limfocitima i PD-L1 ekspresija na tumorskim ćelijama je određivana imunohistohemijski. Tumor-infiltrirajući limfociti su bili okarakterisani kao PD-1 pozitivni ukoliko je detektovani intenzitet bojenja bio prisutan u  $\geq 1\%$  ćelija. Na isti način, tumorske ćelije su bile okarakterisane kao PD-L1 pozitivne ukoliko je bilo koji intenzitet bojenja detektovan u  $\geq 1\%$  ćelija. Sa druge strane, ukoliko je intenzitet bojenja bio prisutan u  $< 1\%$  ćelija ekspresija je bila okarakterisana kao negativna i u slučaju PD-1 i PD-L1. PD-1 ekspresija iz tehničkih razloga nije mogla biti urađena kod 2 slučaja, dok je u preostalim 159 tumorskih uzoraka pozitivna PD-1 ekspresija je detektovana u 71 tumorskom uzorku (45%). PD-L1 pozitivna ekspresija detektovana je kod 59 od 161 tumorskog uzorka (36.6%). Od 59 PD-L1 pozitivnih uzoraka njih 31 (19.3%) je imalo procenat ekspresije od 1-49%, dok je njih 28 (17.4%) imalo PD-L1 ekspresiju veću od 50%.

Grafikon 7: PD-1 i PD-L1 zastupljenost



Poređenje PD-1 i PD-L1 ekspresije sa kliničko-patološkim karakteristikama uključujući i preživljavanje bolesnika je učinjeno u odnosu na to da li su PD-1 i PD-L1 ekspresija označene kao pozitivne ili kao negativne. PD-1 ekspresija nije bila značajno povezana ni sa jednim od kliničko-patoloških karakteristika (uključujući KRAS, EGFR, ALK, ROS1 i PI3KCA). PD-L1 ekspresija je bila statistički značajno povezana sa tipom hirurije ( $P = 0.01$ ) i sa prisustvom KRAS mutacije ( $P = 0.02$ ), dok sa ostalim kliničko-patološkim karakteristikama nije bilo statistički značajne povezanosti. Detaljan prikaz kliničko-patoloških karakteristika bolesnika u odnosu na PD-1 i PD-L1 status prikazan je u tabeli 13.



Tabela 13: Kliničko-patološke karakteristike bolesnika u odnosu na PD-1 i PD-L1 status

Karakteristika	Svi Bolesnici n=161	PD-1 Negativni n=88	PD-1 Pozitivni n=71	P vrednost	PD-L1 Negativni n=102	PD-L1 Pozitivni n=59	P vrednost
<b>Godine starosti</b>				0.18			0.65
<54	32 (19.9)	17 (19.3)	15 (21.1)		18 (17.6)	14 (23.7)	
55-64	78 (48.4)	38 (43.2)	39 (54.9)		51 (50.0)	27 (45.8)	
>64	51 (31.7)	33 (37.5)	17 (23.9)		33 (32.4)	18 (30.5)	
<b>Pol</b>				0.09			0.51
Muški	90 (55.9)	54 (61.4)	34 (47.9)		55 (53.9)	35 (59.3)	
Ženski	71 (44.1)	34 (38.6)	37 (52.1)		47 (46.1)	24 (40.7)	
<b>Pušački status</b>				0.41			0.10
Ne	20 (12.4)	13 (14.8)	7 (9.9)		15 (14.7)	5 (8.5)	
Bivši	41 (25.5)	19 (21.6)	21 (29.6)		30 (29.4)	11(18.6)	
Da	100 (62.1)	56 (63.6)	43 (60.6)		57 (55.9)	43 (72.9)	
<b>T</b>				0.33			0.27
1a	15 (9.3)	4 (4.6)	11 (15.5)		10 (9.8)	5 (8.6)	
1b	18 (11.2)	11 (12.6)	7 (9.7)		15 (14.7)	3 (5.1)	
2a	48 (29.8)	28 (31.8)	20 (28.3)		28 (27.5)	20 (33.9)	
2b	38 (23.6)	21 (23.7)	16 (22.5)		25 (24.5)	13 (22.0)	
3	38 (23.6)	22 (25.0)	15 (21.2)		23 (22.6)	15 (25.3)	
4	4 (2.5)	2 (2.3)	2 (2.8)		1 (0.9)	3 (5.1)	
<b>N</b>				0.34			0.30
0	97 (60.3)	49 (55.7)	47 (66.2)		60 (59.7)	37 (62.8)	
1	40 (24.8)	23 (26.1)	16 (22.5)		29 (24.7)	11 (18.6)	
2	24 (14.9)	16 (18.2)	8 (11.3)		13 (15.6)	11 (18.6)	
<b>Stadijum</b>				0.36			0.44
IA	25 (15.5)	10 (11.4)	15 (21.1)		19 (18.6)	6 (10.2)	
IB	30 (18.6)	16 (18.2)	14 (19.7)		17 (16.7)	13 (22.0)	
IIA	35 (21.7)	22 (25.0)	13 (18.3)		24 (23.5)	11 (18.6)	
IIB	33 (20.5)	16 (18.2)	15 (21.1)		21 (20.6)	12 (20.3)	
IIIA	38 (21.1)	24 (27.2)	14 (19.7)		21 (20.6)	17 (28.9)	
<b>ECOG</b>				0.31			0.50
0	45 (28.0)	27 (30.7)	18 (25.4)		27 (26.5)	18 (30.5)	
1	114 (70.8)	59 (67.0)	53 (74.6)		73 (71.6)	41 (69.5)	
2	2 (1.2)	2 (2.3)	0 (0.0)		2 (2.0)	0 (0)	
<b>Tip hir. lečenja</b>				0.90			0.01
Pulmektomija	26 (16.1)	15 (17.0)	9 (12.7)		12 (11.8)	14 (23.7)	
Bilobektomija	11 (6.8)	6 (6.8)	5 (7.0)		11 (10.8)	0 (0)	
Lobektomija	113 (70.2)	61 (69.3)	52 (73.2)		74 (72.5)	39 (66.1)	
Segmentektomija	11 (6.8)	6 (6.8)	5 (7.0)		5 (4.9)	6 (10.2)	
<b>Adj. hemioterapija</b>				0.49			0.34
Ne	87 (54.0)	46 (52.3)	41 (57.7)		58 (56.9)	29 (49.2)	
Da	74 (46.0)	42 (47.7)	30 (42.3)		44 (43.1)	30 (50.8)	
<b>KRAS</b>				0.97			0.026
Negativni	92 (57.1)	51 (55.4)	37 (55.2)		65 (70.7)	37 (53.6)	
Pozitivni	69 (42.9)	41 (44.6)	30 (44.8)		27 (29.3)	32 (46.4)	
<b>EGFR</b>				0.72			0.26
Negativni	151(93.8)	83 (55.7)	5 (50.0)		94 (62.2)	8 (80.0)	
Pozitivni	10 (6.2)	66 (44.3)	5 (50.0)		57 (37.8)	2 (20.0)	
<b>ALK</b>				0.69			0.10
Negativni	158 (98.1)	86 (55.1)	2 (66.7)		101 (63.9)	1 (33.3)	
Pozitivni	3 (1.9)	70 (44.9)	1 (33.3)		57 (36.1)	2 (66.7)	
<b>ROS1</b>				0.09			0.10
Negativni	154 (95.7)	87 (55.1)	1 (28.6)		100 (64.9)	2 (28.6)	
Pozitivni	7 (4.3)	66 (44.9)	5 (71.4)		54 (35.1)	5 (71.4)	
<b>PIK3CA</b>				0.92			0.10
Negativni	154 (95.7)	84 (55.3)	4 (57.1)		100 (64.9)	2 (28.6)	
Pozitivni	7 (4.3)	68 (44.7)	3 (42.9)		54 (35.1)	5 (71.4)	

Mutacioni status u domenu KRAS gena je bilo statistički značajno povezan sa godinama starosti ( $P = 0.004$ ), polom ( $P = 0.006$ ) i pušačkim statusom ( $P = 0.004$ ). Detaljan prikaz kliničko-patoloških karakteristika bolesnika u odnosu na KRAS mutacioni status prikazan je u tabeli 14.

Tabela 14: Kliničko-patološke karakteristike bolesnika u odnosu na KRAS status

Karakterisitika	Svi bolesnici n=161	KRAS negativni n=92	KRAS pozitivni n=69	P vrednost
<b>Godine starosti</b>				<b>0.004</b>
<54	32 (19.9)	19 (20.7)	13 (18.8)	
55-64	78 (48.4)	35 (38.0)	43 (62.4)	
>64	51 (31.7)	38 (41.3)	13 (23.9)	
<b>Pol</b>				<b>0.006</b>
Muški	90 (55.9)	60 (65.2)	30 (43.5)	
Ženski	71 (44.1)	32 (34.8)	39 (56.5)	
<b>Pušački status</b>				<b>0.004</b>
Ne	20 (12.4)	17 (18.5)	3 (4.3)	
Bivši	41 (25.5)	27 (29.3)	14 (20.3)	
Da	100 (62.1)	48 (52.2)	52 (75.4)	
<b>T</b>				0.46
1a	15 (9.3)	11 (11.9)	4 (5.8)	
1b	18 (11.2)	10 (10.9)	8 (11.6)	
2a	48 (29.8)	28 (30.4)	20 (28.9)	
2b	38 (23.6)	17 (18.5)	21 (30.4)	
3	38 (23.6)	24 (26.1)	14 (20.3)	
4	4 (2.5)	2 (2.2)	2 (2.9)	
<b>N</b>				0.51
0	97 (60.3)	53 (57.6)	44 (63.8)	
1	40 (24.8)	26 (28.3)	14 (20.3)	
2	24 (14.9)	13 (14.1)	11 (15.9)	
<b>Stadijum</b>				0.62
IA	25 (15.5)	16 (17.4)	9 (13.1)	
IB	30 (18.6)	18 (19.6)	12 (17.4)	
IIA	35 (21.7)	16 (17.4)	19 (27.5)	
IIB	33 (20.5)	19 (20.7)	14 (20.3)	
IIIA	38 (23.6)	23 (25.0)	15 (21.7)	
<b>ECOG</b>				0.46
0	45 (28.0)	26 (28.3)	19 (27.5)	
1	114 (70.8)	64 (69.5)	50 (72.5)	
2	2 (1.2)	2 (2.2)	0 (0.0)	
<b>Tip hir. lečenja</b>				0.36
Pulmektomija	26 (16.1)	13 (14.1)	13 (18.8)	
Bilobektomija	11 (6.8)	9 (9.8)	2 (2.9)	
Lobektomija	113 (70.2)	64 (69.6)	49 (71.0)	
Segmentektomija	11 (6.8)	6 (6.5)	5 (7.3)	
<b>Adj. hemioterapija</b>				0.92
Ne	87 (54.0)	50 (54.3)	37 (53.6)	
Da	74 (46.0)	42 (45.7)	32 (46.4)	

Mutacioni status u domenu EGFR gena je bilo statistički značajno povezan sa pušenjem ( $P < 0.001$ ) i sa godinama starosti ( $P = 0.013$ ). U tabeli 15 prikazan je detaljan odnos kliničko-patoloških karakteristika u odnosu na EGFR mutacioni status.

Tabela 15: Kliničko-patološke karakteristike bolesnika u odnosu na EGFR status

Karakterisitika	Svi bolesnici n=161	EGFR Negativni n=151	EGFR pozitivni n=10	P vrednost
<b>Godine starosti</b>				<b>0.013</b>
<54	32 (19.9)	30 (19.9)	2 (20.0)	
55-64	78 (48.4)	77 (51.0)	1 (10.0)	
>64	51 (31.7)	44 (29.1)	7 (70.0)	
<b>Pol</b>				0.11
Muški	90 (55.9)	87 (57.6)	3 (30.0)	
Ženski	71 (44.1)	64 (42.4)	7 (70.0)	
<b>Pušački status</b>				<b>0.000</b>
Ne	20 (12.4)	15 (9.9)	5 (4.3)	
Bivši	41 (25.5)	37 (24.5)	4 (75.4)	
Da	100 (62.1)	99 (65.6)	1 (20.3)	
<b>T</b>				0.10
1a	15 (9.3)	14 (9.3)	1 (10.0)	
1b	18 (11.2)	15 (9.9)	3 (30.0)	
2a	48 (29.8)	43 (28.5)	5 (50.0)	
2b	38 (23.6)	37 (24.5)	1 (10.0)	
3	38 (23.6)	33 (21.9)	0 (0.0)	
4	4 (2.5)	4 (2.7)	0 (0.0)	
<b>N</b>				0.07
0	97 (60.3)	94 (62.3)	3 (30.0)	
1	40 (24.8)	35 (23.2)	5 (50.0)	
2	24 (14.9)	22 (14.5)	2 (20.0)	
<b>Stadijum</b>				0.64
IA	25 (15.5)	23 (15.2)	2 (20.0)	
IB	30 (18.6)	29 (19.2)	1 (10.0)	
IIA	35 (21.7)	31 (20.5)	4 (40.0)	
IIB	33 (20.5)	32 (21.2)	1 (10.0)	
IIIA	38 (23.6)	36 (23.8)	2 (20.0)	
<b>ECOG</b>				0.53
0	45 (28.0)	41 (27.2)	4 (40.0)	
1	114 (70.8)	108 (71.5)	6 (60.0)	
2	2 (1.2)	2 (1.3)	0 (0.0)	
<b>Tip hir. lečenja</b>				0.23
Pulmektomija	26 (16.1)	25 (16.5)	1 (10.0)	
Bilobektomija	11 (6.8)	10 (6.6)	1 (10.0)	
Lobektomija	113 (70.2)	107(70.9)	6 (60.0)	
Segmentektomija	11 (6.8)	9 (6.0)	2 (20.0)	
<b>Adj. hemioterapija</b>				0.51
Ne	87 (54.0)	83 (55.0)	4 (40.0)	
Da	74 (46.0)	68 (45.0)	6 (60.0)	

Mutacioni statusi u domenu gena za ALK, ROS1 i PI3KCA nisu bili statistički značajno povezani ni sa jednom od ispitivanih kliničko-patoloških karakteristika. Detaljan prikaz kliničko-patoloških karakteristika bolesnika u odnosu na ALK, ROS1 i PI3KCA mutacioni status prikazan je u tabeli 16, 17 i 18.

Tabela 16: Kliničko-patološke karakteristike bolesnika u odnosu na ALK status

Karakterisitika	Svi Bolesnici n=161	ALK Negativni n=158	ALK Pozitivni n=3	P vrednost
<b>Godine starosti</b>				0.80
<54	32 (19.9)	31 (19.6)	1 (33.3)	
55-64	78 (48.4)	77 (48.7)	1 (33.3)	
>64	51 (31.7)	50 (31.7)	1 (33.3)	
<b>Pol</b>				0.26
Muški	90 (55.9)	87 (55.1)	3(100.0)	
Ženski	71 (44.1)	71 (44.9)	0 (0.0)	
<b>Pušački status</b>				0.08
Ne	20 (12.4)	18 (11.4)	2 (66.7)	
Bivši	41 (25.5)	41 (62.7)	0 (0.0)	
Da	100 (62.1)	99 (25.9)	1 (33.3)	
<b>T</b>				0.63
1a	15 (9.3)	15 (9.5)	0 (0.0)	
1b	18 (11.2)	18 (11.4)	0 (0.0)	
2a	48 (29.8)	46 (29.2)	2 (66.7)	
2b	38 (23.6)	38 (24.0)	0 (10.0)	
3	38 (23.6)	38(24.0)	0 (0.0)	
4	4 (2.5)	3 (1.9)	1 (33.3)	
<b>N</b>				0.75
0	97 (60.3)	95 (60.1)	2 (66.7)	
1	40 (24.8)	39 (24.7)	1 (33.3)	
2	24 (14.9)	24 (15.2)	0 (20.0)	
<b>Stadijum</b>				0.23
IA	25 (15.5)	25 (15.8)	0 (0.0)	
IB	30 (18.6)	28 (17.7)	2 (66.7)	
IIA	35 (21.7)	35 (22.2)	0 (0.0)	
IIB	33 (20.5)	33 (20.9)	0 (0.0)	
IIIA	38 (23.6)	37 (23.4)	1 (33.3)	
<b>ECOG</b>				0.96
0	45 (28.0)	44 (27.8)	1 (33.3)	
1	114 (70.8)	112 (70.9)	2 (66.7)	
2	2 (1.2)	2 (1.3)	0 (0.0)	
<b>Tip hir. lečenja</b>				0.77
Pulmektomija	26 (16.1)	26 (16.2)	0 (0.0)	
Bilobektomija	11 (6.8)	10 (7.1)	1 (33.3)	
Lobektomija	113 (70.2)	111(70.1)	2 (66.7)	
Segmentektomija	11 (6.8)	11 (6.6)	0 (0.0)	
<b>Adj. hemioterapija</b>				0.59
Ne	87 (54.0)	86 (54.4)	1 (33.3)	
Da	74 (46.0)	72 (45.6)	2 (66.7)	

Tabela 17: Kliničko-patološke karakteristike bolesnika u odnosu na ROS1 status

Karakterisitika	Svi Bolesnici n=161	ROS1 Negativni n=154	ROS1 Pozitivni n=7	P vrednost
<b>Godine starosti</b>				0.33
<54	32 (19.9)	31 (20.1)	1 (14.3)	
55-64	78 (48.4)	76 (49.4)	2 (28.6)	
>64	51 (31.7)	47 (30.5)	4 (57.1)	
<b>Pol</b>				0.13
Muški	90 (55.9)	84 (54.5)	6 (85.7)	
Ženski	71 (44.1)	70 (45.5)	1 (14.3)	
<b>Pušački status</b>				0.52
Ne	20 (12.4)	19 (12.3)	1 (14.2)	
Bivši	41 (25.5)	38 (24.7)	3 (42.9)	
Da	100 (62.1)	97 (63.0)	3 (42.9)	
<b>T</b>				0.51
1a	15 (9.3)	13 (8.5)	2 (28.6)	
1b	18 (11.2)	18 (11.7)	0 (0.0)	
2a	48 (29.8)	45 (29.2)	3 (42.8)	
2b	38 (23.6)	37 (24.0)	1 (14.3)	
3	38 (23.6)	37 (24.0)	1 (14.3)	
4	4 (2.5)	4 (2.6)	0 (0.0)	
<b>N</b>				0.74
0	97 (60.3)	92 (59.7)	5 (71.4)	
1	40 (24.8)	38 (24.7)	2 (28.6)	
2	24 (14.9)	24 (15.6)	0 (0.0)	
<b>Stadijum</b>				0.50
IA	25 (15.5)	23 (14.9)	2 (28.6)	
IB	30 (18.6)	28 (18.2)	2 (28.6)	
IIA	35 (21.7)	34 (22.1)	1 (14.2)	
IIB	33 (20.5)	31 (20.1)	2 (28.6)	
IIIA	38 (23.6)	38 (24.7)	0 (0.0)	
<b>ECOG</b>				0.67
0	45 (28.0)	44 (28.6)	1 (14.3)	
1	114 (70.8)	108 (70.1)	6 (85.7)	
2	2 (1.2)	2 (1.3)	0 (0.0)	
<b>Tip hir. lečenja</b>				0.77
Pulmektomija	26 (16.1)	25 (16.2)	1 (14.3)	
Bilobektomija	11 (6.8)	11 (7.1)	0 (0.0)	
Lobektomija	113 (70.2)	108 (70.1)	5 (71.4)	
Segmentektomija	11 (6.8)	10 (6.6)	1 (14.3)	
<b>Adj. hemioterapija</b>				0.25
Ne	87 (54.0)	85 (55.2)	2 (28.6)	
Da	74 (46.0)	69 (44.8)	5 (71.4)	

Tabela 17: Kliničko-patološke karakteristike bolesnika u odnosu na ROS1 status

Karakterisitika	Svi Bolesnici n=161	PIK3CA Negativni n=154	PIK3CA Pozitivni n=7	P vrednost
<b>Godine starosti</b>				0.56
<54	32 (19.9)	30 (19.5)	2 (28.6)	
55-64	78 (48.4)	76 (49.4)	2 (28.6)	
>64	51 (31.7)	48 (31.1)	3 (42.8)	
<b>Pol</b>				0.46
Muški	90 (55.9)	85 (55.2)	5 (71.4)	
Ženski	71 (44.1)	69 (44.8)	2 (28.6)	
<b>Pušački status</b>				0.60
Ne	20 (12.4)	20 (13.0)	0 (0.0)	
Bivši	41 (25.5)	39 (25.3)	2 (28.6)	
Da	100 (62.1)	95 (61.7)	5 (71.4)	
<b>T</b>				0.10
1a	15 (9.3)	15 (9.7)	0 (10.0)	
1b	18 (11.2)	18 (11.7)	0 (30.0)	
2a	48 (29.8)	46 (29.9)	2 (28.6)	
2b	38 (23.6)	35 (22.7)	3 (42.8)	
3	38 (23.6)	36 (23.4)	2 (28.6)	
4	4 (2.5)	4 (2.6)	0 (0.0)	
<b>N</b>				0.48
0	97 (60.3)	94 (61.0)	3 (42.9)	
1	40 (24.8)	37 (24.0)	3 (42.9)	
2	24 (14.9)	23 (15.0)	1 (14.2)	
<b>Stadijum</b>				0.36
IA	25 (15.5)	25 (15.2)	0 (0.0)	
IB	30 (18.6)	30 (19.2)	0 (0.0)	
IIA	35 (21.7)	32 (20.5)	3 (42.8)	
IIB	33 (20.5)	31 (21.2)	2 (28.6)	
IIIA	38 (23.6)	36 (23.8)	2 (28.6)	
<b>ECOG</b>				0.65
0	45 (28.0)	42 (27.3)	3 (42.9)	
1	114 (70.8)	110 (71.4)	4 (57.1)	
2	2 (1.2)	2 (1.3)	0 (0.0)	
<b>Tip hir. lečenja</b>				0.77
Pulmektomija	26 (16.1)	25 (16.2)	1 (14.3)	
Bilobektomija	11 (6.8)	11 (7.1)	0 (0.0)	
Lobektomija	113 (70.2)	108(70.1)	5 (71.4)	
Segmentektomija	11 (6.8)	10 (6.6)	1 (14.3)	
<b>Adj. hemioterapija</b>				0.25
Ne	87 (54.0)	85 (55.2)	2 (28.6)	
Da	74 (46.0)	69 (44.8)	5 (71.4)	

Srednje vreme praćenja bolesnika bilo je 2,5 godine (95% interval poverenja [CI] 2.2 do 2.8 godine), pri čemu je u tom trenutku 78 od 161 (48%) bolesnika imalo povratak bolesti, a 60 od 161 (37%) bolesnika je umrlo.

U univarijantnoj analizi, deskriptor T (Rizik za povratak bolesti 1.49; 95% CI 1,23-1,81;  $P < 0.001$ ), deskriptor N (Rizik za povratak bolesti 1.42; 95% CI 1,06-1,92;  $P = 0.02$ ), stadijum bolesti (Rizik za povratak bolesti 1.39; 95% CI 1.19 - 1.64;  $P < 0.001$ ), tip hirurške intervencije (Rizik za povratak bolesti 0.65; 95% CI 0.50 - 0.84;  $P = 0.001$ ), i adjuvantna hemioterapija (Rizik za povratak bolesti 2.05; 95% CI 1.30 - 3.24;  $P = 0.002$ ) su bili statistički značajno povezani sa preživljavanjem bez povratka bolesti. Bolesnici u čijim je uzorcima tumora dokazana PD-1 pozitivnost su imali značajno duže preživljavanje bez povratka bolesti (Rizik za povratak bolesti 0.53; 95% CI 0.33 - 0.84;  $P = 0.008$ ) dok prisustvo PD-L1 ekspresije (Rizik za povratak bolesti 1.05; 95% CI 0.66 - 1.66;  $P = 0.84$ ), KRAS mutacije (Rizik za povratak bolesti 1.0; 95% CI 0.64 - 1.57;  $P = 0.99$ ), EGFR mutacije (Rizik za povratak bolesti 0.64; 95% CI 0.20 - 2.04;  $P = 0.45$ ). Ostale, manje zastupljene genske alteracije poput ALK i ROS1 rearanžmana i PIK3CA mutacija, također nisu imale uticaja na preživljavanje bez povratka bolesti (Tabela 19).

Deskriptor T bolesti (Rizik za smrtni ishod 1.37; 95% CI 1,09-1,71;  $P = 0.006$ ), deskriptor N bolesti (Rizik za smrtni ishod 1.63; 95% CI 1,17-2,29;  $P = 0.004$ ), stadijum bolesti (Rizik za smrtni ishod 1.41; 95% CI 1.16-1.72;  $P < 0.001$ ), tip hirurške intervencije (Rizik za smrtni ishod 0.65; 95% CI 0.48-0.87;  $P = 0.004$ ) i adjuvantna hemioterapija (Rizik za smrtni ishod 2.57; 95% CI 1.50-4.38;  $P = 0.001$ ) su bili statistički značajno povezani i sa ukupnim preživljavanjem. Bolesnici sa PD-1 pozitivnim tumor-infiltrirajućim ćelijama su imali statistički značajno duže ukupno preživljavanje u odnosu na bolesnike sa PD-1 negativnim tumor-infiltrirajućim ćelijama (Rizik za smrtni ishod 0.47; 95% CI 0.27-0.80;  $P = 0.006$ ) dok prisustvo PD-L1 ekspresije (Rizik za smrtni ishod 0.70; 95% CI 0.40-1.21;  $P = 0.20$ ), KRAS mutacije (Rizik za smrtni ishod 0.89; 95% CI 0.53-1.40;  $P = 0.65$ ) i EGFR mutacije (Rizik za smrtni ishod 1.13; 95% CI 0.41-3.12;  $P = 0.82$ ), ALK i ROS1 rearanžman i PIK3CA mutacije nije imalo uticaja na dužinu preživljavanja bolesnika (Tabela 19).

Tabela 19: Univarijantna analiza

UNIVARIJANTNA ANALIZA						
Varijabla	Rizik za povratak bolesti	95% CI*	P vrednost	Rizik od smrtnog ishoda	95% CI	P vrednost
Godine	0,90	0,66-1,23	0,51	1,21	0,85-1,72	0,29
Pol	0,87	0,56-1,36	0,54	0,94	0,56-1,56	0,81
Pušenje	0,73	0,51-1,05	0,07	0,75	0,51-1,11	0,16
T	1,49	1,23-1,81	<0,001	1,37	1,09-1,71	0,006
N	1,42	1,06-1,92	0,02	1,63	1,17-2,29	0,004
Stadijum	1,39	1,19-1,64	<0,001	1,41	1,16-1,72	<0,001
ECOG	0,78	0,49-1,25	0,30	0,88	0,52-1,49	0,63
Vrsta hir. intervencije	0,65	0,50-0,84	0,001	0,65	0,48-0,87	0,004
Adjuvantna hemoterapija	2,05	1,30-3,24	0,002	2,57	1,50-4,38	0,001
PD-1	0,53	0,33-0,84	0,008	0,47	0,27-0,80	0,006
PD-L1	1,05	0,66-1,66	0,84	0,70	0,40-1,21	0,20
EGFR	0,64	0,20-2,04	0,45	1,13	0,41-3,12	0,82
KRAS	1,0	0,64-1,57	0,99	0,89	0,53-1,40	0,65
PIK3CA	0,98	0,31-3,15	0,98	1,08	0,34-3,45	0,90
ALK	0,58	0,08-4,19	0,59	0,55	0,08-4,03	0,56
ROS1	0,55	0,13-2,28	0,41	0,39	0,05-2,80	0,35

U multivarijantnoj analizi stadijum bolesti (Rizik za povratak bolesti 1.25; 95% CI 1.03 - 1.51; P = 0.02) je bio statistički značajno povezan sa preživljavanjem bez povratka bolesti (Tabela 15). Sa druge strane, primena adjuvantne hemioterapije (Rizik za smrtni ishod 1.97; 95% CI 1.03 - 3.78; P = 0.04) je bila statistički značajno povezana sa ukupnim preživljavanjem (Tabela 15). Nezavistan efekat prisustva KRAS, EGFR, PIK3CA mutacije, ALK i ROS1 rearanžmana, PD-1 ekspresije i PD-L1 ekspresije na preživljavanje bez povratka bolesti i ukupno preživljavanje analizirano je pomoću Coxove regresije prilagođene za starost, pol, stadijum bolesti, ECOG performans status, tip hirurģije i adjuvantu terapiju. U ovoj analizi PD-1 ekspresija je bila statistički značajno povezana sa preživljavanjem bez povratka bolesti (prilagođeni rizik za povratak bolesti 0.58; 95% CI 0.36-0.94; P = 0.03) i ukupnim preživljavanjem (prilagođeni rizik za smrtni ishod 0.47; 95% CI 0.27-0.84; P = 0.01) te samim tim PD-1 ekspresija predstavlja nezavistan prognostički faktor kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. Sa druge strane, PD-L1 ekspresija (prilagođeni rizik za povratak bolesti 0.89; 95% CI 0.53-1.49; P = 0.66), (prilagođeni rizik za smrtni



ishod 0.58; 95% CI 0.32-1.07; P = 0.08), KRAS mutacioni status (prilagođen rizik za povratak bolesti 1.08; 95% CI 0.67-1.73; P = 0.76), (prilagođen rizik za smrtni ishod 1.03; 95% CI 0.59-1.81; P = 0.91) i EGFR mutacioni status (prilagođen rizik za povratak bolesti 0.85; 95% CI 0.26-2.82; P = 0.79), (prilagođen rizik za smrtni ishod 1.37; 95% CI 0.46-4.07; P = 0.57) nisu bili statistički značajno povezani sa preživljavanjem bez povratka bolesti niti sa ukupnim preživljavanjem bolesnika. Prisustvo ALK i ROS1 rearanžmana i PIK3CA mutacioni status također nisu bili značajno povezani sa preživljavanjem bez povratka bolesti niti sa ukupnim preživljavanjem bolesnika (Tabela 20).

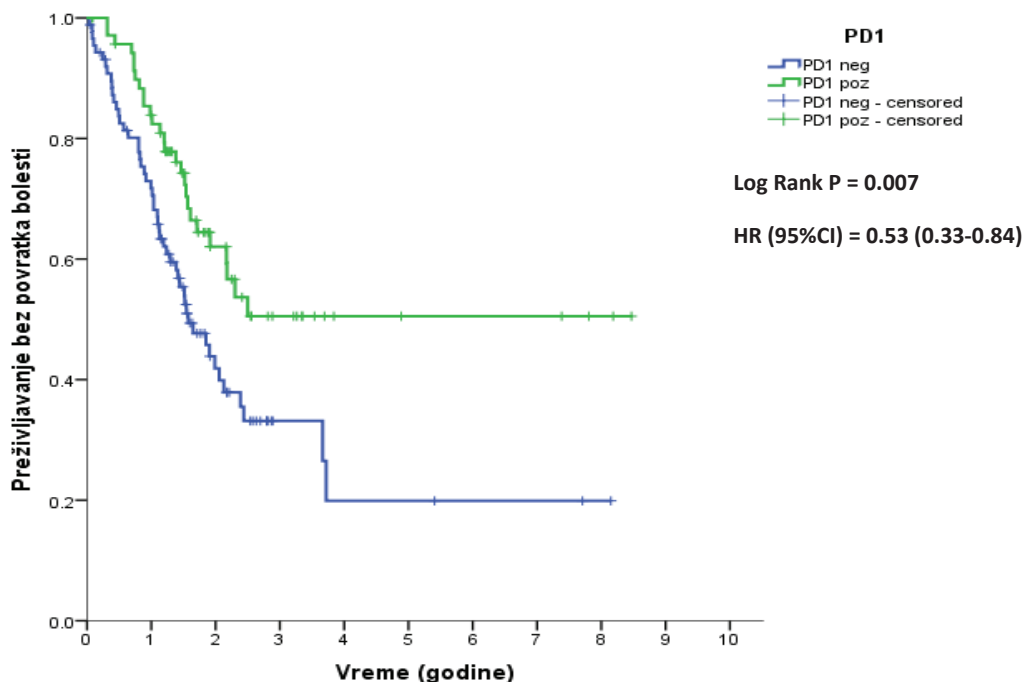
Tabela 20: Multivarijantna analiza

MULTIVARIJANTNA ANALIZA						
Varijabla	Rizik za povratak bolesti	95% CI*	P vrednost	Rizik od smrtnog ishoda	95% CI	P vrednost
Godine	0,98	0,70-1,33	0,87	1,30	0,91-1,88	0,15
Pol	0,92	0,58-1,47	0,73	1,13	0,66-1,94	0,65
Stadijum	1,25	1,03-1,51	<b>0,02</b>	1,24	0,97-1,57	0,08
ECOG	0,83	0,50-1,36	0,45	0,77	0,44-1,36	0,37
Vrsta hir. intervencije	0,78	0,59-1,05	0,10	0,81	0,59-1,11	0,20
Ađuvantna hemoterapija	1,36	0,78-2,35	0,28	1,97	1,03-3,78	<b>0,04</b>
PD-1	0,59	0,37-0,95	<b>0,03</b>	0,47	0,27-0,84	<b>0,01</b>
PD-L1	0,89	0,53-1,49	0,66	0,58	0,32-1,07	0,08
EGFR	0,85	0,26-2,82	0,79	1,37	0,46-4,07	0,57
KRAS	1,08	0,67-1,73	0,76	1,03	0,59-1,81	0,91
PIK3CA	0,84	0,25-2,88	0,79	0,96	0,29-3,19	0,94
ALK	0,51	0,07-3,88	0,52	0,66	0,09-5,03	0,69
ROS1	1,56	0,33-7,33	0,57	0,58	0,07-4,77	0,61

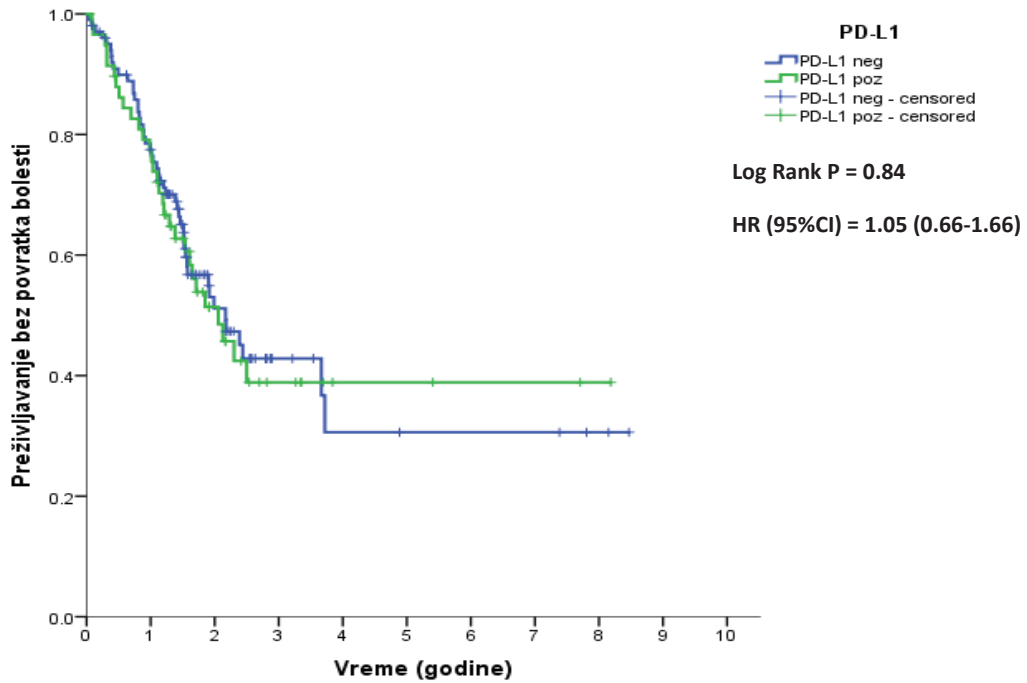
Petogodišnje preživljavanje bez povratka bolesti svih bolesnika je iznosilo 34%. Bolesnici sa PD-1 pozitivnim imunskim ćelijama su imali statistički značajno duže preživljavanje bez povratka bolesti u odnosu na bolesnike sa PD-1 negativnim imunskim ćelijama. Petogodišnje preživljavanje bez progresije bolesti za bolesnike sa PD-1 pozitivnim imunskim ćelijama iznosilo je 51% dok je za bolesnike sa PD-1 negativnim imunskim ćelijama iznosilo 20% (P=0.007) (Grafikon 8). U pogledu PD-L1 ekspresije i preživljavanja bez povratka bolesti nije evidentirana statistički značajna povezanost. Petogodišnje preživljavanje bez progresije bolesti za bolesnike sa PD-L1

pozitivnim tumorskim ćelijama iznosilo je 31% dok je za bolesnike sa PD-L1 negativnim tumorskim ćelijama iznosilo 39% ( $P=0.84$ ) (Grafikon 9). Takođe, nije bilo statistički značajne povezanosti između KRAS mutacionog statusa i preživljavanja bez povratka bolesti. Bolesnici sa KRAS mutiranim tumorima su imali petogodišnje preživljavanje bez progresije 39%, dok su bolesnici sa KRAS negativnim tumorima imali petogodišnje preživljavanje bez povratka bolesti 32% ( $P=0.94$ ) (Grafikon 10). Bolesnici sa EGFR mutiranim tumorima su imali petogodišnje preživljavanje bez progresije 67%, dok su bolesnici sa EGFR negativnim tumorima imali petogodišnje preživljavanje bez povratka bolesti 32% ( $P=0.45$ ) (Grafikon 11). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju bez povratka bolesti bolesnika sa ALK, ROS1 i PIK3CA pozitivnim tumorima i bolesnika sa divljum tipom ALK, ROS1 i PIK3CA gena. (Grafikon 12, Grafikon 13 i Grafikon 14).

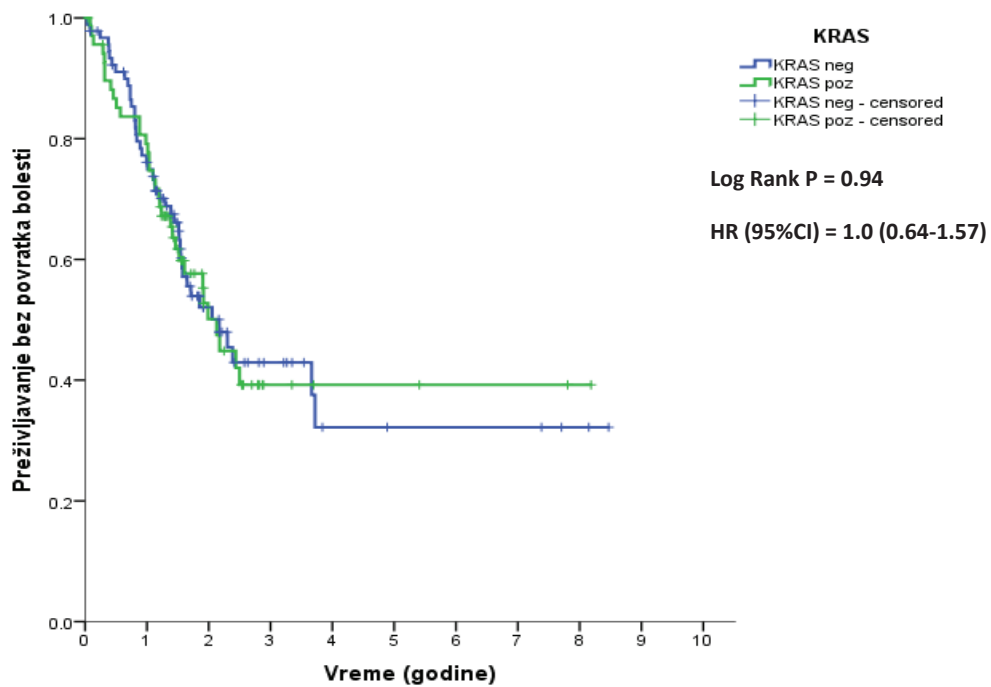
Grfikon 8. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na PD1 status



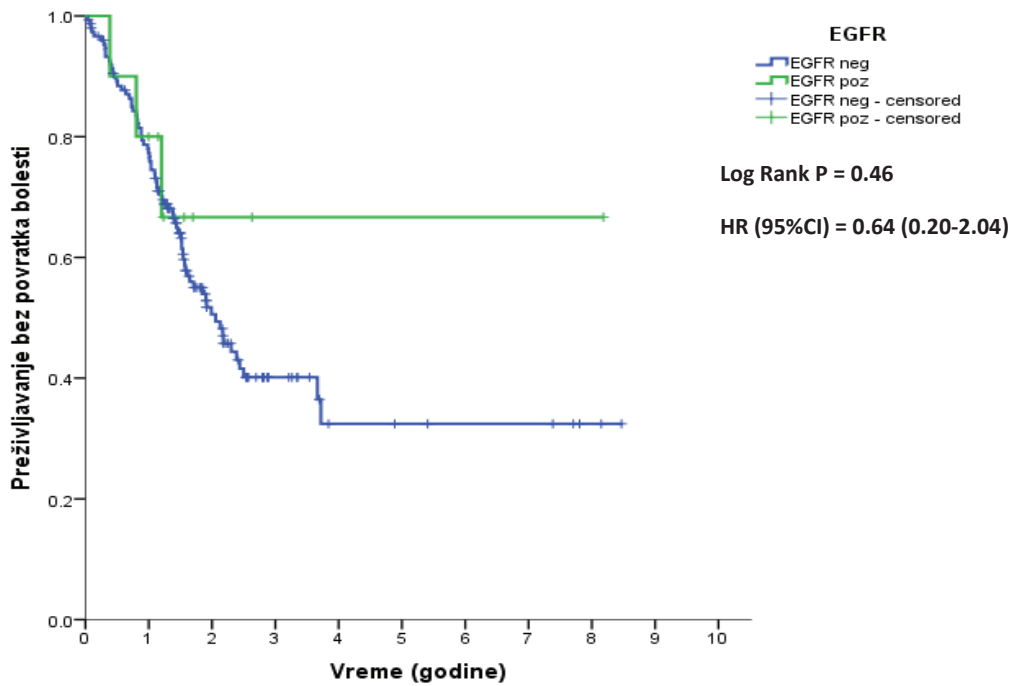
Grafikon 9. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na PD-L1 status



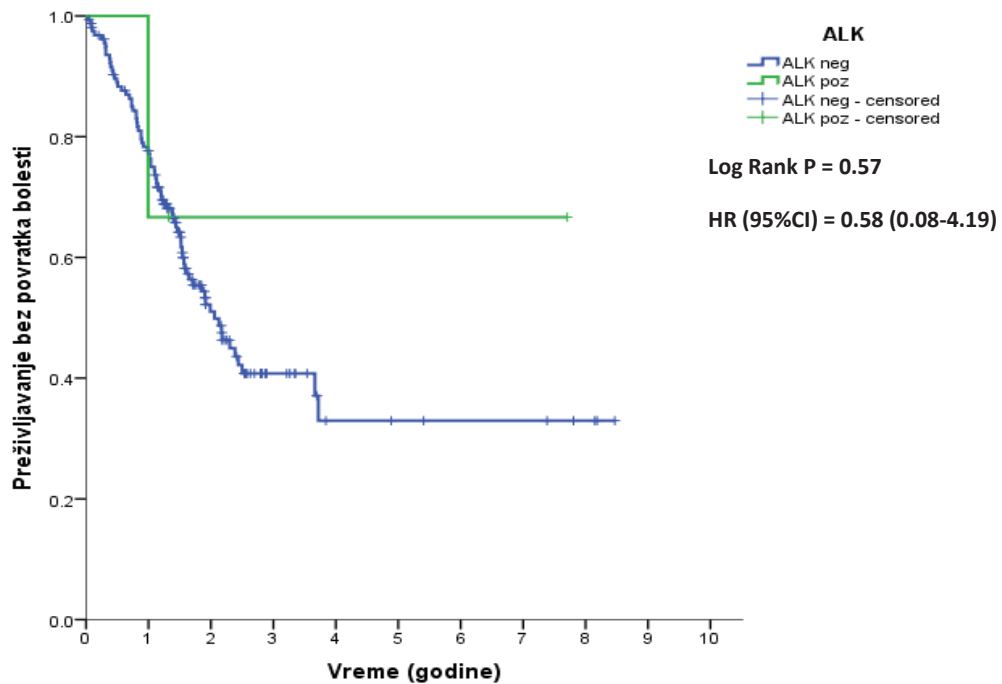
Grafikon 10. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na KRAS status



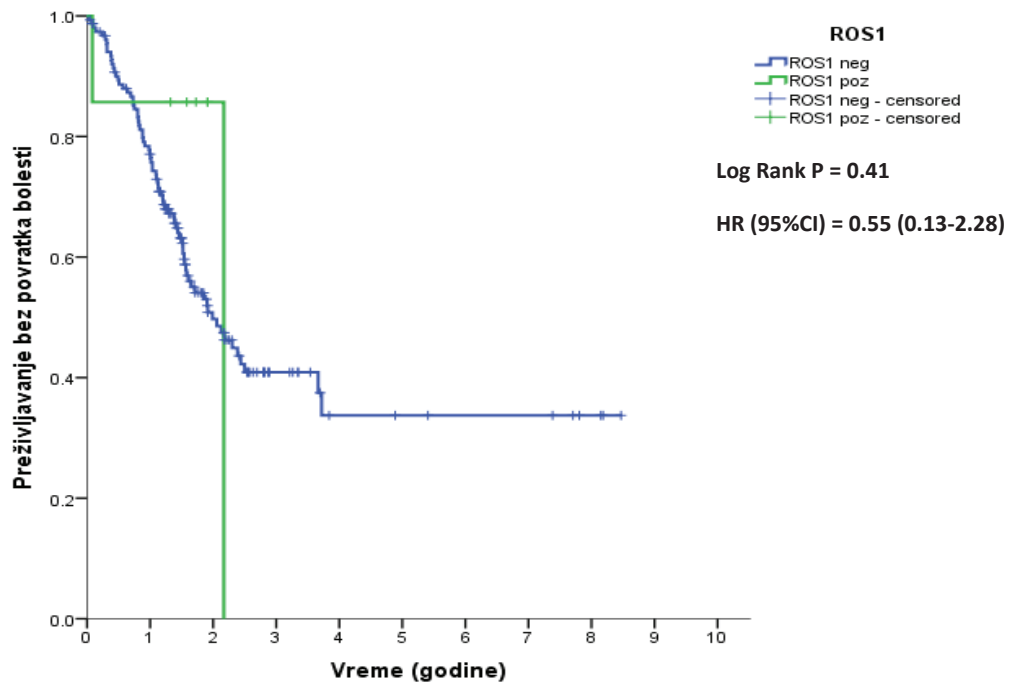
Grafikon 11. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na EGFR status



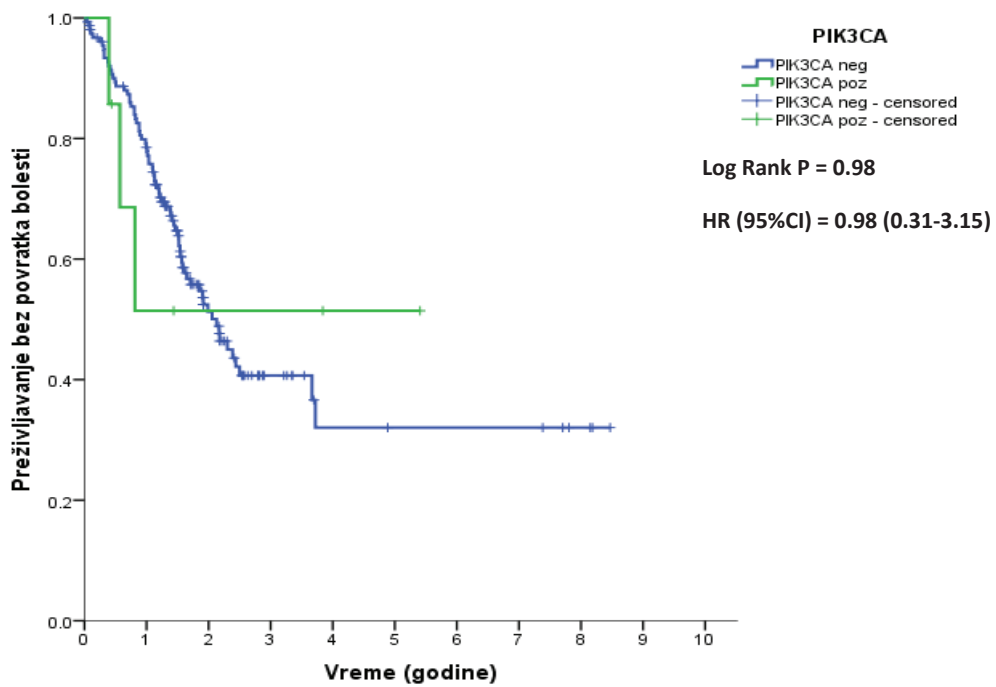
Grafikon 12. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na ALK status



Grafikon 13. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na ROS1 status

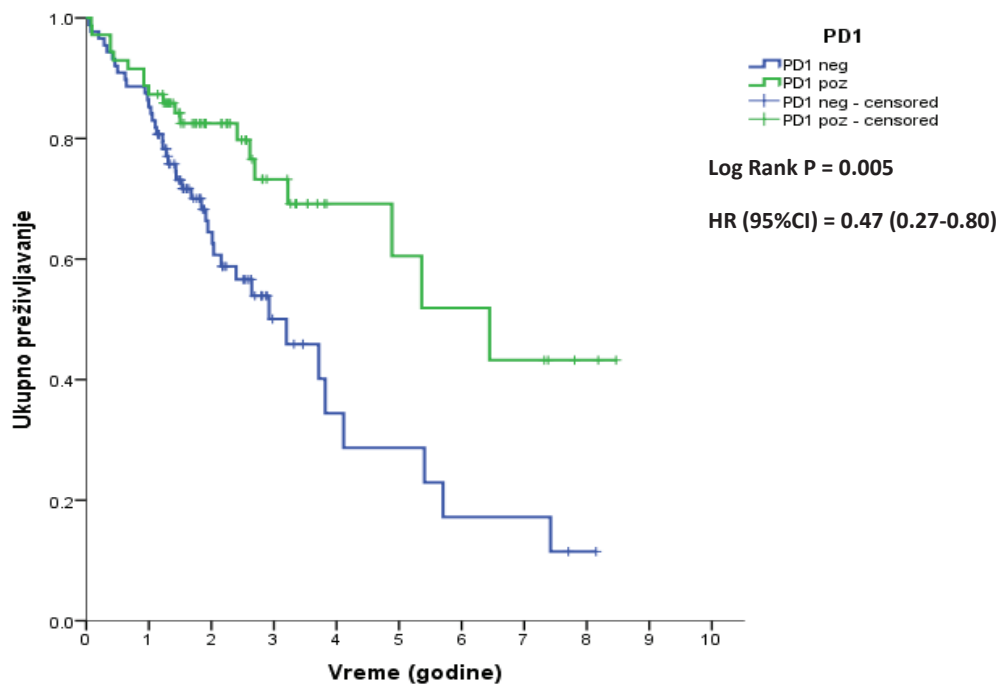


Grafikon 14. Preživljavanje bez povratka bolesti bolesnika u odnosu na PIK3CA status

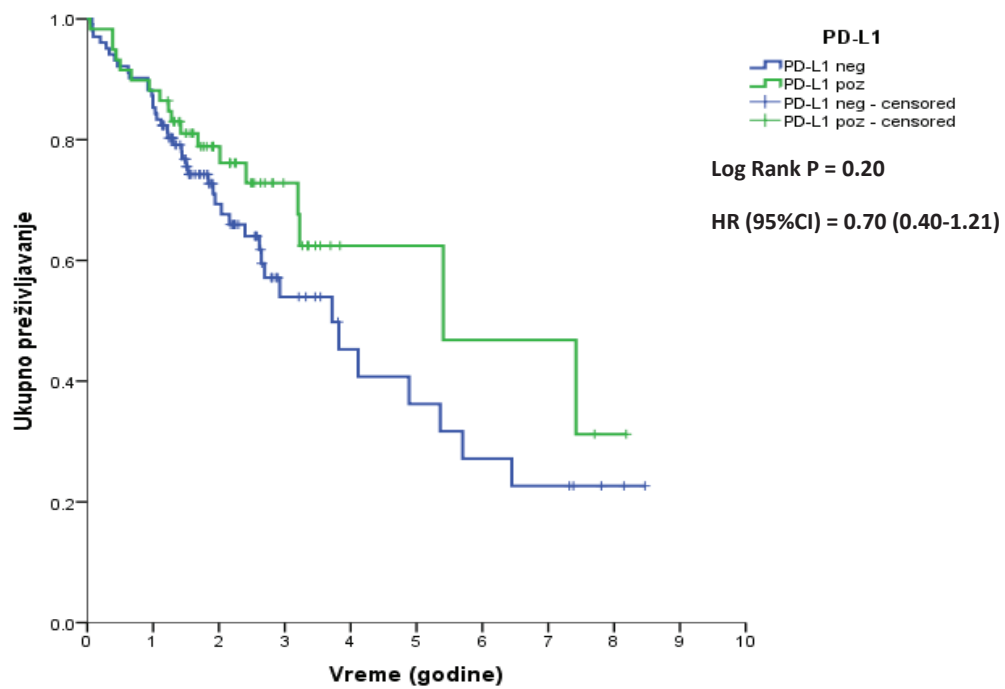


Petogodišnje ukupno preživljavanje svih 161 bolesnika bilo je 43%. Kod bolesnika sa PD-1 pozitivnim imunskim ćelijama petogodišnje ukupno preživljavanje je bilo 61% i bilo je statistički značajno duže u odnosu na bolesnike sa PD-1 negativnim imunskim ćelijama kod kojih je ukupno petogodišnje preživljavanje bilo 29% ( $P=0.005$ ) (Grafikon 15). Kod bolesnika sa PD-L1 pozitivnim imunskim ćelijama petogodišnje ukupno preživljavanje je bilo 62% dok je kod bolesnika sa PD-L1 negativnim imunskim ćelijama bilo 36% što nije predstavljalo statistički značajnu razliku ( $P=0.20$ ) (Grafikon 16). Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju bolesnika sa KRAS mutiranim i KRAS negativnim tumorima. Petogodišnje ukupno preživljavanje kod bolesnika sa KRAS mutiranim tumorima bilo je 44% dok je petogodišnje preživljavanje kod bolesnika sa KRAS negativnim tumorima bilo 45% ( $P=0.64$ ) (Grafikon 17). Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju bolesnika sa EGFR mutiranim i EGFR negativnim tumorima. Petogodišnje ukupno preživljavanje kod bolesnika sa EGFR mutiranim tumorima bilo je 58% dok je petogodišnje preživljavanje kod bolesnika sa EGFR negativnim tumorima bilo 43% ( $P=0.81$ ) (Grafikon 18). Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju bolesnika sa ALK, ROS1 i PIK3CA pozitivnim tumorima i bolesnika sa divljum tipom ALK, ROS1 i PIK3CA gena. (Grafikon 19, Grafikon 20 i Grafikon 21).

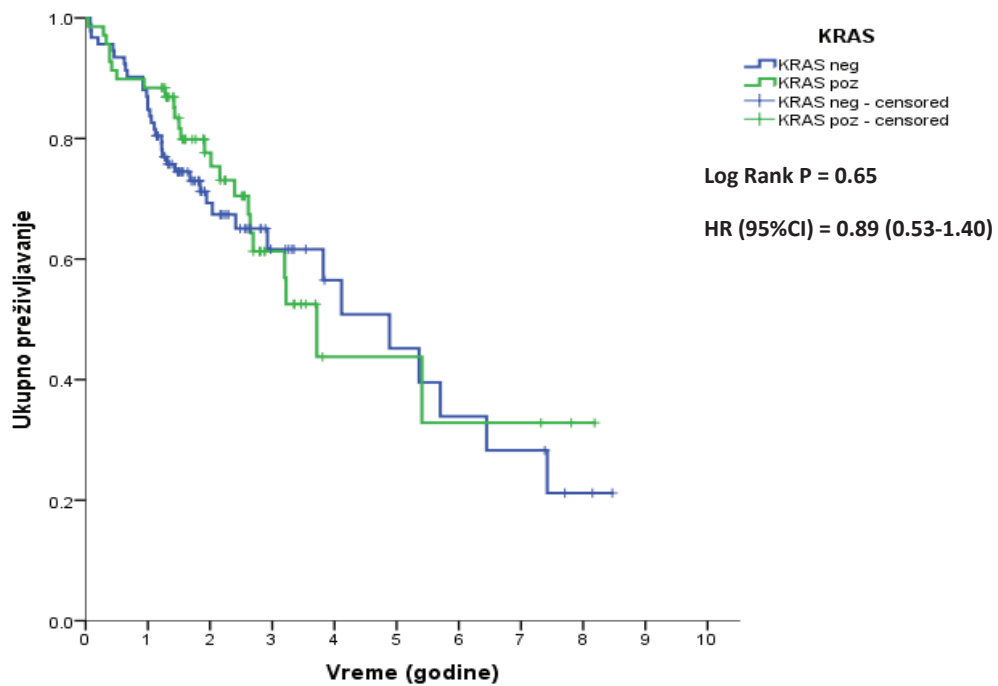
Grafikon 15. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na PD1 status



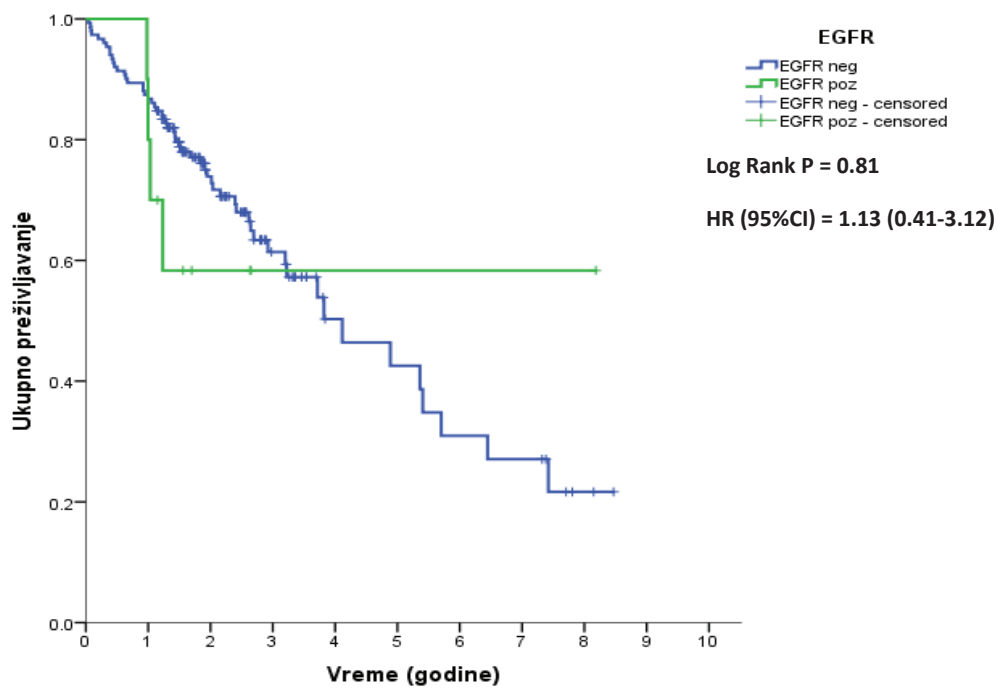
Grafikon 16. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na PD-L1 status



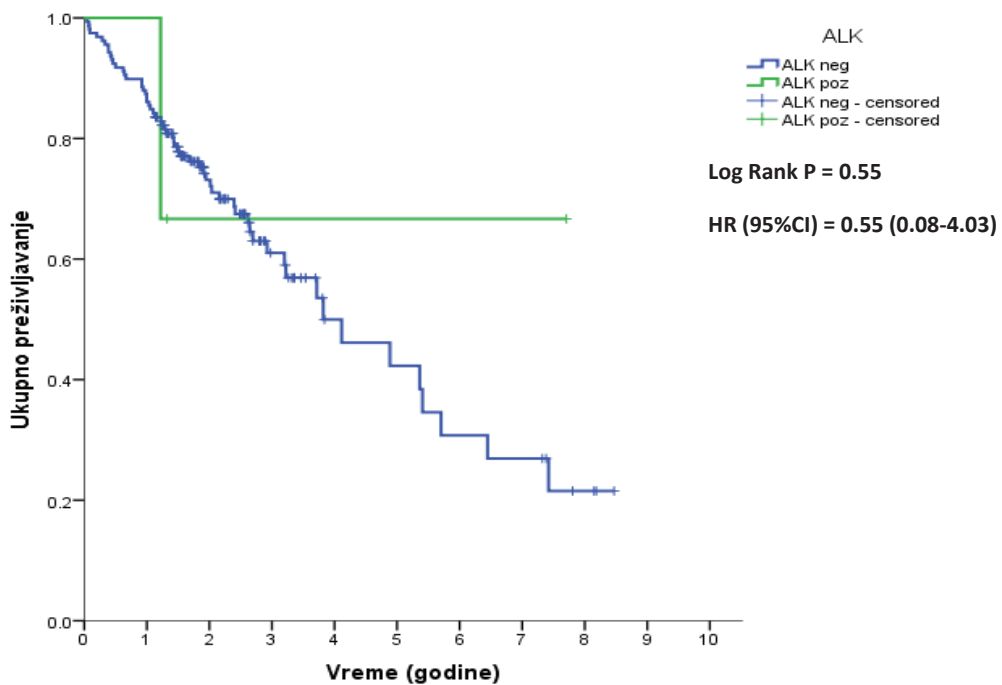
Grafikon 17. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na KRAS status



Grafikon 18. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na EGFR status

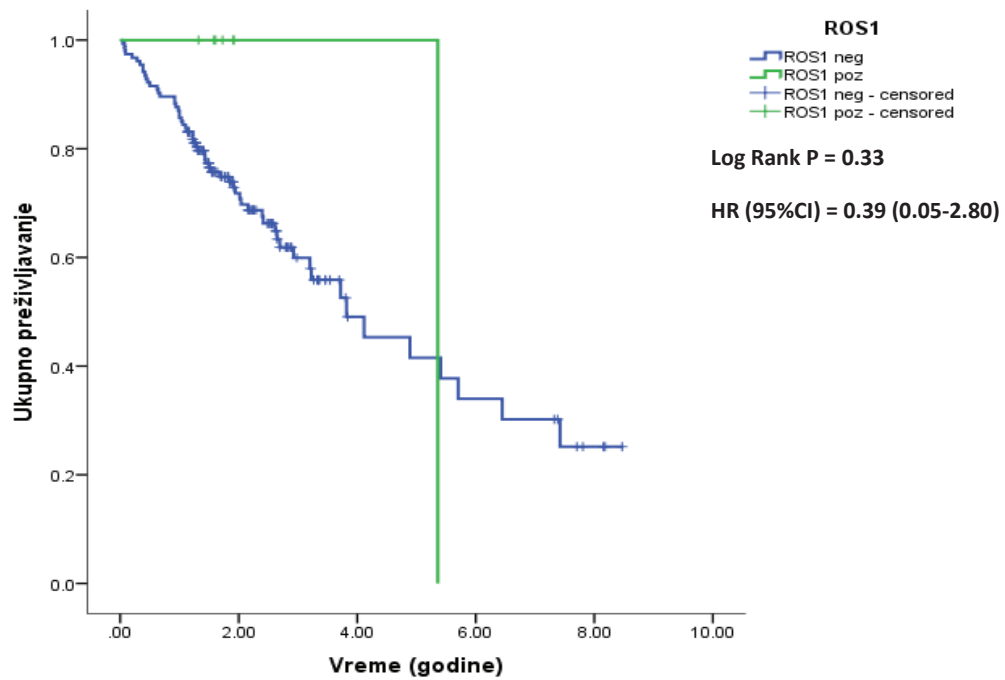


Grafikon 19. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na ALK status

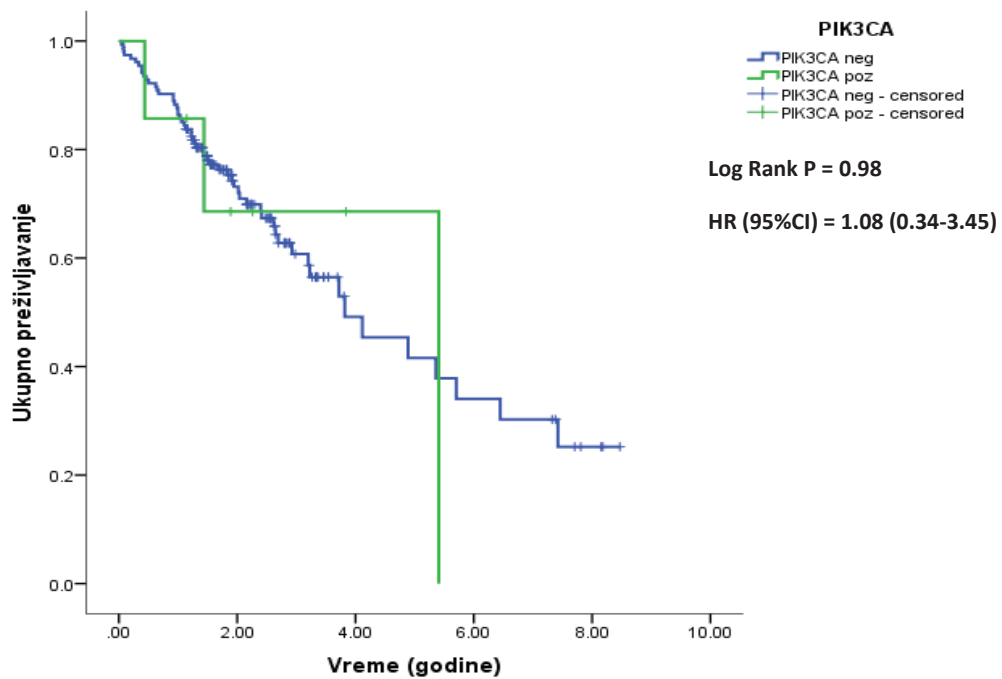




Grafikon 20. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na ROS1 status



Grafikon 21. Ukupno preživljavanje bolesnika u odnosu na PIK3CA status



## 5. DISKUSIJA

Napredak na polju molekularne biologije u potpunosti je promenio pristup dijagnostici i lečenju bolesnika koji boluju od karcinoma bronha. Razumevanje molekularnih dešavanja i ispitivanje genskih alteracija koje se događaju u tumorskim ćelijama karcinoma bronha dovele su do toga da danas imamo, kada je reč o uznapreovalom odnosno metastaskom stadijumu bolesti, koji nije podoban za hirurško lečenje, niz novih terapijskih opcija koje deluju ciljano na mutirane tumorske ćelije. Iste te promene u tumorskim ćelijama omogućuju nam takođe i bolje određivanje prognoze samih bolesnika kao i bolju predikciju odgovora na određenu terapiju. Što se tiče bolesnika sa karcinomom bronha u ranom stadijumu bolesti, hirurško lečenje i dalje ostaje prva i najbolja terapijska opcija. Međutim, s obzirom na relativno veliki procenat ponovnog vraćanja bolesti, sve su intenzivnija ispitivanja usmerena na potencijalni uticaj molekularnih dešavanja i genskih alteracija u tumorskim ćelijama karcinoma bronha u ranom stadijumu bolesti.

Većina do sada objavljenih studija, iz zemalja regiona Jugoistočne Evrope, koje su određivale frekvencije genskih alteracija u ćelijama tumora bolesnika sa karcinomom bronha i njihov prognostički značaj su svoju evaluaciju bazirale na svega nekoliko, najčešćih genskih alteracija i te genske alteracije su uglavnom ispitivane u tumorskim ćelijama bolesnika sa uznapreovalim, metastatskim stadijumom karcinoma bronha. Ova studija je prva u Republici Srbiji i regionu Balkana u kojoj je određena frekvencija i prognostički značaj najčešćih genskih alteracija u uzorcima tumora bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.

U Evropi i svetu aktuelna istraživanja iz domena karcinoma bronha su u velikoj meri usmerena na ispitivanja u oblasti genskih alteracija i značaja njihovog prisustva u ćelijama tumora bolesnika koji boluju od karcinoma bronha. U studiji Yeunga i saradnika (157), analiziran je mutacioni profil gena u osnovi RTK/RAS/PI3K u uzorcima tumora kineskih bolesnika koji su bolovali od adenokarcinoma bronha. Analizirane su mutacije u domenu gena za EGFR, KRAS, HER2, BRAF, PIK3CA, NRAS, MAP2K1, RIT1, MET, ALK i ROS1. Naša paleta mutacija je bila nešto manja i obuhvatila je KRAS, EGFR, ALK, ROS1 i PIK3CA, stim da je u našoj studiji određivan i nivo ekspresije PD-1 i njegovog liganda PD-L1. Metodologija određivanja mutacija u studiji kineskih autora razlikovala se u odnosu našu studiju u smislu korišćenja direktnog sekvencioniranja za detekciju mutacija u domenu gena za EGFR, KRAS, HER2, BRAF, PIK3CA, NRAS, MAP2K1,

RIT1 dok je u našoj studiji korišćena metoda pirosekvencioniranja. ALK i ROS1 mutacije određivane samo pomoću fluorescentne in situ hibridizacije, a u našoj studiji prisustvo mutacija u domenu ALK i ROS1 gena su prvo određivane imunohistohemijski, a potom su pozitivni nalazi potvrđeni fluorescentnom in situ hibridizacijom. Kliničko-patološke karakteristike bolesnika koji su bili uključeni u studiji kineskih autora su bile dosta slične karakteristikama naše ispitivane populacije s tim razlikom da je u grupi kineskih ispitanika, od njih 154, pet imalo dijagnozu adenoskvamoznog karcinoma, što je u našoj studiji bio isključni kriterijum za učešće, dok je ostalih 149 imalo dijagnozu adenokarcinoma bronha. U studiji kineskih autora postojala je statistički značajna razlika ( $P < 0.001$ ) u pogledu pušačkog statusa između pripadnika muškog i ženskog pola, dok kod nas ta razlika nije bila prisutna, iako je sama podjela ispitanika u pogledu pušačkog statusa bila drugačije definisana. U studiji kineskih autora ispitanici koji su u svom životu popušili manje od 100 cigareta bili su okarakterisani kao nepušači, dok su svi ostali koji su u životu popušili više od 100 cigareta bili okarakterisani kao pušači. U našoj studiji, kao nepušači su okarakterisani, slično kineskoj studiji, oni ispitanici koji su u svom životu popušili manje od 100 cigareta, međutim, ispitanike koji su popušili više od toga mi smo podelili na aktuelne, trenutne pušače koji su davali podatak prilikom prijema u bolnicu da su konzumirali duvan unutar 6 meseci pre prijema u bolnicu, dok su kao bivši pušači bili okarakterisani oni ispitanici koji su u svom životu popušili više od 100 cigareta, ali su prestali sa pušenjem najkasnije 6 meseci pre prijema u bolnicu. Količina popušanih cigareta je u našoj studiji bila izražena preko indeksa paklo-godina (pack-year index) dok to nije bio slučaj u studiji kineskih autora. Takođe, ispitanici u studiji kineskih autora su najvećim delom dijagnostikovani u I stadijumu bolesti (46.3%) prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije koja je korišćena i u našoj studiji. Kod nas, većina bolesnika je bila dijagnostikovana u II stadijumu bolesti (42.2%). U grupi kineskih ispitanika, njih 11.4% su imali IV stadijum bolesti, dok su u našoj studiji, IIIB i IV stadijum bolesti bili isključujući kriterijum za učešće u studiji. Od 149 kineskih bolesnika sa dijagnozom adenokarcinoma bronha njih 102 (68.5%) je imalo prisustvo jedne od ispitivanih genskih alteracija u tumorskim ćelijama, 2 (1.3%) ispitanika su imali duplu mutaciju dok kod ostalih 45 (30.2%) ispitanika, nije detektovano prisustvo ispitivanih genskih alteracija u tumorskim ćelijama. Približno rezultatima kineske studije, u našoj ispitivanoj populaciji od 161 ispitanika njih 96 (59.6%) je imalo detektovano prisustvo neke od ispitivanih genskih alteracija u tumorskim ćelijama, a u našoj populaciji nije detektovano prisustvo duple mutacije. Međutim, najveća razlika primećena je u frekvenciji određivanih genskih alteracija. Iako

su i u našoj studiji i u studiji kineskih autora najfrekventnije genske alteracije bile mutacije u domenu KRAS i EGFR gena i u obe studije su one bile međusobno isključive, u studiji kineskih autora frekvenca EGFR mutacije je bila 43% (64 od 149) i to je bila ujedno i najfrekventnija genska alteracija u ispitivanoj populaciji. Na drugom mestu je bila KRAS mutacija sa frekvencijom od 11.4% (17 od 149). Prisustvo EGFR mutacije je bilo značajnije prisutno kod nepušača (59% naspram 25%,  $P < 0.001$ ) i kod bolesnika koji nisu imali metastaze u medijastinalnim limfnim čvorovima ( $P = 0.034$ ). Takođe, postojao je trend češćeg prisustva EGFR mutacije kod ispitanika ženskog pola u odnosu na muški pol iako ta razlika nije bila statistički značajna ( $P = 0.082$ ). U našem uzorku najfrekventnija genska alteracija je bila KRAS mutacija i njena frekvencija iznosila je 42.9% (69 od 161) dok je frekvencija EGFR mutacija bila 6.2% (10 od 161). U našoj populaciji prisustvo EGFR mutacije je bilo statistički značajno povezano sa pušenjem ( $P < 0.001$ ) i sa godinama starosti ( $P = 0.013$ ). Iako je u našoj studiji detektovan relativno mali broj mutacija, svega 10 bolesnika je u svojim tumorima imalo prisustvo EGFR mutacije, kao i u studiji kineskih autora i kod nas je primećen trend češće EGFR pozitivnosti kod pripadnika ženskog pola u odnosu na muški pol (70% naspram 30%), međutim ova razlika nije bila statistički značajna ( $P=0.108$ ) Što se tiče razlike u frekvenciji EGFR mutacija dobijene u našoj studiji i frekvencije EGFR mutacija u studiji kineskih autora, odgovor bi mogao da leži u činjenici da je ispitivana populacija kineskih autora u potpunosti sačinjena od pripadnika azijske rase, da je u populaciji bilo zastupljeno skoro 50 % žena koje su u čak 80% slučajeva bile nepušači. Za prethodno pomenute tri kliničke karakteristike je i prethodno dokazano da su češće povezane sa prisustvom mutacija u domenu EGFR gena, tako da je ovaj rezultat kineskih autora donekle i očekivan kao i razlika u odnosu na rezultat u našem istraživanju (85-87). Frekvencija EGFR mutacija u našoj populaciji, sačinjenoj od ispitanika pripadnika kavkaskе rase, je bila niža u poređenju sa frekvencijom koja je zabeležena u studiji Zarića i saradnika, a koja je sprovedena u istoj ustanovi u kojoj je sprovedena i ova studija, u Institutu za plućne bolesti Vojvodine. Frekvencija EGFR mutacija iznosila je 11.7% u uzorcima tumora bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim adenokarcinomom bronha, pripadnika kavkaskе rase takođe, premda je u ovoj studiji korišćena drugačija metodologija detekcija EGFR mutacija (86). U jednoj sličnoj studiji iz okruženja, sprovedenoj u Hrvatskoj, kod 324 bolesnika sa metastatskim stadijumom adenokarcinoma bronha dobijena je frekvencija EGFR mutacija od 15.7% (158). Generalno gledano, frekvencija EGFR mutacija kod bolesnika sa uznapredovalim adenokarcinomom bronha kod pripadnika kavkaskе rase kreće se od 10% do 15% (86,87).

Incidenca mutacija u domenu EGFR gena kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha, koji su hirurški lečeni, nije poznata u meri u kojoj je poznata za uznapredovali, metastatski stadijum bolesti. Jedan od razloga je taj što se u kliničkoj praksi testiranje tumorskog tkiva na prisustvo mutacija u domenu EGFR gena, u većini zemalja, ne izvodi rutinski kod ranog stadijuma bolesti već samo kod uznapredovalog (88). Međutim, u pojedinim delovima sveta, naučnici su testirali i određivali učestalost EGFR mutacija kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha. MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) grupa je 2008 godine objavila rezultate testiranja tumora 296 operisanih bolesnika kod kojih je utvrdila prisustvo EGFR mutacije u 14% slučajeva (89). Ista grupa je 2012 godine objavila rezultate testiranja tumora 1118 bolesnika koji su imali rani stadijum adenokarcinoma bronha i hirurški u lečeni i ovaj put EGFR pozitivnost je dokazana u 20% slučajeva (90). Razlog za mali procenat EGFR pozitivnih tumorskih uzoraka u našoj studiji mogao bi biti i posledica same veličine uzorka, ali i činjenice da se frekvencija EGFR mutacija razlikuje kod ranog i uznapredovalog stadijuma bolesti, mada, za sada nema jasnih, naučno potkrepljenih dokaza koji bi podržali tu teoriju.

Prisustvo mutacija u domenu EGFR gena se u većini kliničkih studija pokazalo kao pozitivan prognostički faktor kod bolesnika sa uznapredovalim, metastatskim adenokarcinomom bronha, bez obzira na vrstu terapije koju su primili (93-96). Potvrdu ovoj teoriji daje i studija Yeunga i saradnika (157), u kojoj su uznapredovali, metastatski stadijum bolesti, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, prisustvo EGFR mutacije i prisustvo MET mutacije označeni kao prognostički faktori za ukupno preživljavanje. Multivarijantnom analizom u studiji kineskih autora prisustvo mutacije u domenu EGFR gena je bilo povezano sa boljim ukupnim preživljavanjem, dok je prisustvo MET mutacije bilo povezano sa lošijim preživljavanjem. Međutim, mutacije u domenu EGFR i MET gena nisu bile povezane sa preživljavanjem bez povratka bolesti. Prva meta-analiza koja je sprovedena u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja prisustva mutacija u domenu EGFR gena kod bolesnika kod kojih je hirurškim putem odstranjen nesitnoćelijski karcinom bronha u ranom stadijumu (I do III) je studija Zhang-a i saradnika (92). Od 11 studija koje su bile uključene u analizu preživljavanja bez povratka bolesti jedna je bila isključena jer je doprinosila značajnoj heterogenosti, a razlog je bio taj što su u toj studiji učestvovali samo bolesnici sa IIIA stadijumom bolesti. Analizom ostalih deset studija nije se pokazalo da prisustvo EGFR mutacije predstavlja prognostički faktor za preživljavanje bez povratka bolesti kod bolesnika sa ranim stadijumom

karcinoma bronha (HR (Hazard ratio) za preživljavanje bez povratka bolesti 0.96, 95% CI (Confidence interval) 0.79-1.16;  $P = 0.65$ ). Prisustvo EGFR mutacije se nije pokazalo kao prognostički faktor ni za ukupno preživljavanje (HR=0.86, 95% CI 0.72-1.04;  $P=0.12$ ). Međutim, veliki broj faktora može uticati na rezultate ove studije, a na prvom mestu su karakteristike ispitanika koji su bili obuhvaćeni ovom meta-analizom kao što su pol, starost, pušački status, patohistološki podtip tumora itd. Na drugom mestu je tehnika korišćena za detekciju prisustva mutacija u domenu EGFR gena jer je poznato da postoji više metoda detekcije EGFR mutacija i da za svaka od njih ima i svoje prednosti i svoje mane, te stoga rezultate ove meta-analize treba komentarisati sa jednom dozom opreza. U našem istraživanju prisustvo EGFR mutacije nije bilo značajno povezano sa preživljavanjem bez povratka bolesti i sa ukupnim preživljavanjem stim da je naša studija bila usredsređena samo na rani stadijum adenokarcinoma bronha. Glavni i najznačajniji ograničavajući faktor u našem istraživanju bio je mali broj bolesnika sa detektovanim mutacijama u domenu EGFR gena.

Prisustvo KRAS mutacije je u našoj studiji bilo statistički značajno povezano sa godinama starosti ( $P = 0.004$ ), polom ( $P = 0.006$ ) i pušačkim statusom ( $P = 0.004$ ). U studiji kineskih autora (157), slično našoj studiji, prisustvo KRAS mutacije je bilo statistički značajno češće kod pušača nego kod nepušača ( $P = 0.016$ ) i kod ispitanika muškog pola ( $P = 0.003$ ). Što se tiče razlike u frekvencijama KRAS mutacije u našoj studiji i studiji Yeunga i saradnika može se reći da je frekvencija KRAS mutacija u našem uzorku od 42.9% i frekvencija KRAS mutacija u studiji kineskih autora od 11.4% očekivana, uzimajući u obzir činjenicu da kliničko-patološke karakteristike naše populacije više odgovaraju kliničko-patološkim karakteristikama koje se u literaturi češće povezuju sa KRAS pozitivnošću. To se pre svega odnosi na prisustvo adenokarcinoma, visok nivo zastupljenosti pušenja u populaciji, stariju životnu dob i pripadnost kavkaskoj rasi (107), što su sve karakteristike koje su značajno izražene u našem ispitivanom uzorku. U najvećoj meta-analizi, objavljenoj 2016. godine od strane kineskih naučnika, obuhvaćena je 41 klinička studija u kojima je ispitivan prognostički i prediktivni značaj prisustva KRAS mutacije (116). Sve studije su objavljene u periodu od 2005 do 2015 godine. Trideset studija je sprovedeno u Evropi i Severoj Americi, deset studija je sprovedeno u Aziji i jedna u Južnoj Americi. Sve studije osim jedne su kao histološki tip ispitivale adenokarcinom bronha. U trinaest studija kao metoda detekcije prisustva KRAS mutacije korišćena je polimeraza lančana

reakcija (PCR), dok je u ostalim studijama za detekciju korišćeno direktno sekvencioniranje. Niti jedna studija nije koristila pirosekvencioniranje kao metodu detekcije KRAS mutacije što je bio slučaj u našem istraživanju. Većina studija je prisustvo KRAS mutacije tražilo u uzorcima tumora, a u četiri studije korišćena je DNK izolovana iz krvne plazme. U ovoj meta-analizi od ukupno 13103 uzorka pogodna za testiranje, kod 2374 je detektovano prisustvo KRAS mutacije (18%). Prisustvo KRAS mutacije je u meta-analizi statistički značajno bilo povezano sa histološkim tipom adenokarcinoma i sa pušačkim statusom, bez obzira na to da li su pušači bili aktivni ili bivši ( $P=0.017$ ), ali ne i sa muškim polom ( $P=0.142$ ). U našem istraživanju mutacioni status u domenu KRAS gena je bio statistički značajno povezan sa godinama starosti ( $P = 0.004$ ), polom ( $P = 0.006$ ) i pušačkim statusom ( $P = 0.004$ ). U odnosu na rasnu pripadnost, frekvencija KRAS mutacije za pripadnike azijske rase kretala se od 4.4% do 25.5%, dok je kod pripadnika kavkaskе rase frekvencija KRAS mutacije bila u rasponu od 6.7% do 47.5%. U ovoj meta-analizi ukupno devet studija je, kao i naša studija, posmatralo bolesnike sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha i u dve od tih devet studija koje su sprovedene na bolesnicima kavkaskе rase, frekvencija KRAS bila je 40.7% (158) i 47.5% (113), slično rezultatu naše studije. Što se tiče zemalja u našem okruženju, u populaciji Hrvatskih bolesnika koji boluju od adenokarcinoma bronha frekvencija KRAS mutacija bila je 34.9% (158), dok je u populaciji bolesnika u Mađarskoj, frekvencija KRAS mutacija iznosila 28.6% (160). Međutim, rezultati dobijeni i u studiji Hrvatskih i Mađarskih autora su se odnosili isključivo na uznapredovali, metastatski stadijum bolesti, dok za rani stadijum bolesti nema podataka iz regiona. Takođe, razlika u odnosu na naše ispitivanje je bila i u metodologiji detekcije prisustva KRAS mutacije.

Uloga KRAS mutacija kao prognostičkog faktora kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha i dalje nije u potpunosti razjašnjena. I dok veliki broj sprovedenih studija sugerise potencijalno negativan prognostički značaj ove mutacije, postoje i one studije koje nisu potvrdile negativan uticaj KRAS mutacija na preživljavanje. Međutim, u većini studija postojala je značajna heterogenost koja se najviše manifestovala u pogledu histološkog podtipa tumora, stadijuma bolesti i primenjenog tretmana. Shepherd i saradnici su sproveli najveću studiju koja je ipitivala prognostički značaj KRAS mutacija kod bolesnika kod kojih je hirurški odstranjen nesitnoćelijski karcinom bronha u ranom stadijumu, a koji su bili uključeni u četiri velike studije o adjuvantnoj hemioterapiji (112). Preko 1500 uzoraka tumora je testirano na prisustvo KRAS mutacija i kod

njih 300 je detektovana KRAS pozitivnost. Iako je studija sprovedena na relativno homogenoj populaciji hirurški lečenih bolesnika sa ranim stadijumom nesitnoćelijskog karcinoma bronha, prisustvo KRAS mutacije se nije pokazalo kao prognostički faktor za ukupno preživljavanje kako u univarijantnoj tako i u multivarijantnoj analizi (HR mutirani naspram divlji tip gena, 1.17; 95% CI, 0.96-1.42; P = 0.12). Analizom u podgrupi bolesnika sa adenokarcinomom bronha takođe nije evidentiran prognostički značaj prisustva KRAS mutacija (HR=1.00; 95% CI, 0.78-1.29; P = 0.97). Slični rezultati dobijeni su i u pogledu preživljavanja bez povratka bolesti za sve bolesnike obuhvaćene analizom (HR = 1.15; 95% CI, 0.96-1.39; P = 0.14), a takodje i u grupi bolesnika sa adenokarcinomom bronha (HR = 0.98; 95% CI, 0.78-1.24; P =0.87). Pan i saradnici su u svojoj meta-analizi identifikovali devet studija koje su ispitivale preživljavanje bez povratka bolesti kod bolesnika sa ranim stadijumom nesitnoćelijskog karcinoma bronha, stadijum I do IIIA, kod kojih je u tumorskim ćelijama detektovano prisustvo KRAS mutacije naspram bolesnika koji su imali divlji tip KRAS gena. Kao i u našem istraživanju, svi bolesnici su imali R0 resekciju, a najčešći tip hirurške intervencije je bio lobektomija. KRAS pozitivni bolesnici su imali statistički značajno veći rizik za povratak bolesti (HR=1.57; 95% CI, 1.17-2.09, P=0.002). Analiza podgrupa u odnosu na rasnu pripadnost je pokazala da je prisustvo KRAS mutacije izraženije negativan prognostički faktor kod pripadnika azijske rase (HR=2.59, 95% CI 1.55-4.30 P=0.000), nego kod pripadnika kavkaske rase (HR=1.31, 95% CI 0.99-1.73, P=0.057). Rezultati dobijeni u našem istraživanju su u skladu sa rezultatima većine studija koje su se bavile ovom problematikom. U multivarijantnoj analizi prisustvo KRAS mutacije se nije pokazalo kao prognostički znak za bolesnike sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha, ni za preživljavanje bez povratka bolesti ni za ukupno preživljavanje.

Naša studija je druga u Republici Srbiji koja je određivala frekvenciju ALK mutacija kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. Prva studija je bila studija Zarića i saradnika, sprovedena je u Institutu za plućne bolesti Vojvodine, a objavljena je 2016. godine (120). U ovoj studiji, u kojoj se ALK pozitivnost, kao i u našoj studiji, inicijalno određivala imunohistohemijski, a zatim se rezultat potvrđivao fluorescentnom in situ hibridizacijom dobijena je frekvencija ALK mutacije od 6.2% (12 od 195). Nakon toga, 12 pozitivnih nalaza podvrgnuto je FISH analizi i 10 nalaza je potvrđeno kao pozitivno, dok su dva nalaza bila negativna. Dakle, frekvencija ALK mutacije određena fluorescentnom in situ hibridizacijom bila je 5.1% (10 od 195). Prisustvo ALK



mutacije je statistički značajno bilo povezano sa acinarnim podtipom adenokarcinoma bronha ( $P=0.02$ ) dok je povezanost sa pušačkim statusom bilo na granici značajnosti ( $P=0.057$ ). Nije primećena statistički značajna povezanost sa drugim kliničko-patološkim karakteristikama. U našoj studiji, frekvencija ALK mutacije je bila 1.9% (3 od 161), a sva tri pozitivna nalaza su potvrđena i FISH analizom. S obzirom na veoma mali broj ALK pozitivnih bolesnika, nije bilo mogućnosti za neki statistički logičan zaključak. U studiji Zarića i saradnika, korišćeno antitelo za detekciju ALK mutacije je bilo različitog proizvođača u odnosu na antitelo korišćeno u našoj studiji, te bi i u toj činjenici, osim manjeg broja ispitanika, moglo da leži objašnjenje u pogledu razlike u frekvenciji između dve populacije ispitanika koji su prema drugim kliničko-patološkim karakteristikama bile veoma slične. U Hrvatskoj, Brcić i saradnici, frekvenciju ALK mutacija su određivali kod bolesnika sa adenokarcinomom bronha u uznapredovalom, metastaskom stadijumu bolesti. Određena imunohistohemijski, frekvencija je iznosila 4.1%. Prisustvo ALK mutacije je statistički značajno bilo povezano sa polom ( $P<0.0001$ ) i pušačkim statusom ( $P=0.0007$ ) (158). U jednoj od najvećih Evropskih studija sprovedenih kod bolesnika u ranom stadijumu adenokarcinoma bronha, frekvencija EML4-ALK fuzije, određena imunohistohemijski, iznosila je 6.2%, međutim, fluorescentno in situ hibridizacijom potvrđena je frekvencija od svega 2.2%. Za razliku od EGFR i KRAS mutacija, prisustvo ALK rearanžmana nije rasno zavisno. U studiji kineskih autora (157), frekvencija ALK rearanžmana iznosila je 6% (9 od 149), stin da je detekcija prisustva ALK rearanžmana u ovoj studiji određivana samo fluorescentnom in situ hibridizacijom. Prisustvo ALK rearanžmana je bilo značajno povezano sa mlađom životnom dobi ( $P=0.01$ ) i manjom veličinom tumora ( $P=0.001$ ). U jednoj velikoj retrospektivnoj studiji, sprovedenoj u Južnoj Koreji, Lee i saradnici su ispitivali povezanost kliničko-patoloških karakteristika sa prisustvom EGFR i KRAS mutacija i ALK rearanžmana kod 6595 bolesnika koji su bolovali od karcinoma bronha (123). U ovoj studiji uključeni su bili svi histološki tipovi karcinoma bronha, a takođe i svi stadijumi bolesti. Prisustvo ALK rearanžmana je određivano imunohistohemijski ili fluorescentnom in situ hibridizacijom. ALK rearanžman je statistički značajno bio češće prisutan kod određenih kliničko-patoloških karakteristika, a to su bili: mlađi bolesnici ( $P<0.001$ ), nepušači ( $P=0.005$ ), bolesnici koji su imali histološki tip adenokarcinoma ( $P<0.001$ ), loše diferentnovani tumori ( $P<0.001$ ), kribriformni tip adenokarcinoma ( $P<0.001$ ), solidni tip adenokarcinoma ( $P=0.002$ ), N status ( $P<0.001$ ), tumori koji infiltrišu krvne sudove ( $P<0.001$ ), limfne sudove ( $P=0.004$ ) i nerve ( $P=0.019$ ). Generalno gledano, najčešće kliničko-patološke karakteristike koje

se povezuju sa prisustvom ALK rearanžmana su histološki tip adenokarcinoma, mlađa životna dob i negativan pušački status (81,121,123). Tokom 2014. godine grupa kineskih autora objavila je meta-analizu studija koje su ispitivale odnos kliničko-patoloških karakteristika bolesnika sa karcinomom bronha i prisustva EML4-ALK fuzije (161). Ovom meta-analizom, nakon primene uključujućih i isključujućih kriterijuma, obuhvaćeno je ukupno 17 studija u kojima je zbirno bilo 4511 bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha. U ukupno 15 studija određivana je frekvencija ALK rearanžmana u odnosu na histološki tip tumora. Što se tiče histološkog tipa adenokarcinoma bronha, koji je i predmet interesovanja naše studije, ukupna frekvencija iznosila je 6.85% (158 od 2308). U ovoj meta-analizi, prisustvo ALK rearanžmana je bilo značajnije povezano sa određenim kliničko-patološkim karakteristikama osim adenokarcinoma, a pre svega sa negativnim pušačkim statusom ( $P < 0.00001$ ) i ženskim polom ( $P=0.01$ ). Međutim, povezanost ALK rearanžmana i ovih kliničko-patoloških karakteristika je posmatrana kod svih ispitanika koji su obuhvaćeni ovom meta-analizom, a ne samo kod ispitanika koji su bolovali od adenokarcinoma bronha kao što je bio slučaj u našem istraživanju.

Kada je u pitanju uloga kinaze anaplastičnog limfoma kao prognostičkog faktora kod bolesnika sa karcinomom bronha u literaturi postoje oprečna mišljenja. Neki istraživači navode da prisustvo ALK rearanžmana predstavlja pozitivan prognostički faktor, dok drugi sugerišu suprotno. Vrlo je mali broj studija koje su ispitivale prognostički značaj ALK rearanžmana kod ranog stadijuma adenokarcinoma bronha. U studiji Paik-a i saradnika (129), od 735 bolesnika sa ranim stadijumom nesitnoćelijskog karcinoma bronha kod njih 28 (3.8%) detektovano je prisustvo ALK rearanžmana koje je, u skladu sa podacima iz literature, bilo statistički značajno češće kod bolesnika ženskog pola ( $P < 0.001$ ), adenokarcinoma ( $P < 0.001$ ) i nepušača ( $P < 0.001$ ). U pogledu preživljavanja bez povratka bolesti i ukupnog preživljavanja, nije bilo statistički značajne razlike između ALK pozitivnih i ALK negativnih bolesnika. Srednje vreme ukupnog preživljavanja ALK pozitivnih bolesnika je bilo 97.7 meseci dok je kod ALK negativnih bolesnika ono iznosilo 78.9 meseci ( $P=0.10$ ). Srednje vreme preživljavanja bez povratka bolesti ALK pozitivnih bolesnika bilo je 78.9 meseci dok je srednje preživljavanje bez povratka bolesti kod ALK negativnih bolesnika bilo 71.3 meseci ( $P=0.66$ ). Uzimajući u obzir prethodno navedene rezultate ALK rearanžman se nije pokazao kao prognostički faktor kod bolesnika sa ranim stadijumom nesitnoćelijskog karcinoma bronha. Prisustvo ALK rearanžmana je bilo uzajamno isključivo u odnosu na EGFR i KRAS

mutacije. U analizi podgrupa ispitivan je prognostički značaj prisustva ALK rearanžmana kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma kod kojih je sprovedeno hirurško lečenje. ALK pozitivnost nije bila povezana sa dužim ukupnim preživljavanjem. U multivarijantnoj analizi prisustvo ALK rearanžmana u tumorima bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha nije bilo povezano sa preživljavanjem bez povratka bolesti i sa ukupnim preživljavanjem što je sve išlo u prilog tome da prisustvo ALK rearanžmana nema prognostički značaj kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. Studija Fukui-a i saradnika (162), takođe sprovedena na pripadnicima azijske rase, imala je slične rezultate kao i studija Paik-a i saradnika. Od 720 bolesnika sa adenokarcinomom bronha, ALK rearanžman detektovan je kod njih 28 (3.9%), a između grupe ALK pozitivnih i ALK negativnih bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju bez povratka bolesti i ukupnom preživljavanju. Za sada najveća studija koja je ispitivala prisustvo ALK rearanžmana kod bolesnika kavkaske rase, predominantno evropljana, sa adenokarcinomom bronha u ranom stadijumu bolesti (I-III), je bila studija Blackhall i saradnika (131). Ova studija je ujedno i najveća studija u kojoj je objavljen klinički ishod bolesnika kavkaske rase sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha u čijim tumorima je detektovano prisustvo ALK rearanžmana. Od ukupno 1281 analiziranog tumorskog uzorka, 80 je bilo ALK pozitivno određeno imunohistohemijski (6.2%), dok je od tih 80 pozitivnih uzoraka 28 potvrđeno pozitivno fluorescentnom in situ hibridizacijom (2.2%). Ukupno preživljavanje i preživljavanje bez povratka bolesti se značajno razlikovalo u odnosu na ALK status određen imunohistohemijski tako što je rizik od smrtnog ishoda i rizik od povratka bolesti bio znatno niži u grupi ALK IHC pozitivnih bolesnika u odnosu na ALK IHC negativne bolesnike. Kada je analiza sprovedena samo na bolesnicima koji su bili ALK pozitivni i imunohistohemijski i fluorescentnom in situ hibridizacijom statistički značajna razlika bila je samo u pogledu ukupnog preživljavanja ( $P=0.22$ ). Takođe, kao i u studiji Paik-a i saradnika, prisustvo ALK rearanžmana je bilo uzajamno isključivo sa drugim genskim alteracijama ispitivanim u studiji. U našoj studiji dvoje od troje ALK pozitivnih bolesnika bili živi i bez povratka bolesti u vreme sprovođenja statističke analize, pa samim tim nije bilo dovoljno podataka za procenu značaja prisustva ALK rearanžmana u pogledu preživljavanja bez povratka bolesti i ukupnog preživljavanja što je ujedno i jedna od glavnih limitacija našeg istraživanja.

ROS1 rearanžman spada u grupu "novije" otkrivenih genskih alteracija kod bolesnika sa karcinomom bronha. Učestalost ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa karcinomom bronha kreće se od 0.7% do 1.7%, međutim, kod usko selektovane populacije frekvencija ROS1 rearanžmana je veća nego u neselektovanoj populaciji (134-136). U našoj studiji frekvencija ROS1 rearanžmana određivana je imunohistohemijski i iznosila je 4.3% (7 od 161), a od tih 7 pozitivnih uzoraka fluorescentnom in situ hibridizacijom potvrđen je samo jedan pozitivan nalaz 0.9% (1 od 161). Prisustvo ROS1 rearanžmana u našem istraživanju nije bio statistički značajno povezano niti sa jednom kliničko-patološkom karakteristikom koju smo ispitali. U studiji Yeunga i saradnika (157), frekvencija ROS1 rearanžmana bila je 2% (3 od 149) i za razliku od naše studije dijagnostička metoda je bila samo fluorescentna in situ hibridizacija. U ovoj studiji nije ispitivana korelacija prisustva ROS1 rearanžmana sa kliničko-patološkim karakteristikama. U jednoj drugoj studiji takođe kineskih autora, Wu i saradnici su ispitali odnos kliničko-patoloških karakteristika i ishod bolesnika sa adenokarcinomom bronha kod kojih je detektovano prisustvo ROS1 rearanžmana (163). Od 127 tumorskih uzoraka, podobnih za testiranje, u kojima je prethodno dokazano odsustvo EGFR i KRAS mutacija i ALK rearanžmana, ROS1 rearanžman je detektovan kod 5 uzoraka (3.9%). Metoda detekcije je bila fluorescentna in situ hibridizacija. Ispitivana populacija u studiji kineskih autora je bila slična našoj populaciji u pogledu sastava po polu i prema starosnom profilu ispitanika, međutim za razliku od naših ispitanika u grupi kineskih ispitanika je bilo značajno više nepušača, a uz to polovina kineskih ispitanika je imala bolest u uznapredovalom, metastatskom stadijumu bolesti. Prosečna starost bolesnika kod kojih je detkovano prisustvo ROS1 rearanžmana bila je 53 godine (raspon: 41-62), i bila je manja u odnosu na prosečnu starost bolesnika sa ROS1 negativnim tumorima koja je iznosila 62 godine (raspon: 26-82), međutim ta razlika nije bila statistički značajna. U našem istraživanju takođe, ROS1 pozitivnost nije bila značajno povezana sa godinama starosti ispitanika ( $P=0.331$ ), iako su 4 od 7 naših bolesnika pripadali starijoj populaciji preko 64 godina starosti. Glavne razlike ROS1 pozitivnih bolesnika u našoj studiji i studiji kineskih autora bile su u pogledu pola, pušačkog statusa ROS1 pozitivnih bolesnika i stadijuma bolesti. U našoj studiji 6 od 7 ROS1 pozitivnih bolesnika su bili muškarci, međutim, nije bilo statistički značajne povezanosti između prisustva ROS1 rearanžmana i pola bolesnika ( $P=0.104$ ). U studiji kineskih autora svih 5 ROS1 pozitivnih bolesnika je bilo ženskog pola što je bilo statistički značajna razlika u odnosu na muški pol ( $P=0.009$ ) i svih pet ženskih bolesnika su bili nepušači, ali nije bilo statistički značajne razlike između grupe pušača i nepušača

( $P=0.059$ ). Za razliku od rezultata studije kineskih autora, u našoj ispitivanoj grupi 6 od 7 bolesnika su bili pušači (3 aktivna pušača i 3 bivša pušača), ali nije bilo značajne povezanosti u pogledu pušačkog statusa ( $P=0.515$ ). Takođe, u studiji kineskih autora svih pet ROS1 pozitivnih bolesnika je dijagnostikovano i uznapredovalom, metastaskom stadijumu bolesti (IIIB i IV stadijum), dok kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha nije detektovan ROS1 rearanžman. Nije dokazana statistički značajna povezanost između stadijuma bolesti i prisustva ROS1 rearanžmana u grupi kineskih ispitanika. Sa druge strane, u našem istraživanju, IIIB i IV stadijum bolesti je bio isključujući kriterijum za učešće u sistraživanju, tako da su svih sedam ROS1 pozitivnih bolesnika imali rani stadijum bolesti (I - IIIA), ali kao i u studiji kineskih autora ni u našem istraživanju nije bilo značajne povezanosti stadijuma bolesti i ROS1 rearanžmana. Gledano kroz prizmu stadijuma bolesti, u studiji koju su sprovedeli Wu i saradnici, frekvencija ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha je bila 0% za razliku od naše studije gde je frekvencija ROS1 rearanžmana bila 4.3% imunohistohemijski, a 0.9% fluorescentnom in situ hibridizacijom. Međutim, pet ROS1 pozitivnih bolesnika u studiji kineskih autora koji su imali uznapredovali, metastatski stadijum bolesti imali su ostale kliničko-patološke karakteristike za koje se u literaturi navode da su češće povezane sa prisustvom ROS1 rearanžmana, a to su: nepušači, ženski pol, mlađa životna dob, adenokarcinom (137,139). U prvoj, i za sada jednoj, meta-analizi Zhu-a i saradnika (137), koja je ispitala povezanost kliničko-patoloških karakteristika i prisustva ROS1 rearanžmana kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha obuhvaćeno je bilo 18 studija sa ukupno 9898 bolesnika. Od osamnaest studija obuhvaćenih ovom meta-analizom, devet studija se bavilo samo bolesnicima sa adenokarcinomom bronha. Dvanaest studija je bilo sprovedeno kod bolesnika azijske rase, dok je preostalih 6 sprovedeno kod bolesnika kavkaske rase. Najčešći metod detekcije ROS1 rearanžmana bila je fluorescentna in situ hibridizacija koja je bila korišćena u 11 studija, a pored nje korišćena je i imunohistohemija u 3 studije i polimeraza lančana reakcija u 5 studija. Učestalost ROS1 rearanžmana bila je 1.57% (85 od 5409) kod pripadnika muškog pola i 2.42% (108 od 4468) kod pripadnika ženskog pola. Objedinjena analiza je pokazala da je ženski pol značajno povezan sa prisustvom ROS1 rearanžmana ( $P=0.042$ ). Daljom analizom u podgrupama u odnosu na rasnu pripadnost kod azijske populacije nije bilo značajne razlike između prisutnosti ROS1 rearanžmana i pola ispitanika ( $P=0.299$ ), dok je kod pripadnika kavkaske rase ta razlika bila statistički značajna u korist ženskog pola ( $P=0.016$ ). ROS1 rearanžman je bio značajno češći kod

nepušača pripadnika kavkaskе rase ( $P < 0.001$ ), а код pripadnika азијатске rase nije bilo статистички значајне разлике ( $P = 0.10$ ), иако је примећен тренд чеће ROS1 позитивности код непуšača. Devet studija, u kojima је одређена фреквенција ROS1 rearанжмана посебно код аденокарцинома и не-аденокарцинома, је такође било обухваћено овом мета-анализом. Objedinjena фреквенција ROS1 rearанжмана код аденокарцинома била је 2.98%, док је код не-аденокарцинома била 0.22%. Pet studija од devet је спроведено код болесника азијатске rase док су четри studije спроведена код болесника kavkaskе rase. Objedinjena анализа u оба slučaja pokazala učestalije prisustvo ROS1 rearанжмана код болесника са аденокарциномом бронха било да су они азијатске rase ( $P < 0.001$ ) или kavkaskе rase ( $P = 0.001$ ). Od 18 studija укључених u мета-анализу коју су спровели kineski autori, 13 studija је имало јасно изражене стадијуме болести. Objedinjena анализа pokazala је фреквенцију ROS1 rearанжмана код 1.27% болесника који су имали стадијум болести I и II, док је фреквенција код болесника u стадијуму III и IV била 3.56%. U овом slučaju pokazalo се да је већи стадијум болести значајно повезан са већом фреквенцијом ROS1 rearанжмана ( $P < 0.001$ ), а исто то је потврђено и u анализи u односу на расну припадност. U нашој studiji такође је анализирана prisutnost ROS1 rearанжмана u односу на стадијум болести, али само рани стадијум, дакле од IA-IIIА стадијума. Nije примећена значајна повезаност prisustva ROS1 rearанжмана и стадијума болести иако су чак 4 болесника код којих је детектован ROS1 rearанжман били u стадијуму I. Razlika u pogledu фреквенције ROS1 rearанжмана добијене u нашем истраживању и фреквенције добијене u мета-анализи kineskih autora trebala би се, са једне стране, тумачити са опрезом s obzirom на мали број испитаника који је био обухваћен нашом studijom, а и самим izborom методологије за детекцију prisustva ROS1 rearанжмана. Sa друге стране, иако postoje резултати о učestalosti ROS1 rearанжмана код pripadnika kavkaskе rase, većina tih studija спроведена је u Sjedinjenim Američkim Državama, а када је Европа u pitanju, истраживања су углавном спроведена u западним европским земљима. Naša studija је за сада прва из региона југо-истоčne Европе u којој је одређена фреквенција ROS1 rearанжмана код болесника са раним стадијумом аденокарцинома бронха. Jedna од потенцијалних slabosti наше studije, осим малог броја ROS1 позитивних болесника, је и доста велико neslaganje између две дијагностичке методе, IHC и FISH, за детекцију prisustva ROS1 rearанжмана. Trenutno, fluorescentna in situ hibridizacija представља методу izbora за детекцију ROS1 rearанжмана, а поред нје свакako је и секвенционирање следеће генерације. Ove две методе свакako имају и своје ograničenje, а то су на prvom mestu цена и техничка zahtevnost prilikom izvođenja. Polimeraza lančana reakcija и imunohistohemija су u

upotrebi sa svojim prednostima i manama. Polimeraza lančana reakcija je lako izvodljiva, visoko senzitivna i relativno jeftina metoda za dijagnostiku ROS1 rearanžmana. Nedostaci ove metode su na prvom mestu u pogledu ekstrakcije RNK iz parafinskih blokova kao i potreba veće količine tkiva. Imunohistohemija je u poređenju sa prethodno pomenutim metodama jednostavna, jeftina i lako sprovodljiva u gotovo svim laboratorijama za patologiju. Više studija je potvrdilo visoku specifičnost i senzitivnost imunohistohemije u poređenju sa fluorescentnom in situ hibridizacijom. U studiji Sholl-a i saradnika senzitivnost imunohistohemije iznosila je 100% dok je specifičnost bila 92% (164), dok je u studiji Shan-a i saradnika senzitivnost takođe bila 100%, a specifičnost 93.6% iako su u ovoj studiji tri ROS1 pozitivna uzorka bila FISH negativna, ali ROS1 pozitivnost ta tri uzorka je naknadno potvrđena polimeraza lančanom reakcijom (165). Dakle, sa svojom visokom senzitivnošću i specifičnošću imunohistohemija ima značajnu ulogu u detekciji prisustva ROS1 rearanžmana u ćelijama tumora bolesnika koji boluju od karcinoma bronha.

Uloga prisustva ROS1 rearanžmana, kao prognostičkog faktora, kod bolesnika sa karcinomom bronha, do danas nije sasvim poznata. U literaturi, većina studija ili nije pokazala uticaj ROS1 rearanžmana na preživljavanje ili je taj uticaj bio negativan, mada postoje i studije sa suprotnim rezultatima. Jedna od takvih je studija Schefflera i saradnika (142), studija sprovedena na ispitanicima kavkaske populacije, u kojoj je prisustvo ROS1 rearanžmana, iako na relativno malom broju ROS1 pozitivnih bolesnika, bilo povezano sa značajno boljim preživljavanjem. U studiji Cai-a i saradnika (141), od uključenih 392 bolesnika iz Kine, ROS1 rearanžman je detektovan kod njih 8 (2.0%). Iako je u ovoj studiji bio obuhvaćen kompletan nesitnoćeliljski karcinoma bronha, od osam ROS1 pozitivnih bolesnika, 7 je imalo histološki tip adenokarcinoma dok je jedan bolesnik imao adenoskvamozni karcinom. Većina ROS1 pozitivnih bolesnika je imalo rani stadijum bolesti (6 od 8). Ukupno preživljavanje ROS1 negativnih bolesnika je bilo statistički značajno duže nego preživljavanje ROS1 pozitivnih bolesnika ( $P=0.041$ ). Takođe, u univarijantnoj analizi odsustvo ROS1 rearanžmana je bilo povezano sa dužim preživljavanjem ( $P=0.047$ ). Multivarijantnom analizom dokazano je da je ROS1 negativan status nezavistan prognostički faktor za ukupno preživljavanje. Rezultate studije Cai-a i saradnika treba komentarisati sa dozom opreza jer je u studiji detektovan vrlo mali broj ROS1 pozitivnih bolesnika, a pored toga grupa ispitanika je bila veoma heterogena, s obzirom da su bili obuhvaćeni bolesnici u svim stadijumima bolesti (od Ia do IV), i čak 30% bolesnika u ovoj studiji je imalo dijagnozu skvamoznog karcinoma.

U studiji Wu-a i saradnika (166), prognostički značaj ROS1 rearanžmana je ispitivan kod bolesnika azijske rase sa adenokarcinomom bronha čiji su tumori bili negativni na prisustvo genskih alteracija u domenu EGFR, KRAS i ALK gena. U ovoj studiji nije bilo značajne razlike u preživljavanju ROS1 pozitivnih i ROS1 negativnih bolesnika iako je ova analiza sprovedena samo na bolesnicima u uznapredovalom, metastatskom stadijumu bolesti, s obzirom da su svi ROS1 pozitivni bolesnici imali taj stadijum bolesti (IIIB i IV). Razlike u preživljavanju bez povratka bolesti i ukupnog preživljavanja nije bilo ni u grupi ispitanika sa ranim stadijumom karcinoma bronha koji su hirurški lečeni u studiji Chen-a i saradnika (167). U našem istraživanju, u univarijantnoj analizi, ROS1 rearanžman nije bio značajno povezan sa preživljavanjem bez povratka bolesti i sa ukupnim preživljavanjem. Multivarijantna analiza nije detektovala ROS1 rearanžman kao prognostički faktor za preživljavanje bez povratka bolesti i za ukupno preživljavanje kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. Međutim, broj ROS1 bolesnika je bio mali i u našem istraživanju, a takođe je postojala značajna diskrepanca u pogledu imunohistohemijske analize i analize fluorescentnom in situ hibridizacijom, iako je populacija ispitanika u našem istraživanju bila daleko homogenija u odnosu na populaciju ispitanika studije kineskih autora. Prethodno pomenuta niska frekvencija ROS1 pozitivnih bolesnika, kako u našem istraživanju, tako i u istraživanju Cai-a i saradnika, može imati potencijalni efekat na statističku analizu obe studije. Stoga, u cilju utvrđivanja povezanosti ROS1 rearanžmana i prognoze bolesnika sa karcinomom bronha, potrebna su dalja ispitivanja na znatno većem uzorku.

PI3K ima ključnu ulogu u ćelijskom metabolizmu i proliferaciji. I dok za klasične pokretačke mutacije važi da su uzajamno isključive, za mutacije gena PIK3CA važi da su češće prisutne zajedno sa nekom od pokretačkih mutacija poput mutacija u domenu EGFR gena, ALK rearanžmana, a najčešće sa KRAS mutacijama. Takođe, sve prethodno pomenute mutacije povezane su sa određenim kliničko-patološkim karakteristikama, dok za PIK3CA mutacije ne postoje podaci o takvoj povezanosti (168). Naša studija je prva u regionu u kojoj je određivana frekvencija mutacija u domenu gena PIK3CA kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. Od 161 tumorskog uzorka bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha, mutacija gena PIK3CA je detektovana u 7 uzoraka (4.3%). Nešto niža frekvencija dobijena je u studiji nemačkih autora, Scheffler-a i saradnika, gde je na mnogo većem broju ispitanika nego u našoj studiji



PIK3CA mutacija detektovana u 42 od 1144 (3.7%) tumorska uzorka bolesnika sa nestitnoćelijskim karcinomom bronha (169). Samo kod adenokarcinoma bronha frekvencija je iznosila 2.9% (25 od 859) iako u studiji nemačkih autora nije bilo podataka o stadijumu bolesti bolesnika sa adenokarcinomom kod kojih je detektovano prisustvo PIK3CA mutacije. Frekvencija PIK3CA mutacije kod bolesnika sa skvamoznim karcinomom bronha je bila znatno viša i iznosila je 8.9% (16 od 179) i ta razlika je bila statistički značajna ( $P < 0.001$ ). Slična frekvencija PIK3CA mutacije dobijena je i u studiji Chatziandreou i saradnika (170). Ova studija je obuhvatila 956 bolesnika iz Grčke sa dijagnozom nesitnoćelijskog karcinoma bronha, od čega je njih 184 imalo odgovarajući uzorak tumora za analizu PIK3CA mutacije. Frekvencija PIK3CA mutacija bila je 3.8% (7 od 184) kod celokupnog nesitnoćelijskog karcinoma bronha dok kod bolesnika sa adenokarcinomom frekvencija bila 3.5% (5 od 138), iako i u studiji Chatziandreou i saradnika nije bilo podataka vezano za stadijum bolesti za sve ispitanike kod kojih je određivano prisustvo PIK3CA mutacije. Slična frekvencija PIK3CA mutacija kod pripadnika kavkaskе rase zapažena je i kod pripadnika azijske rase. U studiji koju su sproveli Kawano i saradnici dobijena frekvencija PIK3CA mutacija kod japanskih bolesnika sa karcinomom bronha iznosila je 3.4% (171). I u studiji japanskih autora primećeno je da je frekvencija PIK3CA mutacije niža kod adenokarcinoma (1.5%, 2 od 135) u odnosu na skvamozni karcinom bronha (6.5%, 5 od 77) što je bila statistički značajna razlika ( $P = 0.0495$ ). U našoj studiji od 7 detektovanih mutacija u domenu PIK3CA gena, 5 je detektovano u eksonu 9 dok su preostale dve detektovane u eksonu 20, a sličan rezultat je zapažen i u studiji Scheffler-a i saradnika, 33 od 42 mutacije iz domena gena PIK3CA su bile u eksonu 9 (167). U studiji japanskih autora sve detektovane mutacije su bile u eksonu 9 (171). Sa druge strane, u studiji Chatziandreou i saradnika većina mutacija je bilo u eksonu 20 (6 od 7 mutacija) (170). Međutim, jedino u našoj studiji je ispitivano prisustvo PIK3CA mutacija kod adenokarcinoma bronha, dok su ostale studije obuhvatale sve histološke podtipove nesitnoćelijskog karcinoma bronha, a takođe, drugačija je bila i metoda detekcije ovih mutacija. U našoj studiji i studiji Chatziandreou i saradnika za detekciju mutacija u domenu PIK3CA gena korišćeno je pirosekvencioniranje, a u studiji nemačkih i japanskih autora metoda detekcije je bila direktno sekvencioniranje. U našem istraživanju prisustvo PIK3CA mutacije nije bilo značajno povezano niti sa jednim od ispitivanih kliničko-patoloških karakteristika poput, pola, starosti, pušenja, stadijuma bolesti, ECOG statusa, vrste hirurgije i primene adjuvantne hemioterapije, a značajna povezanost PIK3CA mutacija sa kliničko-patološkim karakteristikama nije zabeležena

ni u studiji Chatziandreou i saradnika (169). U studiji nemačkih autora nije ispitivana povezanost prisustva PIK3CA mutacije sa kliničko-patološkim karakteristikama osim sa histološkim tipom tumora i sa pušenjem ali u kontekstu prisustva drugih detektovanih mutacija (FGFR, BRAF, ALK, EGFR, KRAS). U analizi podgrupa, PIK3CA pozitivni bolesnici su statistički značajno bili više izloženi pušenju nego EGFR i ALK pozitivni bolesnici ( $P < 0.001$ ), dok su statistički manje bili izloženi pušenju u odnosu na FGFR i KRAS pozitivne bolesnike ( $P = 0.003$ ). U poređenju PIK3CA pozitivnih bolesnika i bolesnika kod kojih nije detektovano prisustvo neke od pomenutih mutacija nije bilo statistički značajne razlike u pogledu pušačkog statusa. U našoj studiji kao što je pomenuto ranije nije bilo značajne povezanosti pušenja i prisustva PIK3CA mutacije, međutim svih sedam bolesnika u čijim tumorima je dokazano prisustvo PIK3CA mutacije su bili pušači (5 aktivnih i 2 bivša). Zanimljivo, značajan rezultat dobijen u našoj studije bio je taj da je prisustvo PIK3CA mutacije bilo uzajamno isključivo sa prisustvom drugih genskih alteracija koje smo određivali poput EGFR, KRAS, ALK i ROS1 mutacija, što prema podacima iz literature nije njihova karakteristika. Međutim, glavni nedostatak naše studije bio je mali broj bolesnika sa PIK3CA pozitivnim tumorima. U studiji Chatziandreou i saradnika (170), PIK3CA mutacija je bila prisutna zajedno sa mutacijama detektovanim u drugim ispitivanim genima poput EGFR, KRAS i BRAF, a slična je situacija bila i u studiji Scheffler-a i saradnika gde je od 42 PIK3CA pozitivna tumora kod njih 24, pored PIK3CA mutacije, detektovana dodatna genska alteracija (169). Takođe, i u studiji koju su sproveli Kawano i saradnici zabeleženao je istovremeno prisustvo PIK3CA mutacije i drugih genskih alteracija, a na prvom mestu mutacija u domenu EGFR gena (171).

S obzirom na relativno malu zastupljenost PIK3CA mutacija, njihov prognostički značaj kod bolesnika sa karcinomom bronha nije do danas dovoljno istražen. U malom broju do sada objavljenih studija koje su ispitivale prognostički značaj PIK3CA mutacija kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha prisustvo PIK3CA mutacije je predstavljalo negativna prognostički znak (172). U nedavno sprovedenoj studiji, McGowan i saradnici su pokazali da prisustvo PIK3CA mutacije predstavlja pozitivan prognostički faktor kod bolesnika sa ranim stadijumom skvamoznog karcinoma bronha (173), Song i saradnici ispitivali su prognostički značaj prisustva PIK3CA mutacija kod bolesnika sa kompletno reseciranim adenokarcinomom bronha (174). Od ukupno 810 uključenih bolesnika, njih 23 (2.8%) su u svojim tumorima imali

prisustvo mutacije u domenu PIK3CA gena. Kao i u našem istraživanju, prisustvo PIK3CA mutacije nije bilo povezano sa ispitivanim kliničko-patološkim karakteristikama. Za razliku od rezultata našeg istraživanja, u kojem PIK3CA mutacija nije bila prisutna istovremeno sa nekom od drugih genskih alteracija, u studiji kineskih autora prisustvo PIK3CA mutacije je bilo udruženo sa istovremenim prisustvom drugih genskih alteracija, a na prvom mestu mutacijama u domenu gena za EGFR, KRAS i ALK. Ovakav rezultat sa EGFR mutacijama na prvom mestu je donekle i očekivan s obzirom na veliku zastupljenos ovih mutacija kod pripadnika azijske rase koji su činili ispitivanu populaciju u studiji Songa i saradnika. Značaj prisustva PIK3CA mutacije na preživljavanje bez povratka bolesti analizirano je poredeći tri grupe ispitanika. Jednu grupu su sačinjavali bolesnici koji u svojim tumorima nisu imali prisustvo PIK3CA mutacije, druga grupa je bila sačinjena od bolesnika koji su u svojim tumorima osim PIK3CA mutacije imali istovremeno prisustvo i neke druge genske alteracije, dok je treća grupa bila sačinjena od bolesnika u čijim tumorima je detektovano prisustvo samo PIK3CA mutacije. Bolesnici sa PIK3CA pozitivnim tumorima bez prisustva neke druge genske alteracije imali su značajno lošije preživljavanje bez povratka bolesti i ukupno preživljavanje. U multivarijantnoj analizi viši stadijum bolesti, što je i očekivano, je bio u korelaciji sa kraćim ukupnim preživljavanjem, a takođe i prisustvo PIK3CA mutacije se pokazalo kao nezavistan negativan prognostički znak za preživljavanje. U našem istraživanju prisustvo PIK3CA nije bilo u korelaciji ni sa preživljavanjem bez povratka bolesti ni sa ukupnim preživljavanjem. Ono što je zajedničko za našu studiju i studiju Songa i saradnika je relativno mali broj PIK3CA pozitivnih bolesnika. Uz to, u našem istraživanju od sedam PIK3CA pozitivnih bolesnika samo tri su imala povratak bolesti nakon hirurškog lečenja, dok je u studiji Songa od 23 PIK3CA pozitivna bolesnika njih 15 imalo povratak bolesti što je sigurno značajno umanjilo efekat analize prisustva PIK3CA mutacija kao prognostičkog faktora kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.

U poslednjih nekoliko godina svedoci smo velikog napretka na polju imuno-onkologije ne samo karcinoma bronha već i tumora ostalih lokalizacija. I premda su inhibitori kontrolnih punktova, kao nova terapijska opcija, već ušli u upotrebu kod uznapredovalog, metastatskog karcinoma bronha, uloga samih kontrolnih punktova u ranom stadijumu karcinoma bronha i dalje nije poznata. Protein programirane ćelijske smrti, PD-1, i njegov ligand PD-L1 se smatraju

biomarkerima u imuno-onkologiji. Po prvi put u našoj zemlji u ovoj studiji je određena frekvencija i intenzitet ekspresije PD-1 na tumor infiltrirajućim limfocitima i frekvencija i intenzitet ekspresije PD-L1 na tumorskim ćelijama. Vrlo je mali broj studija koje su ispitivale PD-1 ekspresiju na tumor infiltrirajućim T limfocitima. U studiji Italijanskih autora (146), D'Inecco i saradnici su ispitivali PD-1 i PD-L1 ekspresiju u selektovanoj populaciji bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha od kojih je većina imala dokazano prisustvo neke od genskih alteracija poput KRAS, EGFR i ALK. Kod svega 30 od 125 bolesnika nije detektovano prisustvo jedne od pomenutih genskih alteracija. U našoj studiji PD-1 ekspresija iz tehničkih razloga nije mogla biti urađena kod 2 slučaja, dok je u preostalim 159 tumorskih uzoraka pozitivna PD-1 ekspresija je detektovana u 71 tumorskom uzorku (45.0%). Prisustvo PD-1 ekspresije nije bilo značajno povezano sa kliničko-patološkim karakteristikama koje smo ispitivali u našoj studiji. U studiji italijanskih autora od ukupno 122 tumorska uzorka, njih 43 je detektovano kao PD-1 pozitivno (35.2%), a za razliku od naših rezultata, prisustvo PD-1 ekspresije je bilo statistički značajno povezano sa pušačkim statusom ( $P=0.02$ ) i prisustvom KRAS mutacije ( $P=0.006$ ). U našem istraživanju, PD-L1 pozitivna ekspresija detektovana je kod 59 od 161 tumorskog uzorka (36.6%). Od 59 PD-L1 pozitivnih uzoraka njih 31 (19.3%) je imalo procenat ekspresije od 1-49%, dok je njih 28 (17.4%) imalo PD-L1 ekspresiju veću od 50%. U studiji D'Inecco i saradnika procenat PD-L1 pozitivnosti je bio veći nego u našoj studiji. Od 123 tumorska uzorka, kod 68 je detektovana PD-L1 pozitivna ekspresija (55.3%). PD-L1 pozitivni status je značajno bio povezan sa histološkim tipom adenokarcinoma ( $P=0.005$ ), a u multivarijantnoj analizi prisustvo PD-L1 pozitivne ekspresije je bilo značajno povezano sa prisustvom mutacija u domenu EGFR gena ( $P=0.002$ ). U našem istraživanju, PD-L1 pozitivna ekspresija je bila u statistički značajnoj povezanosti sa tipom hirurgije ( $P = 0.01$ ) i sa prisustvom KRAS mutacije ( $P = 0.02$ ), dok sa ostalim ispitivanim kliničko-patološkim karakteristikama nije bilo statistički značajne povezanosti. Ispitivana populacija u studiji italijanskih autora je u većini bila u uznapređovalom, metastatskom stadijumu nesitnoćelijskog karcinoma bronha, 66% je bila zastupljenost adenokarcinoma, dok su u našoj studiji učestvovali samo bolesnici sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha i to je glavna razlika između ove dve studije. Pored toga, značajna razlika je svakako bila i u tipu antitela koje je korišćeno za imunohistohemijsku analizu u cilju detekcije PD-1 i PD-L1 pozitivnosti i graničnim vrednostima za PD-1 i PD-L1 pozitivnost.

U studiji Schmidt-a i saradnika iz 2015 godine evaluirano je 321 slučaj bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinoma bronha u cilju utvrđivanja ekspresije PD-1 i PD-L1 (175). Ekspresija PD-1 na tumor infiltrišućim limfocitima je detektovana u 22% uzoraka, dok je PD-L1 ekspresija na tumorskim ćelijama zapažena u 24% slučajeva. U ovoj studiji nemačkih autora korišćena metodologija imunohistohemijske detekcije PD-L1 ekspresije je bila kao i u našoj studiji dok se metodologija imunohistohemijske detekcije PD-1 ekspresije razlikovala u odnosu na naše istraživanje. Razlika u zastupljenosti PD-1 i PD-L1 ekspresije u odnosu na našu studiju, u kojoj je zastupljenost bila veća u oba slučaja, mogla bi biti posledica strukture ispitivane populacije gde je u našoj studiji ispitivana populacija kompletno bila sačinjena od bolesnika sa hirurški odstranjenim adenokarcinomom bronha u ranom stadijumu bolesti, dok su u nemačkoj studiji bolesnici sa adenokarcinomom bronha bili zastupljeni u svega 39%.

Trenutno postoje velika neslaganja u pogledu uloge PD-1 i PD-L1 kao biomarkera koja se uočavaju i u našoj studiji, dve prethodno citirane studije, kao i u gotovo svim studijama koje se bave ovom problematikom. Neslaganja su na prvom mestu u pogledu ispitivane populacije u smislu rasne pripadnosti ispitanika, stadijuma bolesti ispitanika, histološkog podtipa bolesti, prisustva ili odsustva pokretačkih i drugih mutacija, primena prethodne antitumorske terapije ili odsustvo iste. Na drugom mestu su različite tehnike bojenja tumorskih preparata, odnosno korišćenje različitih antitela za detekciju prisustva ekspresije PD-1 i PD-L1, korišćenje različitih graničnih vrednosti za definisanje PD-1 i PD-L1 pozitivnosti, korišćenje arhivskog naspram svežeg tumorskog tkiva (175-177).

U našoj studiji univarijantna analiza pokazala je statistički značajnu korelaciju između PD-1 ekspresije i preživljavanja bez povratka bolesti ( $P=0.008$ ). Šta više, univarijantna analiza je pokazala značajnu korelaciju između PD-1 ekspresije i ukupnog preživljavanja ( $P=0.006$ ). U multivarijantnoj analizi, PD-1 ekspresija se pokazala kao nezavisni prognostički faktor kako za preživljavanje bez povratka bolesti ( $P=0.03$ ) tako i za ukupno preživljavanje ( $P=0.01$ ). Sa druge strane, u našoj studiji nije dokazana značajna korelacija između prisustva PD-L1 ekspresije i preživljavanja bez povratka bolesti i ukupnog preživljavanja dok se PD-L1 ekspresija nije pokazala kao prognostički faktor iako je dokazana statistički značajna povezanost sa tipom hirurgije ( $P = 0.01$ ) i sa prisustvom KRAS mutacije ( $P = 0.02$ ). U studiji D'Inecco i saradnika (146), PD-1 ekspresija nije bila u značajnoj korelaciji sa vremenom do progresije bolesti i ukupnim

preživljavanjem, a verovatni razlog razlike naših rezultata i rezultata italijanske studije je taj što su u našoj studiji učestvovali isključivo bolesnici sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha dok su italijanski bolesnici većinom bili u uznapređovalom, metastaskom stadijumu bolesti. Takođe, većina italijanskih bolesnika je imalo neku od pokretačkih mutacija, a najveći broj njih je tretiran ciljanom terapijom u zavisnosti od detektovane mutacije. Što se tiče PD-L1 ekspresije, ona je u studiji italijanskih autora bila u značajnoj korelaciji sa histološkim tipom adenokarcinoma i prisustvom EGFR mutacije čime je PD-L1 pozitivnost identifikovana kao moguć prediktivni faktor za odgovor na terapiju sa tirozin kinaza inhibitorima, preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje. Za razliku od studije italijanskih autora naša studija nije bila koncipirana na utvrđivanje prediktivnog značaja PD-1 i PD-L1 ekspresije već je cilj bio utvrđivanje njihovog prognostičkog značaja. U studiji nemačkih autora (174), PD-1 ekspresija je bila povezana sa prisustvom negativnog EGFR statusa, dok je PD-L1 ekspresija bila povezana sa dužim ukupnim preživljavanjem kod bolesnika sa skvamoznim karcinomom bronha, sa primenom adjuvantne terapije, veličinom tumora i prisustvom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. PD-1 i PD-L1 nisu pokazali prognostički značaj. Studija Zhou-a i saradnika (177), objavljena 2017. godine, ispitala je povezanost PD-L1 ekspresije, kliničko-patoloških karakteristika i ukupnog preživljavanja kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha. U ovu studiju uključeno je 139 bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha u stadijumu II i IIIA, kod kojih je sprovedeno hirurško lečenje i koji pre hirurškog lečenja nisu primali nikakvu anti-tumorsku terapiju slično bolesnicima u našem istraživanju. Od ukupno 131 tumorskog uzorka koji je bio odovarajući za imunohistohemijsko ispitivanje njih 81 (61.8%) je bilo PD-L1 pozitivno što je skoro dva puta više nego u našem istraživanju. U našoj studiji u odnosu na studiju kineskih autora korišćeno drugačije antitelo za imunohistohemijsku detekciju PD-L1 ekspresije, a drugačije su bile i granične vrednosti za ocenu PD-L1 pozitivnosti. Kao i u našoj studiji tako i u studiji kineskih autora nije bilo značajne povezanosti sa kliničko-patološkim karakteristikama kao što su godine starosti, pol, pušački status, histološki podtip, stadijum bolesti. Međutim, u studiji kineskih autora PD-L1 ekspresija je bila povezana sa EGFR mutacionim statusom, a pored toga, bolesnici čiji su tumori bili PD-L1 pozitivni i imali su značajno duže preživljavanje u odnosu na bolesnike sa PD-L1 negativnim tumorima što nije bio slučaj u našem istraživanju. Tokom 2015. godine grupa kineskih autora objavila je meta-analizu koja je obuhvatila pet studija koje su analizirale povezanost PD-L1 ekspresije i preživljavanja kod bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom

bronha (153). Od pet studija obuhvaćenih meta-analizom, 4 su uključivale bolesnike sa svim podtipovima nesitnoćelijskog karcinoma bronha, dok je samo jedna studija sprovedena kod bolesnika sa adenokarcinomom bronha. Takođe, 4 studije su sprovedene kod bolesnika azijske rase, a jedna kod bolesnika kavkaske rase. Frekvencija PD-L1 ekspresije u pojedinačnim studijama kretala se od 24.8% do 57.5%. Objedinjeni rezultat svih pet studija je ukazivao na to da je prisustvo PD-L1 ekspresije u uzorcima tumora negativan prognostički faktor za ukupno preživljavanje bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha, a isti rezultat je zapažen i u analizi podgrupa u odnosu na rasnu pripadnost. Heterogenost populacije bolesnika sa nesitnoćelijskim karcinomom bronha je u većini studija izvor razlike u dobijenim rezultatima. I dok u većini studija prisustvo PD-L1 ekspresije predstavlja negativan prognostički faktor, ima studija, poput ranije pomenute studije Zhou-a i saradnika, u kojima se PD-L1 ekspresija izdvaja kao jasno pozitivan prognostički faktor. Takođe, prognostički značaj PD-1 i PD-L1 ekspresije kod različitih histoloških podtipova nesitnoćelijskog karcinoma bronha je i dalje nejasna, a situacija postaje još komplikovanija spoznajom o postojanju novih podtipova kako skvamoznog karcinoma bronha tako i adenokarcinoma bronha. Pored prethodno navedenog, još uvek postoji značajna konfuzija u pogledu dijagnostičkog algoritma, a ona se najviše ogleda u odabiru antitela za detekciju PD-1 i PD-L1 ekspresije kao i graničnih vrednosti za ocenu PD-1 i PD-L1 pozitivnosti.

Naša studija je, kao i mnoge studije pre naše, potvrdila nezavistan prognostički značaj stadijuma bolesti za preživljavanje bez povratka bolesti i primene adjuvantne hemioterapije na ukupno preživljavanje. PD-1 kao prognostički faktor, a i kao prediktivni, do sada nije ispitivan u velikom broju kliničkih studija. Svega nekoliko studija je ispitivalo ulogu PD-1, a još manji broj njih je to uradilo na populaciji bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha. Naša studija je pokazala potencijlno važnu ulogu ekspresije PD-1 na tumor infiltrišućim limfocitima bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha kako za preživljavanje bez povratka bolesti tako i na ukupno preživljavanje. Sa druge strane, naša studija je pokazala da ekspresija PD-L1 nema prognostički značaj kod bolesnika sa ranim stadijumom adenokarcinoma bronha.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Analizom prikupljenih podataka utvrđeno je da su, u našoj grupi ispitanika, najčešće genske alteracije mutacije u domenu KRAS gena sa učestalošću 42.9%. Na drugom mestu su mutacije u domenu EGFR gena sa učestalošću 6.2%.
2. Prisustvo KRAS mutacije je statistički značajno povezano sa godinama starosti ispitanika ( $P=0.004$ ), polom ( $P=0.006$ ) i pušačkim statusom ( $P=0.004$ ).
3. Prisustvo EGFR mutacije je statistički značajno povezano sa godinama starosti ispitanika ( $P=0.013$ ) i pušačkim statusom ( $P=0.000$ ).
4. Prisustvo ALK rearanžmana, ROS1 rearanžmana i PIK3CA mutacija nije značajno povezano sa ispitivanim kliničko-patološkim karakteristikama.
5. Prisustvo PD-L1 ekspresije je statistički značajno povezano sa vrstom hirurškog lečenja ( $P=0.01$ ) i sa prisustvom KRAS mutacija ( $P=0.026$ ), dok prisustvo PD-1 ekspresije nije značajno povezano sa ispitivanim kliničko-patološkim karakteristikama.
6. Prisustvo EGFR i KRAS mutacije nije značajno povezano sa preživljavanjem bez povratka bolesti i ukupnim preživljavanjem.
7. Prisustvo PD-1 ekspresije je nezavistan prognostički faktor za preživljavanje bez povratka bolesti i ukupno preživljavanje, dok prisustvo PD-L1 ekspresije nije značajno povezano sa preživljavanjem bez povratka bolesti i ukupnim preživljavanjem.



## 7. LITERATURA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl):e1S-29S.
3. Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WEE, Lim E, Senan S, Felip E et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer(NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(Suppl 6):v89-98.
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J.W.W. Comber H et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403.
5. Francisci S, Minicozzi P, Pierannunzio D, Ardanas A, Eberle A, Grimsrud TK et al. Survival patterns in lung and pleural cancer in Europe 1999–2007: results from the EUROCARE 5 study. *Eur J Cancer*. 2015;51:2242–53.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:5–29.
7. Republika Srbija. Odabrani zdravstveni pokazatelji za 2014. godinu. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; Beograd,2015.
8. World Health Organisation. Histological typing of lung tumours. *Am J Clin Pathol*. 1982;77:123-36.
9. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;9:1243-60.

10. Meza R, Meernik C, Jeon J, Cote ML. Lung Cancer Incidence Trends by Gender, Race and Histology in the United States, 1973–2010. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121323.
11. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*. 2014;84(1):13-22.
12. Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlten DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1653-71.
13. Sobin LH. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2003;21(1):3-7.
14. Greene FL, Sobin LH. A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *J Surg Oncol*. 2009;99(5):269-72.
15. Watanabe Y. TNM classification for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;9:343-50.
16. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111:1710-17.
17. Sobin L, Wittekind Ch, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours, Sixth Edition*. New York: Wiley-Liss, 2002:99-103.
18. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux Đ, Groome PA, Rami-Porta R et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):706-14.
19. Goldstraw P. New TNM classification: achievements and hurdles. *Transl Lung Cancer Res*. 2013;2(4):264-72.

20. Rami-Porta R, Ball D, Crowley JJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2:593-602.
21. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2:686-93.
22. Rusch VR, Crowley JJ, Giroux D, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the N descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2:603-12.
23. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):220-8.
24. Tseng RC, Chang JW, Hsien FJ et al. Genomewide loss of heterozygosity and its clinical associations in non small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;117(2):241-7.
25. Ninomiya H, Nomura K, Satoh Y et al. Genetic instability in lung cancer: concurrent analysis of chromosomal, mini- and micro-satellite instability and loss of heterozygosity. *Br J Cancer.* 2006;94(10):1485-91.
26. Torres EM, Williams BR, Amon A. Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics.* 2008;179(2):737-46.
27. Roschke AV, Kirsch IR. Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells. *Curr Drug Targets.* 2010;11(10):1341-50.
28. Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* 2003;112(4):407-21.
29. Imelinski M, Berger AH, Hammerman PS et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell.* 2012;150(6):1107-20.

30. Lok W, Klein RQ, Saif MW. Aurora kinase inhibitors as anti-cancer therapz. *Anticancer Drugs*. 2010;21(4):339-50.
31. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D et al. The landscape of of somatic copy-numberalteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899-905.
32. Varrela-Garcia M, Mitsudomi T, Yatabe Y et al. EGFR and HER 2 genomic gain in reccurent non-small cell lung cancer after surgery: impact on outcome to treatment with gefitinib and association with EGFR and KRAS mutations in Japanese cohort. *J Thorac Oncol*. 2009;4(3):318-25.
33. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2866-74.
34. Grob TJ, Kannengiesser I, Tsourlakis MC, Atanackovic D, Koenig AM, Vashist YK et al. Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2012;25(12):1566-73.
35. Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung SW, Seo JW, Chung DH. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;5(3):305-13.
36. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(8):627-44.
37. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013;5(5):S479-90.
38. Tran TN, Selinger CI, Kohonen-Corish MR, McCaughan BC, Kennedy CW, O'Toole SA et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2013;81(3):462-7.
39. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present and future. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):1105-11.

40. Li Y, Pan Y, Wang R, Sun Y, Hu H, Shen X et al. ALK-Rearranged Lung Cancer in Chinese: A Comprehensive Assessment of Clinicopathology, IHC, FISH and RT-PCR. *PloS One*. 2013;8(7):e69016.
41. Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1795(1):37-52.
42. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):863-70.
43. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4352-9.
44. Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, Won JK et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2012;22(3):436-45.
45. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
46. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
47. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402.
48. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*. 2011;32(4):177-95.
49. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T et al. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet*. 2008;40(6):722-9.
50. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol*. 2011;22(12):2616-24.

51. Morozova O, Hirst M, Marra MA. Application of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:135-51.
52. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell.* 2013;153(1):38-55.
53. Rivera CM, Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell.* 2013;155(1):39-55.
54. McCaughan F, Dear PH. Single-molecule genomics. *J Pathol.* 2010;220(2):297-306.
55. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet.* 2013;14(10):703-18.
56. Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Koh ES. Prognostic Factors: Principles and Applications. In: Rami-Porta R, editor. *Staging Manual in Thoracic Oncology.* 2<sup>nd</sup> ed. North Fort Myers: Rx Press; 2016. p. 221-35.
57. Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *Eur J Cancer.* 1996;32(7):1135-41.
58. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A et al. Performance Status and Smoking Status Are Independent Favorable Prognostic Factors for Survival in Non-small Cell Lung Cancer: A Comprehensive Analysis of 26,957 Patients with NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2010;5:620-30.
59. Simmons CP, Koinis F, Fallona MT, Fearona KC, Bowdena J, Solheim TS et al. Prognosis in advanced lung cancer – A prospective study examining key clinicopathological factors. *Lung Cancer.* 2015;88:304-9.
60. Janjigian YY, McDonnell K, Kris MG, Shen R, Sima CS, Bach PB, Rizvi NA et al. Pack Years of Cigarette Smoking as a Prognostic Factor in Patients with Stage IIIB/IV Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer.* 2010;116(3):670–5.
61. Shiono, S., Katahira, M., Abiko, M. et al. Smoking is a perioperative risk factor and prognostic factor for lung cancer surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;63(2):93-8.

62. Hanagiri T, Sugio K, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Yasuda M et al. Significance of Smoking as a Postoperative Prognostic Factor in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2008;3(10):1127-32.
63. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A et al. Tobacco Smoking, Smoking Cessation, and Cumulative Risk of Upper Aerodigestive Tract Cancers. *Am J Epidemiol.*2008; 167(4):468-73.
64. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jockel K-H, Johnen G, Pohlabein H et al. Cigarette smoking and lung cancer – relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer.*2012; 131(5): 1210-9.
65. Scaglia NC, Chatkin JM, Pinto JA, Tsukazan MTR, Wagner MB, Saldanha AF. Role of gender in the survival of surgical patients with nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Med.* 2013; 8(3):142-7.
66. Chatkin JM, Abreu CM, Fritscher CC, Wagner MB, Pinto JA. Is there a gender difference in non-small cell lung cancer survival? *Gend Med.* 2004;1:41–7.
67. Batevik R, Grong K, Segadal L, Stangeland L. The female gender has a positive effect on survival independent of background life expectancy following surgical resection of primary non-small cell lung cancer: A study of absolute and relative survival over 15 years. *Lung Cancer.* 2005;47:173–81.
68. Hanagiri T, Sugio K, Uramoto H, So T, Ichiki Y, Sugaya M, et al. Gender difference as a prognostic factor in patients undergoing resection of non-small cell lung cancer. *Surg Today.* 2007;37:546–51.
69. Nakamura H, Ando K, Shinmyo T, Morita K, Mochizuki A, Kurimoto N et al. Female gender is an independent prognostic factor in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis.*Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;17(5):469-80.
70. Tas F, Ciftci R, Kilic L, Karabulut S. Age is a prognostic factor affecting survival in lung cancer patients. *Oncol Lett.* 2013;6(5):1507-13.

71. Owonikoko TK, Ragin CC, Belani CP, Oton AB, Gooding WE, Taioli E et al. Lung cancer in elderly patients: an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol.* 2007;25:5570-7.
72. Asmis TR, Ding K, Seymour L, Shepherd FA, Leighl NB, Winton TL et al. Age and Comorbidity As Independent Prognostic Factors in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trials. *J Clin Oncol.* 2008;26:54-9.
73. Paesmans M. Prognostic and predictive factors for lung cancer. *Breathe.* 2012;9(2):113-22.
74. Bronte G, Rizzo S, La Paglia L, Adamo V, Siragusa S, Ficorella C, Santini D, Bazan V, Colucci G, Gebbia N, et al: Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. *Canc Treat Rev.* 2010;36(3):S21–S29.
75. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009; 458(7239):719–24.
76. Li C, Hao L, Li Y, Wang S, Chen H, Zhang L et al. Prognostic Value Analysis of Mutational and Clinicopathological Factors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.* 2014;9(9):e107276.
77. Carper MB, Claudio PP. Clinical potential of gene mutations in lung cancer. *Clin Transl Med.* 2015;4(1):33.
78. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511(7511):543-50.
79. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:341-54.
80. Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol.* 2012;25(3):347-69.
81. Luo SY, Lam DC. Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Transl Respir Med.* 2013;1(1):1-8.



82. Yasuda H, Park E, Yun CH, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo WL. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med.* 2013;5(216):216ra177.
83. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361(10):947-57.
84. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, openlabel, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(3):239-46.
85. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G et al. 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 Mol Diagn.* 2013;15(4):415-53.
86. Zaric B, Stojšić V, Kovacevic T, Sarcev T, Tepavac A, Jankovic R et al. Clinical characteristics, tumor, node, metastasis status, and mutation rate in domain of epidermal growth factor receptor gene in serbian patients with lung adenocarcinoma. *J ThoracOncol.* 2014;9(9):1406-10.
87. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res.* 2015;5(9):2892-911.
88. Milovancev A, Stojšić V, Zaric B, Kovacevic T, Sarcev T, Perin B et al. EGFR-TKIs in aduvant treatment of lung cancer: to give or not to give? *Onco Targets Ther.* 2015;8:2915-21.
89. Marks JL, Broderick S, Zhou Q, Chitale D, Li AR, Zakowski MF et al. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2008;3:111–116.

90. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, Riely GJ, Chaft JE, Sima CS et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol.* 2012;7(12):1815-22.
91. Reinersman JM, Johnson ML, Riely GJ, Chitale DA, Nicastri AD, Soff GA et al. Frequency of EGFR and KRAS Mutations in Lung Adenocarcinomas in African-Americans. *J Thorac Oncol.* 2011;6(1):28–31.
92. Zhang Z, Wang T, Zhang J, Cai X, Pan C, Long Y et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor mutations in resected non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(8):e106053.
93. Kalikaki A, Koutsopoulos A, Hatzidaki D, Trypaki M, Kontopodis E, Stathopoulos E et al. Clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving front-line chemotherapy according to EGFR and K-RAS mutation status. *Lung Cancer.* 2010;69(1):110-5.
94. Douillard JY, Shepherd FA, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small cell lung cancer: data from the randomized phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol.* 2010;28:744-52.
95. Takano T, Fukui T, Ohe Y, Tsuta K, Yamamoto S, Nokihara H et al. EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan. *J Clin Oncol.* 2008;26(34):5589-95.
96. Zhao D, Chen X, Qin N, Su D, Zhou L, Zhang Q et al. The prognostic role of EGFR-TKIs for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2017;7:40374.
97. Bonanno L, Schiavon M, Nardo G, Bertorelle R, Bonaldi L, Galligioni A et al. Prognostic and predictive implications of EGFR mutations, EGFR copy number and KRAS mutations in advanced stage lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30(12):5121-8.

98. Nishii T, Yokose T, Miyagi Y, Daigo Y, Isaka T, Furumoto H et al. Prognostic value of EGFR mutations in surgically resected pathological stage I lung adenocarcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2016. doi: 10.1111/ajco.12512.
99. Ohtaki Y, Shimizu K, Kakegawa S, Nagashima T, Nakano T, Atsumi J et al. Postrecurrence survival of surgically resected pulmonary adenocarcinoma patients according to EGFR and KRAS mutation status. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(2):187-96.
100. Kudo Y, Shimada Y, Saji H, Kato Y, Yoshida K, Matsubayashi J et al. Prognostic Factors for Survival After Recurrence in Patients With Completely Resected Lung Adenocarcinoma: Important Roles of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status and the Current Staging System. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(6):e213-21.
101. Ragusa M, Vannucci J, Ludovini V, Bianconi F, Treggiari S, Tofanetti FR et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcome in resected non-small cell lung cancer patients. *Am J Clin Oncol*. 2014;37(4):343-9.
102. Burotto M, Thomas A, Subramaniam D, Giaccone G, Rajan A. Biomarkers in early-stage non-small-cell lung cancer: current concepts and future directions. *J Thorac Oncol*. 2014;9(11):1609-17.
103. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS Mutations in the Treatment of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *P T*. 2011;36(5):263-79.
104. Arrieta O, Cardona AF, Martin C, Mas-Lopez L, Corrales-Rodriguez L, Bramuglia G et al. Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP). *J Thorac Oncol*. 2015;10(5):838-43.
105. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5731-4.

106. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6169-77.
107. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):768-77.
108. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C et al. Selumetinib plus docetaxel for KRASmutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013;14(1):38–47.
109. Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4273-81.
110. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990;323(9):561-5.
111. Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 1999;20:1507-10.
112. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, Janne PA, Pignon J, Graziano S et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutationsubtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of aduvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;31:2173-81.
113. Nadal E, Chen G, Prensner JR, Shiratsuchi H, Sam C, Zhao L et al. KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014;9(10):1513-22.

114. Renaud S, Falcoz P, Schaeffer M, Guenot D, Romain B, Olland A et al. Prognostic value of the KRAS G12V mutation in 841 surgically resected Caucasian lung adenocarcinoma cases. *Br J Cancer*. 2015;113(8):1206-15.
115. Zheng D, Wang R, Zhang Y, Pan Y, Cheng X, Cheng C et al. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation subtypes in lung adenocarcinomas from Chinese populations. *Onco Targets Ther*. 2016; 9:833-43.
116. Pan W, Yang Y, Zhu H, Zhang Y, Zhou R, Sun X. KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies. *Oncotarget*. 2016; 7(7): 8373-88.
117. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448(7153):561-6.
118. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Genes Cancer*. 2014;5:1-14.
119. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4247-53.
120. Chia PL, Mitchell P, Dobrovic A, John T. Prevalence and natural history of ALK positive non-small-cell lung cancer and the clinical impact of targeted therapy with ALK inhibitors. *Clin Epidemiol*. 2014; 6:423-32.
121. Zaric B, Stojsic V, Panjkovic M, Tegeltija D, Stepanov V, Kovacevic T et al. Clinicopathological features and relation between anaplastic lymphoma kinase (ALK) mutation and histological subtype of lung adenocarcinoma in Eastern European Caucasian population. *J Cancer*. 2016; 7(15): 2207-12.
122. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Genes Cancer*. 2014 Apr;5(1-2):1-14.

123. Lee B, Lee T, Lee S-H, Choi Y-L, Han J. Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget*. 2016;7(17): 23874-84.
124. Zhang X, Zhang S, Yang X, Yang J, Zhou Q, Yin L et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer*. 2010;9:188.
125. Sullivan I, Planchard D. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(1):32-47.
126. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385-94.
127. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2167-77.
128. Lee JK, Park HS, Kim DW, Kulig K, Kim TM, Lee SH et al. Comparative analyses of overall survival in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive and matched wild-type advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2012;118(14):3579-86.
129. Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2012;76(3):403-9.
130. Yang P, Kulig K, Boland JM, Erickson-Johnson MR, Oliveira AM, Wampfler J et al. Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2012;7(1):90-7.
131. Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, Dafni U, Kerr KM, Hager H et al. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2780-7.
132. Solomon B. Validating ROS1 rearrangements as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):972-4.

133. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist*. 2013;18(7):865-75.
134. Rothschild SI. Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer - Beyond EGFR and ALK. *Cancers*. 2015;7:930-49.
135. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18(3):378-81.
136. Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2364-70.
137. Zhu Q, Zhan P, Zhang X, Lv T, Song Y. Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(3):300-9.
138. Cao B, Wei P, Liu Z, Bi R, Lu Y, Zhang L et al. Detection of lung adenocarcinoma with ROS1 rearrangement by IHC, FISH, and RT-PCR and analysis of its clinicopathologic features. *Onco Targets Ther*. 2016;9:131-8.
139. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(17):4570-9.
140. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014; 371(21):1963-71.
141. Cai W, Li X, Su C, Fan L, Zheng L, Fei K et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(7):1822-27.
142. Scheffler M, Schultheis A, Teixido C, Michels S, Morales-Espinosa D, Viteri S et al. ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma: prognostic impact, therapeutic options and genetic variability. *Oncotarget*. 2015;6(12):10577-85.

143. Fu S, Liang Y, Lin Y-B, Wang F, Huang M-Y, Zhang Z-C et al. The Frequency and Clinical Implication of ROS1 and RET Rearrangements in Resected Stage IIIA-N2 Non-Small Cell Lung Cancer Patients. PLoS ONE. 2015;10(4):e0124354.
144. Bagley SJ, Bauml JM, Langer CJ. PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. Clin Adv Hematol Oncol. 2015;13(10):676-83.
145. Jing W, Li M, Zhang Y, Teng F, Han A Kong L et al. PD-1/PD-L1 blockades in non-small-cell lung cancer therapy. Onco Targets Ther. 2016; 9:489–502.
146. D'Inecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Land L et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. Br J Cancer. 2015;112:95-102.
147. Calles A, Liao X, Sholl LM, Rodig SJ, Freeman GJ, Butaney M et al. Expression of PD-1 and Its Ligands, PD-L1 and PD-L2, in Smokers and Never Smokers with KRAS-Mutant Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2015;10(12):1726-35.
148. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. Lab Invest. 2014;94(1):107-16.
149. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. Eur J Cancer. 2014;50:1361-9.
150. Pan ZK, Ye F, Wu X, An HX, Wu JX. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. J Thorac Dis. 2015;7(3):462-70.
151. Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. Ann Oncol. 2014;25(10):1935-40.



152. Zhong A, Xing Y, Pan X, Shi M, Xu H. Prognostic value of programmed cell death-ligand 1 expression in patients with non-small-cell lung cancer: evidence from an updated meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3595-601.
153. Zhou Z-J, Zhan P, Song Y. PD-L1 over-expression and survival in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(2):203-8.
154. Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori.* 2012;98(6):751-5.
155. Mao Y, Li W, Chen K, Xie Y, Liu Q, Yao M et al. B7-H1 and B7-H3 are independent predictors of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2015;6(5):3452-61.
156. Zhang Y, Wang L, Li Y, Pan Y, Wang R, Hu H et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther.* 2014;7:567-73.
157. Yeung SF, Tong JH, Law PP, Chung LY, Lung RW, Tong CY et al. Profiling of Oncogenic Driver Events in Lung Adenocarcinoma Revealed MET Mutation as Independent Prognostic Factor. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1292-300.
158. Brcic L, Jakopovic M, Mistic M, Seiwert F, Kern I, Smojver-Jezek S et al. Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. *Diagn Pathol.* 2016; 11: 90.
159. Izar B, Zhou H, Heist RS, Azzoli CG, Muzikansky A, Scribner EEF et al. The prognostic impact of KRAS, its codon and amino acid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014;9:1363-9.
160. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, Ostoros G, Raso E, Timar J et al. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Sci Rep.* 2017;7:39721.

161. Wang Y, Wang S, Xu S, Qu J, Liu B. Clinicopathologic Features of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Harboring the EML4-ALK Fusion Gene: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014; 9(10): e110617.
162. Fukui T, Yatabe Y, Kobayashi Y, Tomizawa K, Ito S, Hatooka S et al. Clinicoradiologic characteristics of patients with lung adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion oncogene. *Lung Cancer*. 2012;77: 319-25.
163. Wu S, Wang J, Zhou L, Su D, Liu Y, Liang X et al. Clinicopathological characteristics and outcomes of ROS1-rearranged patients with lung adenocarcinoma without EGFR, KRAS mutations and ALK rearrangements. *Thorac Cancer*. 2015;6(4):413-20.
164. Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Jänne PA et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(9):1441-9.
165. Shan L, Lian F, Guo L, Qiu T, Ling Y, Ying J et al. Detection of ROS1 Gene Rearrangement in Lung Adenocarcinoma: Comparison of IHC, FISH and Real-Time RT-PCR. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0120422.
166. Wu S, Wang J, Zhou L, Su D, Liu Y, Liang X et al. Clinicopathological characteristics and outcomes of ROS1-rearranged patients with lung adenocarcinoma without EGFR, KRAS mutations and ALK rearrangements. *Thorac Cancer*. 2015;6(4):413-20.
167. Chen YF, Hsieh MS, Wu SG, Chang YL, Shih JY, Liu YN et al. Clinical and the Prognostic Characteristics of Lung Adenocarcinoma Patients with ROS1 Fusion in Comparison with Other Driver Mutations in East Asian Populations. *J Thorac Oncol*. 2014;9:1171-9.
168. Chaft JE, Arcila ME, Paik PK, Lau C, Riely GJ, Pietanza MC et al. Coexistence of PIK3CA and other oncogene mutations in lung adenocarcinoma-rationale for comprehensive mutation profiling. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(2):485-91.
169. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, Konig K, Michels S, Fassunke J et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*. 2015;6(2):1315-26.

170. Chatziandreou I, Tsioli P, Sakellariou S, Mourkioti I, Giannopoulou I, Levidou G et al. Comprehensive Molecular Analysis of NSCLC; Clinicopathological Associations. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133859.
171. Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2006;54(2):209-15.
172. Chen JY, Cheng YN, Han L, Wei F, Yu WW, Zhang XW et al. Predictive value of K-ras and PIK3CA in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs: a systemic review and meta-analysis. *Cancer Biol Med*. 2015;12(2):126-39.
173. McGowan M, Hoven AS, Lund-Iversen M, Solberg S, Helland A, Hirsh FR et al. PIK3CA mutations as prognostic factor in squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2017;103:52-7.
174. Song Z, Yu X, Zhang Y. Mutation and prognostic analyses of PIK3CA in patients with completely resected lung adenocarcinoma. *Cancer Med*. 2016;5(10):2694–700.
175. Schmidt LH, Kummel A, Gorlich D, Mohr M, Brockling S, Mikesch JH et al. PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0136023.
176. Paulsen EE, Kilvaer TK, Khanehkenari MR, Al-Saad S, Hald SM, Andersen S et al. Assessing PDL-1 and PD-1 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Novel Immunosome Approach. *Clin Lung Cancer*. 2017;18(2):220-33.
177. Zhou Y, Liu X, Hu Z, Zhong R, Han B, Zhong H. Association of PD-L1 expression with clinicopathologic features and overall survival in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(2):1954-61.

## 8. LISTA SKRAĆENICA

AJCC - American Joint Committee on Cancer (Američki udruženi komitet za kancer)

AKT1 - v-akt murine thymoma viral oncogene homolog1

ALK - Anaplastic Lymphoma Kinase(Kinaza anaplastičnog limfoma)

APC - adenomatous polyposis coli

AURKA - Aurora Kinase A

BRAF - v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

CCD - Charged Couple Device

CI - Confidence interval (Interval poverenja)

CIN - Chromosomal instability (Hromozomska nestabilnost)

CLICaP - The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer

dATP - Deoxyadenosine triphosphate

dCTP - Deoxycytidine triphosphate

DFS - Disease free survival (Preživljavanje bez povratka bolesti)

dGTP - Deoxyguanosine triphosphate

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

dNTPs - Deoxynucleotide triphosphates

dTTP - Deoxythymidine triphosphate

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor epidermalnog faktora rasta)

EML4 - Echinoderm Microtubule Associated protein Like 4

ERBB2 - v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogen homolog 2

FFPE - formalin-fixed, paraffin embedded

FGFR - fibroblast growth factor receptor (Receptor faktora rasta fibroblasta)

FISH - fluorescent in situ hybridization (Fluorescentna in-situ hibridizacija)

FLT3 - fms-related tyrosine kinase 3

HGF - Hepatocyte growth factor (Faktor rasta hepatocita)

HR - Hazard ratio

IASLC - International Association for the Study of Lung Cancer (Internacionalna Asocijacija za Istraživanje Karcinoma pluća)

IDH1 - isocitrate dehydrogenase 1

IHC - Immunohistochemistry (Imunohistohemija)

IPASS - Iressa Pan-Asia Study

JAK2 - Janus kinase 2

KIF5B - kinesin family member 5B

KIT - v-kit Hardy Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

KLC1 - kinesin light chain 1

MET - met pro-oncogene

MPS - Massive parallel sequencing

MSI - Microsatellites instability

MSKCC - Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

NGS - Next Generation Sequencing (Sekvencioniranje sledeće generacije)

NRAS - neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog

OS - Overall survival (Ukupno preživljavanje)

PCR - Polymerase chain reaction (Polimeraza lančana reakcija)

PD-1 - Programmed cell death protein 1

PD-L1 - Programmed death-ligand 1

PD-L2 - Programmed death-ligand 2

PFS - Progression free survival (Preživljavanje bez progresije bolesti)

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase

PIK3CA - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PTEN - phosphatase and tensin homolog (Homolog fosfataze i tenzina)

RET - Ret proto-oncogene

RNK - Ribonukleinska kiselina

ROS1 - c-ros oncogene 1

SMS - single-molecule sequencing

SNV - Single nucleotide variants

SSRs - Simple Sequence repeats

TCGA - The Cancer Genome Atlas

TFG - TRK-fused gene

TKI - Tyrosine-kinase inhibitor (Inhibitor Tirozin KInaze)

TP53 - tumor protein 53

TTF1 - Thyroid Transcription Factor – 1

UICC - International Union Against Cancer (Međunarodna unija za borbu protiv raka)

VAFs - variant allele frequencies

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor (Faktor rasta vaskularnog endotela)

WES - Whole exome sequencing (Sekvencioniranje celog egzoma)

WGS - Whole Genome Sequencing (Sekvencioniranje celog genoma)