



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
KLINIČKA MEDICINA

# **BETA ESTROGEN RECEPTOR KAO PROGNOSTIČKI FAKTOR U ADENOKARCINOMU PLUĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Kandidat: **Ass. mr sc. med. Nensi Lalić**

Mentori: **Prof. dr sc. med. Branislav Perin**

**Prof. dr sc. med. Zdravko Kosjerina**

Novi Sad, 2014. godine

**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	Nensi Lalić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr sc.med. Branislav Perin, redovni profesor Prof.dr sc.med. Zdravko Kosjerina, vandredni profesor
Naslov rada: NR	Beta estrogen receptor kao prognostički faktor u adenokarcinomu pluća
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 8 / stranica 145 / slika 6 / grafikona 38 / tabela 37 / referenci 243 / priloga 5
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Interna medicina, Pulmologija

<p>Predmetna odrednica, ključne reči: PO</p>	<p>Adenokarcinom; Neoplazme pluća; Estrogenski receptor beta; Prognoza; Preživljavanje; Polni faktori; Karcinogeneza</p>
<p>UDK</p>	<p>616.24-006.6-037 577.175.6:577.354</p>
<p>Čuva se: ČU</p>	<p>Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad</p>
<p>Važna napomena: VN</p>	
<p>Izvod: IZ</p>	<p>Prema statističkim podacima Svetske Zdravstvene Organizacije, karcinom bronha se po učestalosti kod muškaraca nalazi na prvom mestu, a kod žena na drugom mestu, odmah posle karcinoma dojke. Posmatranjem trenda incidence karcinoma bronha u dužem vremenskom periodu u odnosu na pol, u većini evropskih zemalja se beleži pad incidence kod muškaraca uz porast incidence kod žena. Povećanje incidence u ženskoj populaciji na prvom mestu povezuje se sa sve rasprostranjenijom navikom pušenja u žena širom sveta. Kao jedan od mogućih faktora koji utiču na uzlazni trend pojave karcinoma kod žena navodi se i hormonalni status (estrogeni status) tim pre što je procenat pušača u ženskoj populaciji obolelih od karcinoma bronha još uvek manji nego u muškoj populaciji. Estrogeni se mogu ponašati kao promotori u procesu kancerogeneze, preko receptor posredovanih mehanizama, preko kojih dovode do ćelijske proliferacije. Postoje dve vrste estrogenih receptora (Alfa i Beta estrogeni receptori-ER). Imunohistohemijski dokazano je uglavnom negativno prisustvo Alfa-ER (ER<math>\alpha</math>) u zdravom tkivu pluća kao i u tkivu karcinoma pluća, dok je Beta-ER (ER<math>\beta</math>) u dosadašnjim istraživanjima bio signifikantno povišen u tkivu tumora pluća u odnosu na zdravo tkivo pluća. Ekspresija ER<math>\beta</math> u odnosu na ekspresiju ER<math>\alpha</math> je mnogo više prisutna u karcinomu bronha i kreće se od 9%-98%. U našem radu ekspresija ER<math>\beta</math> iznosila je 39,0%. Ciljevi ove doktorske disertacije bili su: određivanje terapijskog odgovora kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma pluća prema prisutnosti beta estrogenog receptora u tkivu tumora, utvrđivanje preživljavanje pacijenata sa adenokarcinomom pluća prema prisutnosti beta estrogenog receptora (ER<math>\beta</math>) u tkivu tumora, utvrđivanje</p>

	<p>razlike u preživljavanju i terapijskom odgovoru po polu, a prema estrogen beta receptorskom statusu i na kraju da li beta estrogen receptor može biti prognostički faktor za pacijente sa adenokarcinomom pluća. Bolji terapijski odgovor i duži period do progresije bolesti postoji kod žena sa pozitivnim beta estrogenim receptorskim statusom. Kod muškaraca receptorski status nema uticaja na terapijski odgovor i period do progresije bolesti. Žene sa pozitivnim beta estrogenim receptorskim statusom imale su statistički značajno bolje preživljavanje nego žene i muškarci sa negativnim beta estrogenim receptorskim statusom, odnosno muškarci sa pozitivnim receptorskim statusom. Kod pacijenata sa pozitivnim beta estrogen receptorskim statusom petogodišnje preživljavanje u IA i IB stadijumu bolesti je statistički značajno bolje. Kod pacijenata sa pozitivnim beta estrogen receptorskim statusom jednogodišnje preživljavanje u IIIb i IV stadijumu bolesti je statistički značajno bolje. Period do progresije bolesti je duži za žene sa estrogen beta pozitivnim receptorskim statusom u odnosu na žene sa estrogen beta negativnim receptorskim statusom i muškarce bez obzira na receptorski status. Beta estrogen receptor je nezavisni prognostički faktor za pacijente sa adenokarcinomom pluća zajedno sa stadijumom bolesti i vrstom primenjene terapije. Dobijeni rezultati navode nas na zaključak da je hormonski receptorski status sigurno jedan od mnogobrojnih dosada ispitivanih faktora u kancerogenezi karcinoma bronha i može biti prognostički faktor za karcinom bronha kao i potencijalni faktor u multimodalitetnom lečenju (primena hormonske terapije - antiestrogeni) ovog malignog oboljenja.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: <b>Prof.dr sc med Nevena Sečen</b>, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica</p> <p>član: <b>Prof.dr sc med Jelena Stanić</b>, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Foči, Univerzitet Srpsko Sarajevo, Republika Srpska, Institutu za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica</p> <p>član: <b>Doc. dr Milana Panjković</b>, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica</p> <p>član: <b>Doc.dr Dejan Đurić</b>, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica</p> <p>član: <b>Doc.dr Ilija Andrijević</b>, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Sremska Kamenica</p>
---	--

**University of Novi Sad**  
**Faculty of Medicine**  
**Key word documentation**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Nensi Lalić
Mentor: MN	Branislav Perin Zdravko Kosjerina
Title: TI	Beta-Estrogen Receptor as a Prognostic Factor in Lung Adenocarcinoma
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / ser.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Vojvodina, Serbia
Physical description: PD	Number of chapters: 8/ pages 145 / images 6/ graphs 38/ tables 37 / references 243 / appendices 5
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Internal medicine - pulmonology
Subject, Key words SKW	Adenocarcinoma; Lung Neoplasms; Estrogen Receptor beta; Prognosis; Survival; Sex Factors; Carcinogenesis
UC	616.24-006.6-037 577.175.6:577.354

Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, 21000, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>           According to the statistical reports of the World Health Organisation, lung cancer takes the first and second leading position among the most common malignancies in men and women (following breast cancer) respectively. Reviewing the incidence of lung cancer related to patients sex over a longer time period, its decrease in males and increase in females has been registered in most European countries. The greater lung cancer incidence in the female population has been primarily correlated to the increasingly present smoking habit among females all over the world. The hormonal (estrogen) status has been reported as another possible factor contributing to the increasing incidence of lung cancer in females, particularly due to the fact that still a lower percentage of smoking women is affected by lung cancer than smoking men. Estrogens may behave as promoters in the process of carcinogenesis, via receptor-mediated mechanisms, leading to cell proliferation. There are two types of estrogen receptors (ER)–alpha (ER<math>\alpha</math>), and beta (ER<math>\beta</math>). It has been immunohistochemically established that the presence of ER<math>\alpha</math> was predominantly negative in both the healthy and cancerous lung tissue, unlike the presence of ER<math>\beta</math>, which was significantly increased in the lung cancer tissue compared to the healthy lung tissue. ER<math>\beta</math> expression is excessively higher in lung cancer (ranging from 9%-98%) than ER<math>\alpha</math> expression. In our study, ER<math>\beta</math> expression was 39.0%. The objectives of this PhD study were to establish the treatment response of lung adenocarcinoma patients depending on the presence of ER<math>\beta</math> in the tumor tissue; the survival of patients with lung adenocarcinoma depending on the presence of ER<math>\beta</math> in the tumor tissue; the treatment response and survival differences between the sexes depending on the ER<math>\beta</math> status, and finally whether the ER<math>\beta</math> status may be a prognostic factor in these patients. A better treatment response and a longer remission has been registered in females with the positive ER<math>\beta</math> status. In males, the ER status has been found irrelevant for either the treatment response, or the period until the disease progression. The females with the positive ER<math>\beta</math> status had a significantly better survival than both females and males with the         </p>

	<p>negative ER<math>\beta</math> status, or males with the positive ER<math>\beta</math> status. Stage IA and IB lung adenocarcinoma patients with the positive ER<math>\beta</math> status had a significantly better five-year survival. Stage IIIB and IV patients with the positive ER<math>\beta</math> status had a significantly better one-year survival. The period until progression of the disease was longer in ER<math>\beta</math> positive females than in either ER<math>\beta</math> negative females, or in males regardless their ER status. The ER<math>\beta</math> status has been established an independent prognostic factor for patients with lung adenocarcinoma, in addition to the disease stage, and applied treatment modality. The obtained results suggest a conclusion that the hormonal receptor status is doubtlessly one of many factors in lung cancer carcinogenesis which have been investigated so far, and may be established as a prognostic factor in lung cancer, as well as a potential factor in multi modal (hormonal therapy-anti estrogen) treatment of this malignancy.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: Nevena Sečen, M.D.,Ph.D member: Jelena Stanic, M.D.,Ph.D member: Milana Panjkovic, M.D.,Ph.D member: Dejan Đurić, M.D.,Ph.D member: Ilija Andrijević, M.D.,Ph.D</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: Nevena Sečen, M.D.,Ph.D member: Jelena Stanic, M.D.,Ph.D member: Milana Panjkovic, M.D.,Ph.D member: Dejan Đurić, M.D.,Ph.D member: Ilija Andrijević, M.D.,Ph.D</p>



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. KARCINOM BRONHA .....	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA .....	2
Incidenca .....	2
Mortalitet .....	8
Starosna dob .....	11
Pol .....	11
1.1.2. ETIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA – FAKTORI RIZIKA .....	13
Pušenje .....	14
Radon .....	15
Industrijsko i aerozagađenje .....	15
Nasleđe .....	16
Ishrana i fizička aktivnost .....	16
1.1.3. MOLEKULARNA I ĆELIJSKA BIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA .....	17
1.1.4. FAKTORI RASTA I NJIHOVI ONKOGENI .....	21
PROTO-ONKOGENI: RECEPTOR EPIDERMALNOG FAKTORA RASTA (EGFR) .....	22
RAS/RAF/MEK/MARK aktivacioni put .....	26
KRAS .....	26
ALK, MET I LKB1 – NOVI BIOMARKERI .....	27
EML4-ALK translokacija .....	27
MET .....	28
LKB1 .....	28
RECEPTORI INSULINU SLIČNOG FAKTORA RASTA TIP 1 (IGF-1R) .....	29
1.1.5. TUMORSKA ANGIOGENEZA .....	30
1.1.6. KLINIČKA SLIKA KARCINOMA BRONHA .....	30
1.1.7. DIJAGNOTIČKE METODE I ODREĐIVANJE STADIJUMA BOLESTI .....	34
Neinvazivne tehnike dijagnostike karcinoma bronha .....	35
Invazivne tehnike dijagnostike karcinoma bronha .....	37
Savremene bronhološke dijagnostičke tehnike .....	38
1.1.8. TNM KLASIFIKACIJA I STADIJUM BOLESTI .....	41
1.1.9. HISTOLOŠKA PODELA KARCINOMA BRONHA .....	43
1.1.10. TERAPIJA KARCINOMA BRONHA .....	44
HIRURŠKO LEČENJE .....	44
Savremene epidemiološke i tehnološke promene koje utiču na hiruršku dijagnostiku i lečenje .....	45
HEMIOTERAPIJA U LEČENJU KARCINOMA BRONHA .....	48
LEČENJE NEMIKROCELULARNOG KARCINOMA BRONHA .....	48
Rani stadijum NSCLC .....	48
Četvrti stadijum nemikrocelularnog karcinoma bronha .....	50
Terapija održavanja .....	50
LEČENJE MIKROCELULARNOG KARCINOMA BRONHA .....	51
RADIOTERAPIJA U LEČENJU KARCINOMA BRONHA .....	51
Radioterapija za NSCLC .....	52
Stereotaktična ablativna radioterapija .....	53
1.2. BETA ESTROGEN RECEPTOR U KARCINOMU BRONHA .....	53

1.2.1.	Estrogen i karcinom bronha .....	54
1.2.2.	Estrogen u normalnom tkivu pluća .....	54
1.2.3.	Ekspresija estrogenog receptora beta – EF $\beta$ u karcinomu bronha.....	55
1.2.4.	Prognostički uticaj beta estrogenog receptora (ER $\beta$ ) u karcinomu bronha .....	56
1.2.5.	Beta estrogen receptor (ER $\beta$ ) kao prediktivni marker u terapiji karcinoma bronha .....	57
2.	CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	59
3.	MATERIJAL I METODE.....	60
3.1.	ISPITANICI .....	60
3.2.	IMUNOHISTOHEMIJSKA METODA (INH).....	61
	Imunohistohemijska analiza estrogen receptora.....	61
3.3.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	63
4.	REZULTATI .....	64
5.	DISKUSIJA .....	92
6.	ZAKLJUČCI.....	115
7.	PRILOZI .....	116
8.	LITERATURA .....	119

## 1. UVOD

### 1.1. KARCINOM BRONHA

Karcinom bronha je jedan od najznačajnijih uzroka smrti povezanih sa malignim bolestima u svetu. Još u petom veku pre nove ere, Hipokrat je opisao bolest sa lošom prognozom i dao joj ime karcinom. Porast obolelih od malignih bolesti nastaje u 19-om veku, a prava ekspanzija u 20-om veku (1). Maligne bolesti svojom učestalošću, visokom smrtnošću kao i nizom nepoznanica, već decenijama predstavljaju veliki izazov za savremenu medicinu. Posle kardiovaskularnih bolesti, maligne bolesti su najčešći uzrok obolevanja i smrti čoveka. Epidemiološki podaci iz velikog broja zemalja, uključujući i bazu podataka Svetske Zdravstvene Organizacije, tokom poslednjih 50 godina, govore o značajnim promenama u incidenci, prevalenci, morbiditetu i mortalitetu malignih bolesti i o globalnom trendu njihovog rasta, sa malim izuzecima (2).

Karcinom bronha je i dalje jedan od najučestalijih karcinoma u svetu, kako kod muškaraca, tako i kod žena. Vodeći je uzrok smrtnosti u Evropi (3), Engleskoj (4) i Sjedinjenim Američkim Državama (5). Prema statističkim podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), karcinom bronha se po učestalosti kod muškaraca nalazi na prvom mestu, a kod žena na drugom mestu, odmah posle karcinoma dojke. Prema podacima Britanskog registra za karcinom, karcinom bronha se kod muškaraca nalazi na drugom mestu, odmah iza karcinoma prostate, a kod žena na trećem mestu, iza karcinoma dojke i debelog creva. U Sjedinjenim Američkim Državama je procenjeno da je karcinom bronha na drugom mestu u odnosu na druge malignitete kod muškaraca, odmah iza karcinoma prostate, dok je kod žena takođe na drugom mestu, iza karcinoma dojke. Prema podacima zdravstveno statističkog godišnjaka Republike Srbije, muškarci su u odnosu na maligne bolesti najčešće obolevali od karcinoma bronha, a potom debelog creva i prostate, dok je kod žena najučestalija maligna bolest bila karcinom dojke, potom karcinom debelog creva, a na trećem mestu karcinom bronha, što se uklapa sa svetskim podacima (6,7).

Povezanost između konzumacije duvana i nastanka karcinoma bronha je utvrđena još pre više od 50 godina. Procenjuje se da u svetu ima više od milijardu pušača, što čini oko četvrtinu svih odraslih osoba. U većini zemalja u svetu, prevalenca pušenja je viša u muškaraca nego u žena. U većini evropskih zemalja beleži se porast prevalencije pušenja među muškarcima, ali i među ženama (8). Posmatranjem trenda incidence karcinoma bronha u

dužem vremenskom periodu u odnosu na pol, u većini evropskih zemalja se beleži pad incidence kod muškaraca uz porast incidence kod žena (9, 10).

Povećanje incidence u ženskoj populaciji na prvom mestu povezuje se sa sve rasprostranjenijom navikom pušenja u žena širom sveta. Kao jedan od mogućih faktora koji utiču na uzlazni trend pojave karcinoma kod žena navodi se i hormonalni status (estrogeni status) tim pre što je procenat pušača u ženskoj populaciji obolelih od karcinoma bronha još uvek manji nego u muškoj populaciji (12). Broj obolelih žena od karcinoma pluća ima tendenciju porasta u celom svetu. U zemljama zapada taj trend je zaustavljen (zbog postepenog opadanja broja pušača među ženama), ali nema tendenciju opadanja kao kod muškaraca.

Estrogeni receptori su pronađeni u zdravih pluća odraslih, a nađeni su i u tkivu karcinoma pluća. Estrogeni se mogu ponašati kao promoteri u procesu kancerogeneze, preko receptor posredovanih mehanizama, preko kojih dovode do ćelijske proliferacije. Postoje dve vrste estrogenih receptora (Alfa i Beta estrogeni receptori-ER) Imunohistohemijski dokazano je uglavnom negativno prisustvo Alfa-ER ( $ER\alpha$ ) u zdravom tkivu pluća kao i u tkivu karcinoma pluća, dok je Beta-ER ( $ER\beta$ ) u dosadašnjim istraživanjima bio signifikantno povišen u tkivu tumora pluća u odnosu na zdravo tkivo pluća (11, 12). Takođe je njihov nivo bio najviši u adenokarcinomu pluća u odnosu na druge patološke tipove tumora (13).

Dalja ispitivanja rađena su u pravcu različitosti među polovima i uticaju ER na preživljavanje obolelih od karcinoma bronha. Rezultati su bili različiti, ali većina studija je pokazala da je preživljavanje kod  $ER\beta$  pozitivnih karcinoma pluća povezana sa dužim preživljavanjem i to u osoba muškog pola (14, 15). Ovim su sledila nova ispitivanja u pravcu korištenja novih terapijskih mogućnosti. Najnovija istraživanja usmerena su na korištenje ukrštene reakcije  $ER\beta$  i receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR), time i mogućeg korištenja kombinovane terapije: estrogeni antagonisti sa tirozin kinaznim inhibitorima EGFR-a u terapiji nesitnoćelijskog karcinoma pluća.

### **1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA**

#### **Incidenca**

Maligne bolesti su najčešće bolesti i najčešći uzrok smrtnosti u svetu. U 2008. godini postojalo je 12,7 miliona novih slučajeva obolelih od karcinoma. Karcinom bronha, karcinom dojke, kolorektalni karcinom i karcinom želuca iznosili su 40% ukupno obolelih od karcinoma u svetu te godine. Karcinom bronha je i dalje jedan od najučestalijih karcinoma u svetu, kako kod muškaraca, tako i kod žena. Procenjeno je da se godišnje u svetu

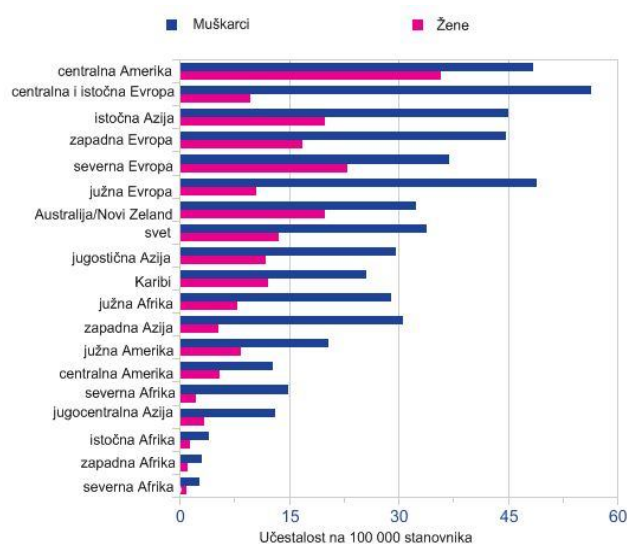
dijagnostikuje oko 1,6 miliona novoobolelih od karcinoma bronha, što čini oko 13% svih malignih bolesti. Prema poslednjim podacima incidenca karcinoma bronha kod muškaraca u svetu iznosi oko 1,09 miliona, a kod žena oko 516.000 (16). Slika 1. prikazuje mapu koju je 2010.g. objavila Internacionalna agencija za istraživanje malignih bolesti GLOBICAN.



Slika 1. Incidenca malignih bolesti u svetu. 12,7 miliona novih slučajeva, uzrasno standardizovana stopa incidence karcinoma bronha i najčešće dijagnostikovane maligne bolesti različitih regiona u svetu u 2008. g.

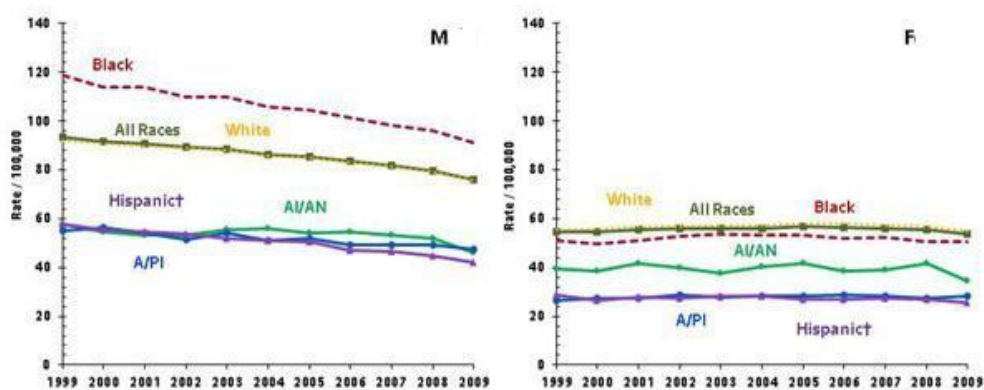
U 2008. g. najviša stopa incidence karcinoma bronha zabeležena je u centralnoj i istočnoj Evropi i iznosila je 57 slučajeva na na 100.000 stanovnika. Podatak se vezuje za činjenicu da je najodgovorniji faktor rizika pušenje, s obzirom da je u Rusiji, Ukrajini i Belorusiji registrovana najviša standardizovana prevalenca pušača u svetu. Incidenca karcinoma bronha u muškaraca je vrlo niska u zapadnoj i istočnoj Africi (3 do 4 slučaja na 100.000 stanovnika). Sadašnja stopa incidence karcinoma bronha u žena najniža je u nekoliko

afričkih regiona i iznosi 1 do 2 na 100.000 stanovnika gde je i standardizovana stopa prevalence pušenja takođe niska (17). Navedeni podaci prikazani su na Grafikonu 1.



Grafikon 1. Uzasno standardizovana stopa incidence karcinoma bronha u svetu u 2008.g.

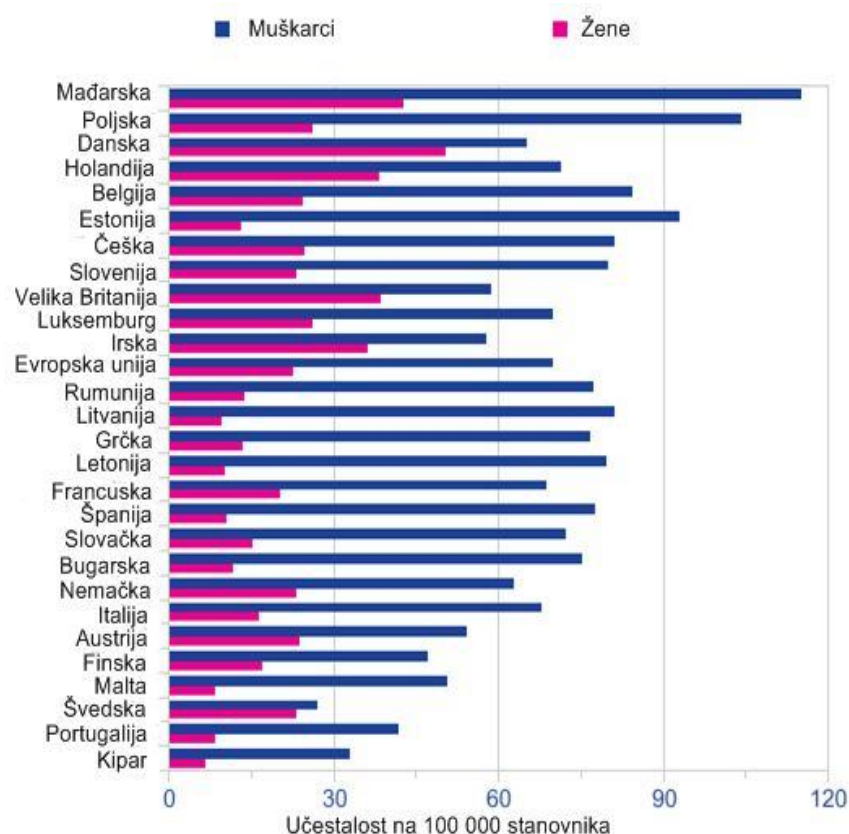
U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je procenjeno da je karcinom bronha na drugom mestu u odnosu na druge malignitete kod muškaraca, odmah iza karcinoma prostate, dok je kod žena takođe na drugom mestu, iza karcinoma dojke. U 2010. godini u SAD je dijagnostikovano 222,520 novih slučajeva karcinoma bronha što je iznosilo 15 % svih dijagnostikovanih karcinoma te godine. Stopa incidence pokazuje signifikantan pad za muškarce, od 102,1 slučaja na 100.0000 stanovnika u 1984. godini na 71,3 slučaja na 100.0000 stanovnika u 2006. godini. Za žene stopa incidence je dostigla plato nakon dugog perioda njenog porasta (18). Grafikon 2. pokazuje stopu incidence karcinoma bronha u SAD u periodu od 1999. - 2010. godine pri čemu je incidenca prikazana prema etničkom sastavu i prema polu, a podaci su dobijeni iz Nacionalnog registra za maligne bolesti Nacionalnog Instituta za maligne bolesti SAD objavljenih u novembru 2011.g.



Grafikon 2. Stopa incidence karcinoma bronha u SAD prema etničkoj pripadnosti u periodu 1999-2010. g.

Podaci iz pomenutog registra pokazuju da je u 2010. godini, među muškarcima najviša stopa incidence karcinoma bronha bila za crnu rasu, sledi bela rasa, potom američka grupa indijanaca, azijati, na kraju hispano grupa. Među ženama najvišu incidencu karcinoma bronha u 2010. g. imala je bela rasa, sledi crna rasa, potom indijanska rasa, sledi azijska rasa i na kraju hispano rasa.

Unutar Evropske Unije najviša incidenca karcinoma bronha je registrovana u Mađarskoj i Poljskoj, a najniža u Švedskoj i na Kipru. Incidenca karcinoma bronha u Mađarskoj kod žena iznosi 42,9/100000, a kod muškaraca 115,3/100000. U Poljskoj je incidenca karcinoma bronha kod žena niža u odnosu na Mađarsku i iznosi 26,3/100000, dok je incidenca kod muškaraca vrlo visoka u odnosu na evropski standard i iznosi 104,5/100000. Vrednosti incidence karcinoma bronha na 100.000 stanovnika u Evropskoj Uniji iznose 22,9/100.000 za žene i 70/100.000 za muškarce. Najniže incidence karcinoma bronha imaju Švedska i Kipar. U Švedskoj je incidenca za žene 23,5/100.000, a za muškarce 27,3/100.000. Navedeni podaci su shematski prikazani na Grafikonu 3 (17).



Grafikon 3. Uzrasno standardizovana stopa incidence karcinoma bronha u Evropi u 2008.g.

Istraživanje koje je sprovedla grupa za onkološko istraživanje južne i istočne evrope - The South Eastern European Research Oncology Group (SEEROG) obuhvatilo je 8 zemalja centralne i istočne Evrope među kojima je i bila i Srbija. Najčešći karcinom za muškarce u svim zemljama bio je karcinom bronha, sa izuzetkom Češke u kojoj su karcinom prostate i kolorektalni karcinom bili češći. Karcinom bronha za žene nalazi na trećem mestu u Hrvatskoj, Mađarskoj, Poljskoj i Srbiji. Tabela 1. prikazuje uzrasno standardizovanu stopu incidence za najčešće karcinome u 8 zemalja južne i istočne Evrope (19). Za područje Srbije u 2004.g. incidenca karcinoma bronha iznosila je 64,2 za muškarce, a za žene je iznosila 18,4. U Srbiji je prema pomenutom istraživanju, incidenca karcinoma bronha za oba pola bila druga po redu veličine, odmah posle Mađarske što je prikazano na Tabeli br. 1.



*Tabela 1. Uzrasno standardizovana stopa incidence za navedene države i navedene godine*

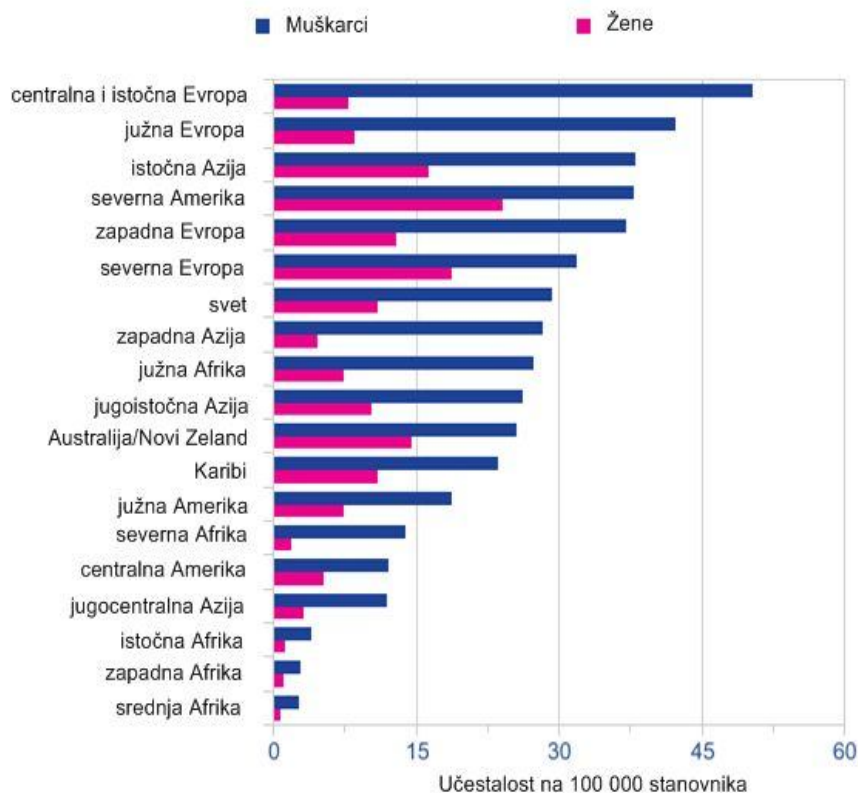
Država	God.	Muškarci				Žene				
		bronh	želudac	kolon	pro-stata	bronh	želudac	kolon	dojka	cerviks
Hrvatska	2005.	63,7	17,7	43,5	38,7	13,6	6,9	23,4	55,8	9,2
Češka	2005.	58,2	11,2	58,7	59,5	15,5	5,8	28,8	61,7	13,3
Mađarska	2002.	94,6	20,5	56,6	34,0	24,9	9,5	33,7	63,0	15,7
Poljska	2006.	60,2	12,8	29,3	27,3	14,5	4,9	17,2	44,5	11,5
Rumunija	2002.	50,0	17,6	22,0	16,7	8,5	6,8	14,4	44,3	23,9
Srbija	2004.	64,2	12,9	33,7	20,1	18,4	7,2	20,9	57,9	24,3
Slovačka	2004.	55,8	16,1	55,5	33,9	10,4	7,0	27,7	49,7	15,2

Prema podacima zdravstveno statističkog godišnjaka Republike Srbije, standardizovana stopa incidence karcinoma bronha na 100.000 stanovnika u 2010.g. je u centralnoj Srbiji za muškarce iznosila 61,4 a za žene 18,8, dakle za muškarce je ona bila nešto niža, a za žene viša, međutim za oba pola bez statističke značajnosti u odnosu na 2004.g (20).

## Mortalitet

Karcinom bronha je najčešći uzok smrti od malignih bolesti u svetu i 2008. godine bio je odgovoran za svaki peti smrtni ishod uzrokovan malignim oboljenjem, tačnije 1,38 umrlih, odnosno 18% (21, 22). Kod muškaraca, karcinom bronha čini skoro četvrtinu svih smrtnih slučajeva (oko 24%), a kod žena skoro petinu smrtnih slučajeva (oko 21%). Najniže stope smrtnosti karcinoma bronha zabeležene su u sednjoj Africi u oba pola, a najviše stope smrtnosti karcinoma bronha zabeležene su u centralnoj i istočnoj Evropi za muškarce i severnoj Americi za žene. Odnos mortaliteta i incidence karcinoma bronha je u 2008. g. iznosio 0,86, time stopa mortaliteta prati stopu incidence karcinoma bronha.

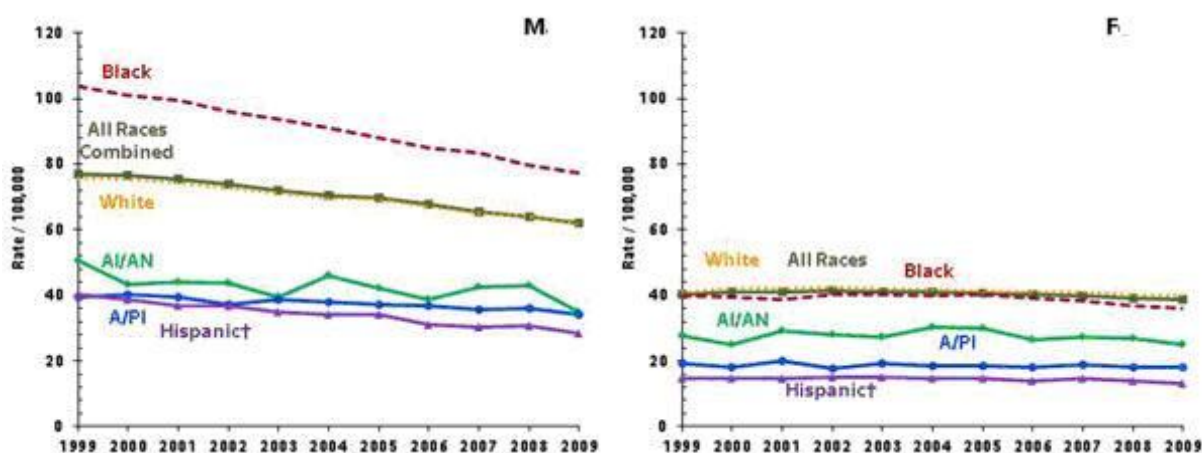
Ovo se ogleda i u distribuciji najviših i najnižih stopa u pojedinim regionima sveta što je prikazano i na Grafikonu br. 4.



Grafikon 4. Uzasno standardizovana stopa mortaliteta karcinoma bronha u svetu u 2008. godini

U SAD stopa smrtnosti od karcinoma bronha je za oba pola najviša za sve maligne bolesti. U 2010. godini postojalo je 157,300 smrtnih slučajeva od karcinoma bronha, što je iznosilo oko 28% svih smrtnih slučajeva od malignih bolesti. Od 1987. godine sve više žena umire od karcinoma bronha u odnosu na karcinom dojke. Stopa mortaliteta kod muškaraca smanjila se za 1,3% godišnje u periodu od 1990. do 1994., ali za 2,0% u periodu od 1994. do

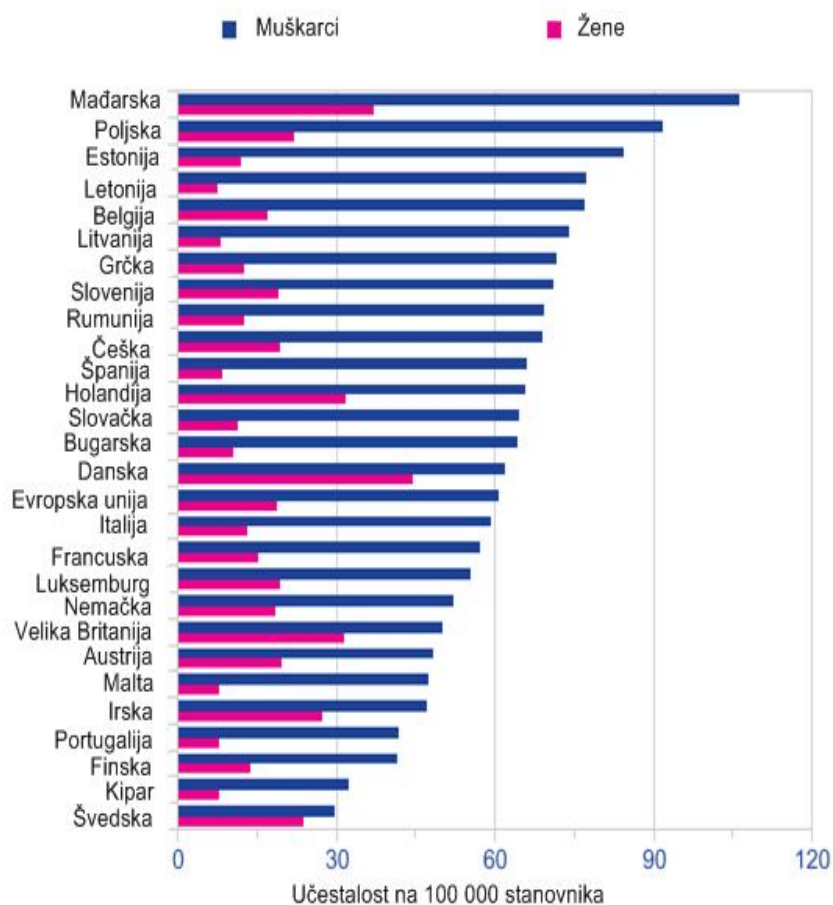
2006. godine. Stopa smrtnosti za žene je u stagnaciji od 2003.g. nakon dosta godina njenog porasta. Ovakav trend mortaliteta za oba pola odraz je razlika u istoriji navike pušenja između žena i muškaraca u proteklih 40 godina (18). Na grafikonu 5 prikazana je stopa smtnosti od karcinoma bronha na području SAD u periodu od 1999. do 2010.g., pri čemu je mortalitet prikazan prema etničkom sastavu i prema polu, a podaci su dobijeni iz Nacionalnog registra za maligne bolesti Nacionalnog Instituta za maligne bolesti SAD objavljenih u novembru 2011. g.



Grafikon 5. Stopa mortaliteta karcinoma bronha u SAD prema etničkoj pripadnosti u periodu 1999-2010. g.

Grafikon 5. pokazuje da je stopa mortaliteta u 2010.godini kod muškaraca najviša za crnu rasu, slede ostale rase, a za žene je ona najviša za belu rasu, zatim slede ostale rasne grupe.

Unutar 27 zemalja Evropske Unije, najviša stopa mortaliteta karcinoma bronha kod muškarca je registrovana u Mađarskoj (oko 107/100000), a kod žena u Danskoj (oko 45/100000). Najniža stopa mortaliteta karcinoma bronha kod muškaraca je registrovana u Švedskoj (oko 30/100000), a kod žena u Litvaniji (oko 8/100000), što je prikazano na grafikonu 6 (17).



Grafikon 6. Uzrasno standardizovana stopa mortaliteta karcinoma bronha u Evropi u 2008. godini

Istraživanje stope mortaliteta koje je sprovedla grupa za onkološko istraživanje južne i istočne evrope - The South Eastern European Research Oncology Group (SEEROG) obuhvatilo je 8 zemalja centralne i istočne Evrope među kojima je i Srbija, pokazalo je da je u većini ovih zemalja za muškarce najviša stopa mortaliteta za karcinom bronha u odnosu na ostale malignitete. Sledi ga kolorektalni karcinom i karcinom prosate. Za ženski pol stopa mortaliteta u ovim zemljama najviša je za karcinom dojke izuzev Mađarske gde najvišu stopu mortaliteta ima karcinom bronha i Slovačke u kojoj kolorektalni karcinom ima kod žena najvišu stopu mortaliteta. Tabela 2 prikazuje uzrasno standardizovanu stopu mortaliteta za najčešće karcinome u 8 zemalja južne i istočne Evrope (19).

*Tabela 2. Uzrasno standradizovana stopa mortaliteta za najčešće karcionme u određenim državama (Hrvatska, Češka, Mađarska, Poljska, Rumunija, Slovačka u 2005, a Srbija i Crna Gora 2002.*

Zemlja	Muškarci				Žene				
	bronh	želudac	kolon	prostata	bronh	želudac	kolon	dojka	cerviks
Hrvatska	55,3	14,3	25,0	15,3	10,7	5,9	12,0	17,4	2,5
Češka	52,4	9,3	30,0	16,3	12,8	4,6	14,2	17,7	3,9
Mađarska	72,5	12,4	31,9	13,0	22,3	5,8	16,4	19,2	4,9
Poljska	64,6	13,6	18,8	12,9	14,3	4,9	10,8	14,9	5,7
Rumunija	48,2	15,4	15,6	9,0	8,5	5,3	9,1	16,6	10,7
Srbija i CG	51,9	11,5	18,4	9,5	12,3	4,7	10,1	19,3	6,9
Slovačka	50,0	12,0	30,6	14,9	7,8	5,7	13,3	15,3	5,1

### **Starosna dob**

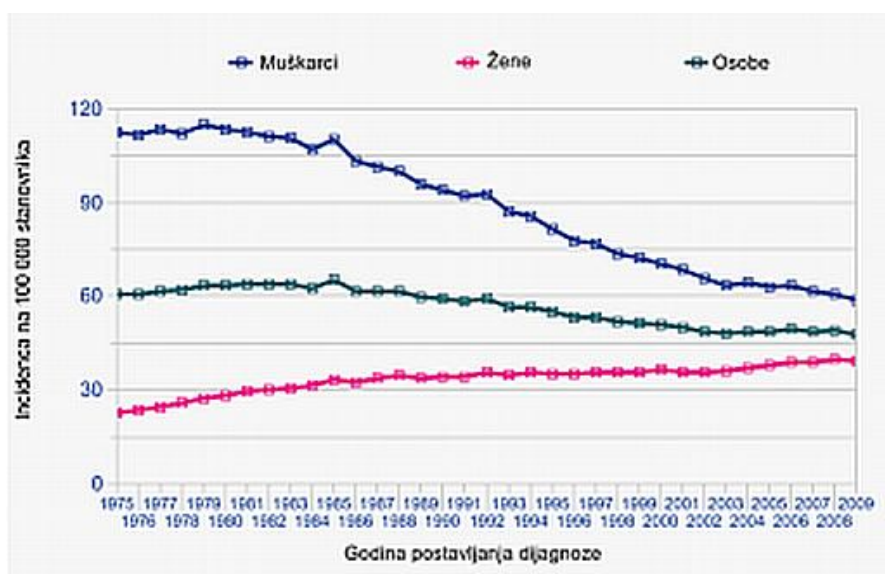
Karcinom bronha je tesno povezan sa starosnim uzrastom. U Velikoj Britaniji je od 2007. g. do 2009. g. u proseku tri četvtine svih novootkrivenih slučajeva dijagnostikovano u osoba sa 65 godina ili više. Uzrasno specifična stopa incidence karcinoma bronha strmo raste od 40. godine života, sa najvišim vrednostima u starosnoj dobi od 80 do 84 godine. Stope incidence su slične i kod muškaraca i kod žena u njihovim 40-im godinama, ali posle toga, stope u muškaraca postaju više u odnosu na stope u žena i sa porastom starosne dobi, ova razlika se povećava. Uzrasno-specifična stopa incidence karcinoma bronha strmo raste od starosnog doba od oko 50 do 54 godine i u muškaraca i u žena, dostižući najviše vrednosti kod muškaraca u dobi preko 85 godina, a kod žena u dobi od 80 do 84 godine. (17).

### **Pol**

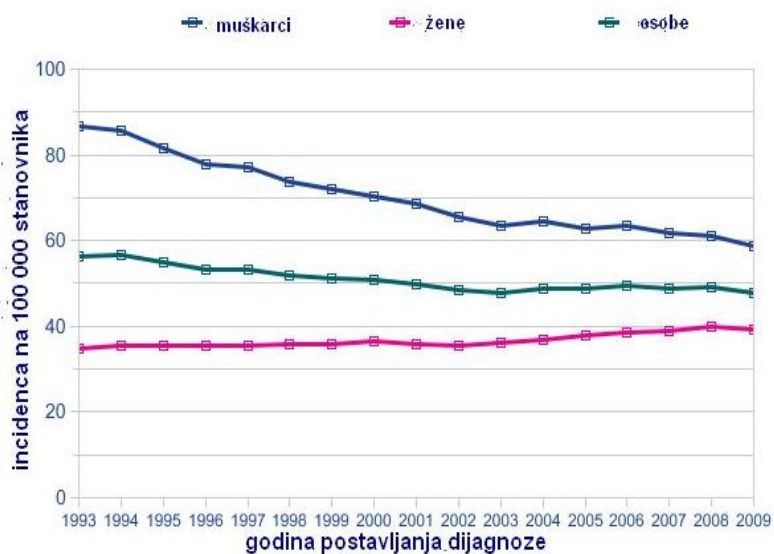
Posmatranjem trenda incidence karcinoma bronha u dužem vremenskom periodu u odnosu na pol, u većini evropskih zemalja se beleži pad incidence kod muškaraca uz porast incidence bolesti kod žena (20,23,24). U Velikoj Britaniji je stopa incidence karcinoma bronha kod muškaraca pala za 46% u periodu od sredine 1970-ih godina do 2009. g. Nasuprot ovome, stopa incidence karcinoma bronha kod žena se povećala od sredine 1970-ih godina na

67% do 2007-2009.g. iako je porast tokom prethodne decenije bio manje izražen (grafikon 7) (17).

Tokom prethodne decenije (između 1998.-2000. i 2007.-2009.) starosno standardizovana stopa incidence karcinoma bronha kod muškaraca u Velikoj Britaniji je pala za 16% dok je stopa za žene porasla za više od 9%. Posmatrajući trend incidence karcinoma bronha u Velikoj Britaniji u peridu od 1993. do 2009. g., uočava se trend pada incidence kod muškaraca uz trend porasta i postizanja platoa kod žena (Grafikon 8.) (17).

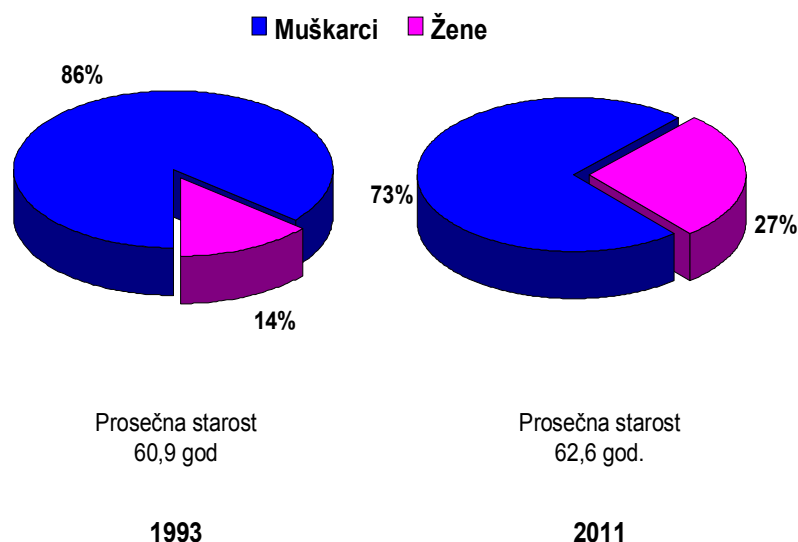


Grafikon 7. Evropska uzrasno standardizovana stopa incidence u Velikoj Britaniji, 1975-2009. godine



Grafikon 8. Evropska uzrasno standardizovana stopa incidence u Velikoj Britaniji, 1993-2009. godine

Prema nezvaničnim podacima iz registra karcinoma bronha Instituta za plućne bolesti Vojvodine, u Vojvodini je u 2011. g. bilo registrovano 73% muškaraca obolelih od karcinoma bronha i 27% žena obolelih od karcinoma bronha, dok je 1993. g. bilo 86% obolelih muškaraca i 14% žena (25). Poređenjem navedenih podataka, prikazanih na Grafikonu 9, može se zaključiti da se i na našoj teritoriji prati trend porasta incidence karcinoma bronha kod žena i trend pada incidence karcinoma bronha u muškaraca (Grafikon 9.).



*Grafikon 9. Karcinom bronha u Vojvodini u odnosu na polnu zastupljenost 1993. i 2011. godine*

### 1.1.2. ETIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA – FAKTORI RIZIKA

#### **Pušenje**

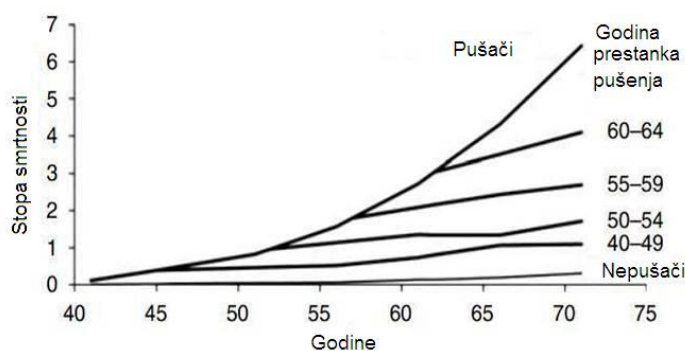
Pušenje cigareta odgovorno je za "pandemiju" karcinoma bronha. Ova pojava je primećena i publikovana još 1950. godine (26). Studije vođene 1964. godine pokazuju da je rizik obolevanja među pušačima 8 do 12 puta veći. Takođe je dokazano da je među obolelima od karcinoma bronha 90% pušača. Rizik obolevanja povećava se sa brojem popušanih cigareta na dan, kao i sa brojem godina "pušačkog staža". Rizik od smrti uzrokovane karcinomom bronha zavisi više od dužine pušačkog staža nego od broja konzumiranih cigareta, pušenje 20 cigareta dnevno tokom 40 godina opasnije je od pušenja 40 cigareta 20 godina (27). Takođe se rizik povećava kod onih koji su počeli pušiti u mlađem životnom dobu. Prestankom pušenja, nakon deset godina smanjuje se rizik od obolevanja na 50%, a što je ovaj vremenski period duži, rizik od bolesti se smanjuje još više (28).



Porast karcinoma bronha koji se prati u drugoj polovini 20-og veka povezuje se sa načinom proizvodnje cigareta, odnosno promenama u njihovom pravljenju. To se odnosi na pravljenje rupica u filteru za cigarete, dodavanje aditiva duvanu i papiru za cigarete. Uočeno je da cigarete sa manje nikotina, takozvane lajt (light) cigarete, ne smanjuju rizik obolevanja, čak naprotiv. Razlog je da se dim takvih cigareta više "uvlači" i povećava se broj popušanih cigareta na dan (29).

Pušenje 1 do 4 cigarete na dan povećava rizik od nastanka karcinoma bronha za oko tri puta u muškaraca, a čak za pet puta u žena u odnosu na nepušače. Oni koji puše 8 do 12 cigareta imaju oko 12 puta veći rizik od nastanka karcinoma, a uoliko puše 25 cigareta na dan taj rizik je 24 puta veći u odnosu na rizik kod nepušača. Oni koji puše više od 40 cigareta na dan uvećavaju taj rizik čak 39 puta (30, 31).

Muškarac sa dugogodišnjim pušačkim stažom ima 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 10. prikazan je kumulativni rizik za smrt kod karcinoma bronha u odnosu na uzrast i prestanak pušenja. Prestanak pušenja kod žena ima iste benefite po zdravstveno stanje kao i kod muškaraca, dovodeći do smanjenja kumulativnog rizika za smrt uzrokovanu karcinomom bronha do 75. godina života. Kumulativni rizik kod žene koja je višegodišnji pušač iznosi 9,5%, a pada na 5,3% i 2,2% kod žena koje prestanu da puše u šezdesetoj i pedesetoj godini života respektivno. Podaci iz više evropskih zemalja potvrđuju rezultate prema kojima prestanak pušenja u srednjoj životnoj dobi drastično smanjuje rizik od karcinoma bronha (32).



Grafikon 10. Efekti prestanka pušenja u određenoj dobi na kumulativni rizik od smrti uzrokovane karcinomom bronha do 75. godine života

Devedesetih godina dokazuje se uloga p53 tumor supresor gena kao medijatora apoptoze, programirane smrti ćelija, odnosno kako njegova inaktivacija procesima mutacije kao najčešće genske alteracije, dovodi do maligniteta. U kasnim devedesetim dokazano je da



sekvencionalno specifična mutacija p53 u karcinomu bronha pacijenata koji su pušači ima iste karakteristike kao i mutacija u kulturi ćelija izloženih dejstvu aromatičnih hidrokarbonata oslobođenih iz duvanskog dima. Najčešće je to tačkasta mutacija.

Svaka cigareta oslobađa potentnu mešavinu gasa i čvrste supstance koji zajedno sadrže oko 4000 hemijskih jedinjenja koji se oslobađaju kada cigareta gori, od kojih je 300 potencijalno kancerogenih. Većina ovih jedinjenja sadržana je u čvrstoj partikuli koja se naziva katran. Najčešće se u organizmu metabolišu i ekskretuju kancerogeni iz grupe PAH i NNK. Citohrom p450 enzimski sistem započinje kaskadu metaboličkih događaja. Oksidisani intermedijerni produkti se kasnije transformišu, reaguju sa DNA i stvaraju kovalentne veze kojim nastaju sastojci zvani dodaci. Metaboliti NNK grupe jedini se mogu naći u urinu pušača ali i onih koji su izloženi dejstvu duvanskog dima. NNK grupa kancerogena dokazana je kao najčešće odgovorna za nastanak adenokarcinoma pluća (33).

### **Radon**

Radon je inertni gas koji je prvi otkriven kao riziko faktor među uranijumskim elementima, za nastanak karcinoma bronha. On se oslobađa prilikom raspadnja uranijuma i tada emituje alfa čestice koje mogu reagovati sa DNA ćelija respiratornog epitela. Kada postoji udruženost ovog faktora sa pušenjem, rizik bolesti se povećava. Poreklo radijacije su gama zračenje i X-zraci koji se koriste u istraživačke svrhe. Njime su izloženi radnici u okviru rada na istraživanju atomskog naoružanja i medicinski radnici gde se ova vrsta zračenja koristi u dijagnostici i u terapijske svrhe. Takođe su ovom riziku izloženi radnici u rudnicima uranijuma. Međutim, radon može da se nakuplja i u domaćinstvima, doduše u mnogo nižoj koncentraciji u odnosu na rudnike uranijuma. Izloženost koncentraciji od 100 (Bq/m<sup>3</sup>) u domaćinstvu povećava rizik od karcinoma bronha za 16% (34).

### **Industrijsko i aeroxagađenje**

Industrijski karcinogeni, poput arsenika i policikličnih hidrogenkarbonata ali i rad u industriji metala ili boja i lakova, povezuju se sa povišenim rizikom nastanka karcinoma bronha. Postoje dokazi da visoka izloženost nafti, naftnim derivatima i izduvnim gasovima nastalim sagorevanjem fosilnih goriva takođe povećavaju rizik za nastanak karcinoma bronha (35). Danska studija koja je objavljena 2011. g. bavila se ispitivanjem aeroxagađenja i njegovog uticaja na nastanak malignih bolesti. Ispitivanje je rađeno na 54.304 ispitanika i obuhvatilo je period od 1971. g.do 2001. g. Trećina ispitanika su bili nepušači. Prosek praćenja ispitanika bio je 9,6 godina. Prosečna koncentracija zagađenja iznosila je 21.9 µg/m<sup>3</sup>. Svi ispitanici su stanovali u okruženju od najviše 50 metara od ulica, a prosečni broj vozila je

iznosio 10.000 vozila na dan. Uz karcinom bronha po učestalosti sledio je karcinom grlića materice potom karcinom mozga. Nedvosmisleno je pokazana udruženost aerozagađenja sa 20 vrsta malignih tumora (36). Azbestoza kao uzrok karcinoma bronha poznat je od 1955. god. kada je objavljena studija koja je sprovedena na grupi tekstilnih radnika u Engleskoj. Udruženost pušenja sa izloženošću azbestom izuzetno povećava rizik od nastanka karcinoma bronha. Najverovatnije je razlog efekat pušenja na klirens azbestnih vlakana iz pluća. Takođe se zna da je izloženost azbestu povezana sa nastankom mezotelioma, ali povezanost nastanka mezotelioma i pušenja nije dokazana (37).

### **Nasleđe**

Pozitivna porodična istorija bolesti povećava rizik od nastanka karcinoma bronha. Više studija pokazalo je da se taj rizik kreće od 1,7 do 2,0. Nekoliko studija pokazalo je da je nasledni faktor više izraćen za ženski nego za muški pol (38). Ukoliko je dijagnoza bolesti postavljena u mlađem životnom dobu ovaj rizik je višestruki od dvostrukog. Nasledna predispozicija je mnogo više zastupljena u osoba crne rase. Istorija karcinoma bronha u porodici kod rođaka prvog stepena nosi dvostruko povišen rizik za obolevanje od karcinoma bronha. Rizik se još povećava ukoliko je oboleli rođeni brat ili sestra (39). Rizik od obolevanja ne dovodi se u vezu sa pušenjem. Ukoliko je dijagnoza karcinoma bronha postavljena pre 60. godine života, rizik za nastanak karcinoma bronha kod srodnika prvog stepena može biti i petostruko povišen. Danas postoje epidemiološke studije koje ukazuju da je ovaj rizik mnogo viši kod osoba crne rase u odnosu na belce (40).

### **Ishrana i fizička aktivnost**

Ishrana bogata mastima, crveno meso i smrznuta hrana povezani su sa učestalijim nastankom karcinoma bronha. Dokaz za ovo je broj obolelih u Hong Kongu poslednjih 30 godina. Postoji porast broja obolelih kod nepušača, jer je porastao broj osoba koji konzumiraju crveno meso uz porast broja gojaznih. Uz ovakve studije, postoje one koje dokazuju smanjivanje broja obolelih u područjima gde je povećana upotreba voća i povrća. Vitamin A-retinol, jedan je od dokazanih sastojaka hrane koji ima protektivno i preventibilno dejstvo. Isto važi i za vitamin C i karoten. Postoje studije koje pokazuju neuspeh hemioterapije kod pacijenata kod kojih ishrana nije bila obogaćena retinolom, beta-karotenom i askorbinskom kiselinom (41). Alkohol se tradicionalno povezuje sa povišenim rizikom za nastanak karcinoma bronha. Iako nema direktnih podataka koji bi ukazivali na činjenicu da povećano konzumiranje alkohola povećava rizik. Najverovatnije mehanizam dejstva leži u vezi uzimanja alkohola i pušenja (42).

### 1.1.3. MOLEKULARNA I ĆELIJSKA BIOLOGIJA KARCINOMA BRONHA

Nagli porast incidence karcinoma bronha uticao je na intenziviranje ekperimentalnih studija radi eventualnog pronalaženja mogućih etioloških faktora ove bolesti. Mnoge supstance iz čovekove okoline kao i faktori čovekovog organizma mogu uticati na pojavu karcinoma. Ovi se faktori mogu grupisati u **kancerogene, prokancerogene** ili **promotore** tumorskog rasta. Kancerogeneza predstavlja multifazni proces koji od normalne ćelije vodi stvaranju maligne ćelije.

Faze kancerogeneze su:

- **Inicijacija**
- **Promocija**
- **Progresija**

Faza inicijacije nastaje nakon kraćeg izlaganja kancerogenu. Ukoliko je doza kancerogena nedovoljna ili nema promotora, proces kancerogeneze će biti zaustavljen. Promotori su faktori koji pomažu rast inicirane ćelije. Na kraju, u procesu progresije nastaju brojne genetske promene, dok će dalji razvoj malignog tumora zavisiti od brojnih faktora domaćina i tumora (43). Osnova procesa kancerogeneze je aktivacija protoonkogeni u dominantni onkogen ili inaktivacija recesivnog antionkogeni, odnosno tumor supresor gena. Onkogeni predstavljaju transformisane gene koji aktiviraju ćeliju ka ispoljavanju transformisanog fenotipa. Tumor supresor geni su negativni faktori regulatora rasta i njihov gubitak takođe vodi formiranju transformisanog fenotipa.

Oko 75-80% karcinoma bronha izazvano je pušenjem. Međutim 15% muškaraca obolelih od karcinoma bronha u svetu i oko 53% obolelih žena su bili nepušači. Karcinom bronha u nepušača nalazi se na sedmom mestu uzroka smrtnosti od malignih bolesti u svetu, ispred karcinoma grlića materice i karcinoma prostate. Hronična opstruktivna bolest pluća i plućna fibroza su takođe signifikantno nezavisni riziko faktori za nastanak karcinoma bronha (44). Definisane zajedničkih molekularnih puteva kod kojih hronične inflamatorne bolesti pluća iniciraju karcinom bronha, mogu da se identifikuju biomarkerima i skrining testovima, a sve u cilju pronalaženja efektivnijih terapijskih strategija i meta.

Dim od cigarete sadrži preko 60 kancerogenih od kojih su to uglavnom policiklični aromatični hidrokarbonati i nitrozamini. Citohrom p450 enzimski sistem započinje kaskadu metaboličkih događaja. Oksidisani intermedijerni produkti se kasnije transformišu, reaguju sa DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) i stvaraju kovalentne veze kojim nastaju sastojci zvani dodaci. Glutation-S-transferaza deluje protektivno na stvaranje DNK dodataka i ona se time uglavnom regeneriše. Međutim hronično stvaranje DNK produkata vodi mutaciji gena kao što

je mutacija p53 tumor supresor gena koja je jedna od osnova u procesu inicijacije kancerogeneze u karcinomu bronha. Ovi produkti su obično na mestu adenina ili gvanina kao baza DNK i vode mutaciji u obe vrste gena, kako tumor supresor gena (*PTEN*, *RB*, *TP53* and *LKB1/STK11*) tako i onkogeni (*KRAS*, *EGFR*, *HER2/neu*, *C-MYC* and *N-MYC*) i izazivaju genotoksičnost (45). Duvanski dim takođe sadrži veliki broj slobodnih radikala koji dovode do oksidacije DNK nukleobaze gvanina koji tada formira 8-oksigvanin, a koji opet repariše 8-oksigvanin DNA N-glikolaza 1 (*OGG1*). Studije sugerišu da nizak nivo *OGG1* aktivnosti povećava rizik od nastanka karcinoma bronha. Još značajnije jeste da *OGG1* Ser26Cys genetski polimorfizam povećava rizik od nastanka karcinoma bronha, tako je da Cys/Cys genotip povezan sa većim rizikom od nastanka karcinoma bronha u poređenju sa Ser/Ser genotipom među teškim pušačima (46).

Upotrebom novih tehnologija kao što je single nucleotide polymorphism (SNP) metoda, postiže se mapiranje humanog genoma. Korišćenje SNP omogućava identifikaciju alela niske penetrantnosti koji su povezani sa rizikom obolevanja od karcinoma bronha. Ova metoda pretraživanja genoma dovela je identifikacije lokusa za nesitnoćelijski karcinom bronha na 15q25.1 koji uslovljava podložnost karcinomu bronha kod aktuelnih ili bivših pušača. Primećeno je da je rizik veći kod aktuelnih i bivših pušača u odnosu na nepušače, ali sam alel nije bio u vezi sa karcinomima glave i vrata koji su uslovljeni pušenjem. Upravo zbog toga je jedan od osnovnih zaključaka ove studije da prisustvo alela 15q25 nije povezano niti uslovljeno pušenjem. Otkriveni su vareniclin kao parcijalni nikotin receptorski agonist koji smanjuje nikotinsku zavisnost, dok bupropion inhibiše noradrenalin i dopaminsko preuzimanje i na taj način omogućava odvikavanje od pušenja. Formiranjem genetskog profila za individualnog pušača bilo bi omogućeno pronaći najviše odgovarajući farmakološki agens za odvikavanje od pušenja (47).

U karcinomu bronha postoje hromozomske nestabilnosti, kako numeričke (aneuploidije) tako i strukturne (citogenetske). Od citogenetskih hromozomskih nestabilnosti najzačajnije su nerekipročne translokacije i delecije koje uključuju 1p, 3p, 6q, 9p, 11p, 15p i 17p (lokalizacija p53) i zahvataju domene tumor supresor gena (tumor suppressor genes – TSG). Polizomije često zahvataju protoonkogene kao što su geni za Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) i Myelocytomatosis oncogene cellular homolog (*MYC*). Jednostavne, recipročne translokacije kod karcinoma bronha su relativno retke, do sada je potvrđena uloga samo jedne takve translokacije – t (15;19). Aletarcije mikrosatelitskih polimorfnih repetitivnih sekvenci su čest tip hromozomske nestabilnosti i nalaze se u 35% mikrocelularnih karcinoma bronha – small cell lung cancer (SCLC) i 22% nemikrocelularnih karcinoma bronha – nonsmall cell lung cancer (NSCLC).

Klinička slika karcinoma bronha kod nepušača se znatno razlikuje od iste u pušača. Adenokarcinom je dominantni patohistološki tip karcinoma bronha u nepušača. Kod pacijenata mlađih od 40 godina je to takođe najčešći patohistološki tip karcinoma bronha sa diproporcionalno visokom stopom među nepušačima. Kod pušača je adenokarcinom bronha lokalizovan centralno i periferno, dok se kod nepušača nalazi periferno. Karcinom bronha je češći u ženskoj populaciji nepušača u odnosu na populaciju muškaraca. U jugoistočnoj Aziji preko 80% žena koje imaju karcinom bronha su nepušači u odnosu na 15% u Sjedinjenim Američkim Državama. Karcinom bronha kod nepušača javlja se u ranijoj životnoj dobi u jugoistočnoj Aziji u poređenju sa SAD i Evropom gde se karcinom bronha nepušača dijagnostikuje u istoj životnoj dobi kao kod pušača.. Studije pokazuju da se kod nepušača karcinom prezentuje u odmaklijem stadijumu ali je preživljavanje, kao nezavistan prognostički faktor, duže (48,49).

Velik broj genetskih molekularnih abnormalnosti stoji u vezi sa karcinomom bronha što prikazuje i Tabela 3.

*Tabela 3 . Najčešće molekularne abnormalnosti u SCL i NSCLC*

<b>Abnormalnosti</b>	<b>SCLC</b>	<b>NSCLC</b>
Mikrosatelitska nestabilnost	~35%	~22%
Autokrine petlje	GRP/GRP receptor, SCF/KIT	TGF- $\alpha$ , EGFR, heregulin/HERneu, HGF/MET
RAS mutacija	<1%	15-20%
EGFR mutacija		<10% (EU, SAD)
	<1%	~40% Azija
Overekspresija MYC familije	15-30%	5-10%
P53 inaktivacija	~90%	~50%
RB inaktivacija	~90%	15-30%
<b>Abnormalnosti</b>	<b>SCLC</b>	<b>NSCLC</b>
p16 INK4A inaktivacija	0-10%	30-70%
FHIT inaktivacija	~75%	50-75%
RASSF1A inaktivacija	~90%	~40%
SEMA3B inaktivacija	~90%	~75%
BCL2 ekspresija	75-95%	10-35%

EGFR – epidermal growth factor receptor; FHIT – fragile histidine triad; GRP gastrin-releasing peptide; HGF – hepatocyte growth factor; RB – retinoblastoma protein; SCF – stem cell factor; TGF- $\alpha$  transforming growth factor alpha

Polimorfizam u drugim DNK „repair“ genima, kao što su: excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1), X-ray repair cross-complementing protein 1(XRCC1), excision repair crosscomplementing rodent repair deficiency, complementation group 5, XPG, xeroderma pigmentosum, complementation group G (ERCC5/XPG), stoji u korelaciji sa redukcijom formiranja PAH-DNA (Polycyclic Aromatic Hydrogencarbonate-DNA) što dovodi do smanjenja rizika za nastanak karcinoma bronha (50). Aberantna hipermetilacija DNA na citozinske rezidue unutar citozin-fosfat-gvanin (CpG) ostrvaca koja su grupisana oko većine genskih promotora predstavlja alternativni put mutacijama u prigušivanju efekta TSG. p16 INK4A i RASSF1A su primeri ciljnih TSG koji su veoma često suprimovani kod karcinoma bronha (51). Promotori brojnih drugih gena takođe podležu aberantnoj hipermetilaciji u karcinomu bronha, između njih najznačajniji su „death-associated“ protein kinaza, E-kadherin (CDH1), O6-metilgvanin-DNA metiltransferaza (MGMT), glutation-S-transferaza (GSTP1),  $\beta$ 2 receptor retinoične kiseline (52).

Otkriće preko 200 različito metiliranih CpG ostrvaca u DNK ćelija adenokarcinoma bronha sugerše da postoji još veliki broj ciljnih gena koji mogu potpasti pod epigenetsku inaktivaciju putem hipermetilacije (53). Metilirane sekvence DNK mogu se detektovati u telesnim tečnostima, serumu, bronhoskopskim uzorcima i sputumu i stoga mogu imati ulogu kako u dijagnostici tako i u prognostici terapijskog odgovora i preživljavanja kod karcinoma bronha (54). Povezivanje hipermetilacije promotora gena p16 INK4A koja dovodi do supresije TSG, sa određenim histološkim promenama u ranim fazama maligne transformacije ćelija skvamoznog karcinoma bronha ukazuje na potencijalnu ulogu ovog puta u inicijalnoj malignoj transformaciji ćelija (55).

Postoje i drugi epigenetski (genomički) mehanizmi koji mogu stajati u osnovi karcinogeneze karcinoma bronha, najproučeniji su deacetilacija histona, gubitak imprintinga ili hipometilacija promotora (56,57). Nakon definisanja nekog od ovih puteva, i određivanjem epigenetskih „targeta“, može se planirati neka buduća strategija u lečenju karcinoma bronha. Reverzni metilirajući agensi, kao što je decitabin u kombinaciji sa hemiterapijom ili sami, odnosno dodati u neoadjuvantnom ili adjuvantnom prokolu lečenja mogli bi u budućnosti imati značajniju ulogu u lečenju. Hipometilacija u regionu promotora IGF-2 (insulin like growth factor 2), PEG1/MEST gena kao i gena H19 identifikovana kod karcinoma bronha, sugerše da aberantna metilacija ne samo što dovodi do prigušivanja TSG već može dovesti i do reaktivacije onkogeni (58).

Blanco 2009. godine objavljuje studiju koja se uzima kao temeljna studija molekularne genetike karcinoma bronha. U njoj je potvrđeno da 98% ćelijskih linija karcinoma bronha ima

alteraciju u barem jednom od navedenih gena: TP53 (79%), CDKN2A (59%), RB1 (35%), STK11 (27%), MYC familija (20%), KRAS (817%), PTEN (11%), PIK3CA (8%), EGFR (7%), NRAS (6%), MET (5%), BRAF (2%), HER2 (2%), itd. Interesantno je što i u ćelijskim linijama iz ove studije EGFR, HER2, BRAF, KRAS i NRAS predominantno postoje kod adenokarcinoma. PIK3CA je podjednako prisutan i kod NSCLC i SCLC. Pojedinačne mutacije bile su prisutne u 28% ćelijskih linija karcinoma bronha, po dve mutacije nađene su u 26% linija dok je prisustvo tri paralelne mutacije potvrđeno u 3% ćelijskih linija. Ovaj zaključak je od velikog kliničkog značaja za buduću dijagnostiku karcinoma bronha (59).

#### 1.1.4. FAKTORI RASTA I NJIHOVI ONKOGENI

Faktori rasta mogu stimulisati ili inhibirati ćelijsku deobu. To su signalizirajuće molekule koje kontrolišu ćelijsku proliferaciju preko specifičnih receptora. Načešće deluju kao signali za ćelijsku deobu i rast malignih ćelija ili kao stimulatori razvoja novih krvnih sudova-stimulatori angiogeneze (60). Faktori rasta koji kontrolišu nastanak i rast mikrocelularnog karcinoma bronha su: bombenzin, bradikinin, holecistokinin, galanin, gastrin, granulocitni kolonostimulirajući faktor rasta, granulocitno-makrofagni kolonostimulirajući faktor rasta, faktor matične ćelije, inzulinu sličan faktor rasta I, neurotenzin, opioidni peptidi, testosteron, transferin, vazopresin, vazoaktivni intestinalni polipeptid, fizalemin, somatostatin, tahikinin. Za nemikrocelularni karcinom bronha to su: bombenzinu slični peptidi, epidermalni faktor rasta, hemopoetski kolonostimulirajući faktori, inzulinu sličan faktor rasta I, paratireoidnom hormonu slični peptidi, trombocitni faktor rasta, vazoaktivni intestinalni polipeptid (61).

**K-ras onkogeni** - Jedan od prvih gena čija je mutacija ispitivana u karcinomu bronha bio je K-ras onkogen. Prvi put je pronađen u genomu virusa koji dovode do nastanka animalnih sarkoma. Ova grupa onkogeni sadrži i H-ras i N-ras onogene. Oni kodiraju proteine koji se dalje vežu za gvanin nukleotide koji hidrolizuju gvanin trifosfat (GTP) u gvanozin difosfat (GDP). Ovi proteini postoje u dva oblika: **aktivnom**, kada je GTP vezan za molekul i kada se signal prenosi dalje i **inaktivnom** obliku kada je GTP hidrolizovan u GDP. Događaj koji pretvara normalan RAS gen u onkogen je **tačkasta mutacija** i ona dovodi do gubitka sposobnosti hidrolize GTP i time p21ras ne može preći u inaktivno stanje, te nastaje



**konstantni prenos mitogenog signala čime su stvoreni uslovi za malignu transformaciju ćelije.** K-ras pozitivni bolesnici imaju time negativan prognostički faktor u daljem toku bolesti (62).

**MYC onkogeni - amlifikacija** - U karcinomu bronha postoji DNA amplifikacija MYC familije gena. Ova familija gena predstavlja onkogene koji su homolozi retrovirusima. Oni kodiraju kratkoživeće fosfolipide koji regulišu transkripciju gena. DNA amplifikacija MYC gena nalazi se i u NSCL i SCLC. Takođe se češće javlja u bolesnika tretiranih hemioterapijom u odnosu na netretirane, što ukazuje na činjenicu da se ova amplifikacija odvija u kasnoj fazi kancerogeneze (63).

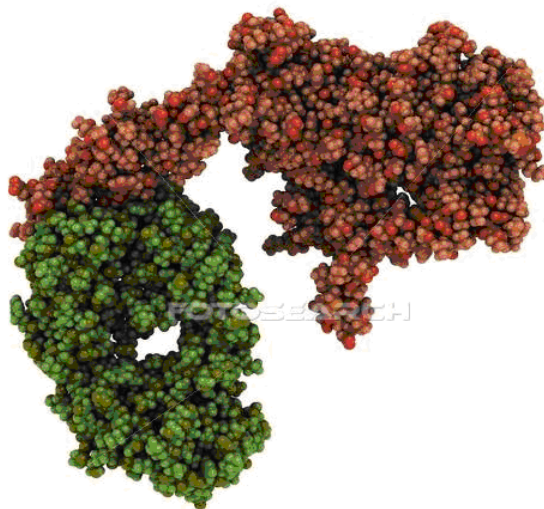
**Tumor supresor geni - p53** je nukleusni fosfoprotein koji je kodiran na kraćem kraku 17-og hromozoma. To je ujedno i jedan od najčešće izmenjenih gena u tumorima. Gubitak, odnosno mutacije p53 gena, menjaju prolazak ćelije kroz mitotsku fazu ćelijskog ciklusa. Time dolazi do replikacijskih greški, mutacije i maligne transformacije prethodno normalne ćelije. Oko 75% p53 mutacija čini G-T tansferzija (G:C-T:A). Mutacije p53 gena su prisutne u oko 50% skvamoznog karcinoma bronha, 35% adenokarcinoma i u oko 90% mikrocelularnog karcinoma bronha. Najčešći tip mutacije je tačkasta mutacija, oko 40% (64).

**Rb gen** kodira nukleusni fosfoprotein i njegov produkt kontroliše ćelijski ciklus u G1 fazi. On se nalazi na dužem kraku 13-og hromozoma. Funkcija mu je antiproliferativna. Rb inaktivacija u tumorima nastaje kroz gubitak jednog alela (gubitak heterozigotnosti-LOH) i mutacijom drugog alela.

### **PROTO-ONKOGENI: RECEPTOR EPIDERMALNOG FAKTORA RASTA (EGFR)**

EGFR familija je jedna od najviše izučavanih familija u pogledu molekularne ciljane terapije kod NSCLC. EGFR (takođe poznat i kao HER1 i ErbB1) je transmembranski receptor tirozin kinaze (TK) koji indukuje ćelijsku proliferaciju i odgovoran je za rezistenciju na hemioterapiju i radioterapiju. Molekularna struktura prikazana je na slici 1. Poznata su 4 podtipa transmembranskih receptora za faktore rasta: EGFR, HER 2, HER 3 i HER 4. Kada se ligand veže za ekstracelularni domen (slika 2.) EGFR veže se sa još jednim EGFR stvarajući homodimer, ili se veže sa nekim od HER receptora stvarajući heterodimer.

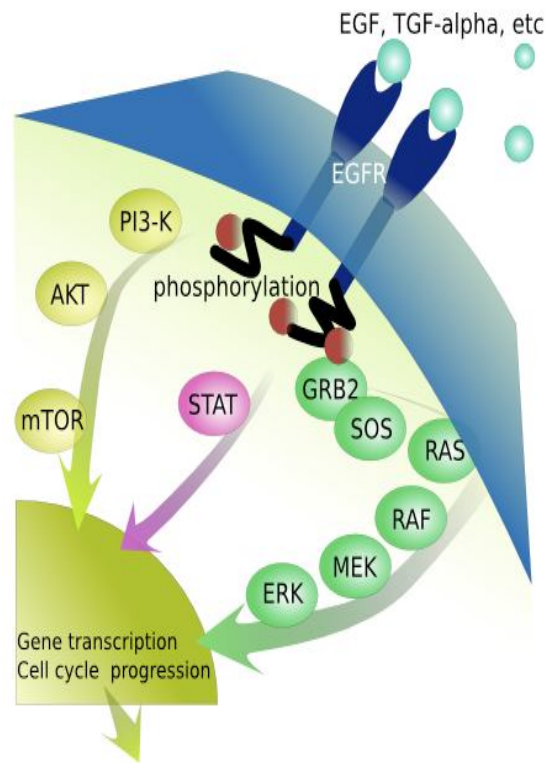




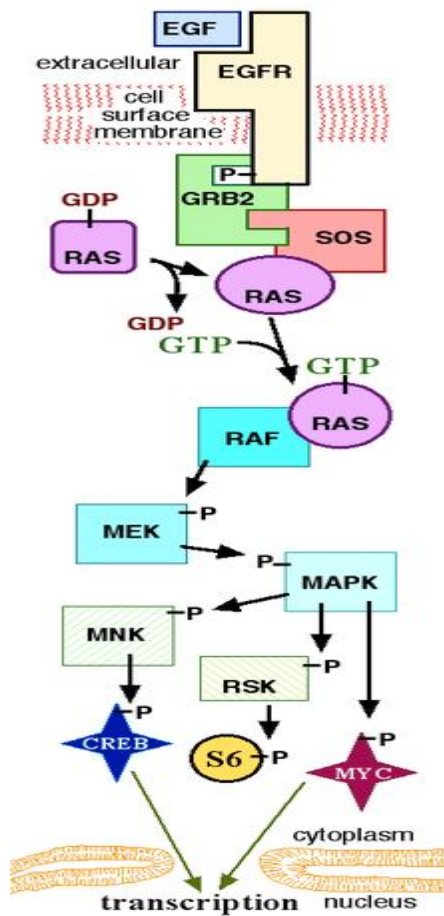
*Slika2. Molekularna struktura ekstracelularnog domena receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (Her2, Neu, CD340) sa fragmentom trastuzumab-a*

Aktivacija EGFR dovodi do aktivacije dva osnovna puta u karcinogenezi solidnih tumora: PI3K/AKT/mTOR signalni put koji igra glavnu ulogu u kontroli apoptoze (slika 3.) i RAS/RAF/MEK/MAPK signalni put (slika 4.) ili put mitogen-aktiviranih kinaza važan za proliferaciju ćelija. Ova dva puta kada su zajedno aktivirani kontrolišu proliferaciju malignih ćelija, ćelijski rast, invaziju, metastatski potencijal, apoptozu i tumorsku angiogenezu (65). Detekcija proteina EGFR-a imunohistohemijskim metodama zavisi od nivoa antitela korištenih za određivanje granične vrednosti EGFR pozitivnosti. Sa druge strane, tačniju prediktivnu vrednost ima određivanje (aktivisanih) mutacija na EGFR genima i njihov broj. EGFR mutacije su češće kod žena, poreklom iz Jugoistočne Azije, nepušača sa adenokarcinomom pluća što objašnjava obrazac odgovora na inhibiciju tirozin-kinaza inhibitorima i naglašava značaj detekcije ovih mutacija kao predvidljivog odgovora na ove lekove (66-68).

Ovi signalni sistemi mogu se blokirati pomoću inhibitora na nekoliko nivoa: 1) na ekstracelularnom domenu EGFR pomoću monoklonalnih antitela (cetuximab), 2) na intracelularnom domenu tirozin kinaze pomoću inhibitora tirozin kinaze (TKIs) (erlotinib, gefitinib, vandetanib), 3) na nivou Raf kinaze pomoću inhibitora multikinaza (sorafenib).



Slika 3. PI3K/AKT/mTOR nishodni put signalizacije koji se pokreće vezivanjem liganda na EGFR



Slika 4. RAS/RAF/MEK/MAPK signalni put ili put mitogen-aktiviranih kinaza važan za proliferaciju ćelija

## ***EGFR antitela***

Imunohistohemijska (IHC) detekcija ekspresije proteina EGFR pokazuje različite rezultate u smislu pronalaženja potencijalnih prediktivnih biomarkera kao EGFR ciljne (target) terapije pri čemu je u First-Line Erbitux in Lung Cancer-FLEX studiji Cetuximab (Erbitux) kao IgG1 monoklonalno antitelo koje se veže za EGFR i kompetitivno inhibira vezivanje liganda (npr. EGF) ispitivan u prvoj liniji hemioterapije uznapređovalog NSCLC (69). Ispitivanje je sprovedeno na 1125 ispitanika koji su randomizovani u ispitivanu grupu koja je primala Cetuximab kao prvu liniju hemioterapije i kontrolnu grupu koja je primala hemioterapiju po protokolu Cisplatin/Vinorelbin. U ovoj studiji nije bilo značajnog poboljšanja PFS ali je odgovor na terapiju (response rate – RR) bio značajno veći u grupi koja je dobijala cetuximab (36% naspram 29%,  $p=0.01$ ). Faza III BMS-099 studije koja je imala 676 ispitanika komparirala je grupu ispitanika koja je primala Cetuximab sa grupom ispitanika koja je uz to antitelo primala hemioterapiju po protokolu Carboplatin/Taxan. Nije postojala signifikantna razlika u ukupnom preživljavanju (overall survival-OS) (9.69 vs 8.38 meseci; HR, 0.789; 95% CI, 0.754–1.051;  $P = 0.1685$ ). Komparirajući rezultate ovih i sličnih studija kombinacija cetuximaba i platinskog režima preporučena je od strane National Comprehensive Cancer Network (NCCN) smernica, kao kategorija 2B u prvoj liniji kod EGFR pozitivnog adenokarcinoma bronha INC detekcijom (70).

## ***EGFR tirozin kinza inhibitori (TKI)***

EGFR TKI – tirozin kinazni inhibitori, kao cilj imaju intracelularni TK domen EGFR, blokirajući na taj način nishodni deo signalnog puta receptora. Gefitinib i Erlotinib su prva generacija EGFR TKI. To su oralno raspoloživi sintetski anilinokvinazolini koji selektivno i reverzibilno sprečavaju vezivanje i autofosforilaciju adenozin trifosfata (ATP) EGFR tirozin kinaze (71). Inhibicija EGFR pomoću TKIs kod NSCLC ima efekta kod 10-20% pacijenata. Najveći benefit imaju osobe ženskog pola, nepušači i osobe poreklom iz Jugoistočne Azije sa adenokarcinomom bronha. Tip mutacija koje su prisutne u tumorskim ćelijama takođe ima veliki prediktorski značaj u odgovoru na terapiju. Smatra se da su najznačajnije delecija egzona 19 i mutacija egzona 21, sa ipak većim značajem delecije 19 (72). S druge strane egzom 20 T790M mutacija je glavni nosioc rezistencije na EGFR TKI.

Analizirane sve zajedno, velike faza III kliničke studije podržavaju upotrebu EGFR TKI kao terapiju izbora u prvoj liniji hemioterapije kod bolesnika sa EGFR mutacijom u IIIB i IV stadijumu karcinoma bronha. Američko udruženje kliničkih onkologa (American Society

of Clinical Oncology – ASCO) u svojim kliničkim smernicama iz 2009. godine preporučilo je upotrebu gefitiniba u prvoj liniji hemioterapije kod bolesnika sa EGFR mutacijom i uznapredovalim NSCLC. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) je takođe preporučilo upotrebu erlotiniba ili gefitiniba u istoj indikaciji. Oba udruženja kod bolesnika koji nemaju EGFR mutaciju preporučuju upotrebu konvencionalne hemioterapije bazirane na platinskim derivatima u prvoj liniji lečenja uznapredovalog NSCLC (73).

### **RAS/RAF/MEK/MAPK aktivacioni put**

RAS (RAAt Sarcoma) familija proteina i onkogeno otkrivena je kod životinja preko retrovirusa uzročnika karcinoma kodiranog sa tri gena; H- (ili Ha) RAS, K- (ili Ki) RAS i N-RAS. Sva ova tri gena bivaju mutirana u humanim malignitetima i dovode aktivirane proteine signalnog puta u konstantno GTP „aktivno“ stanje. RAS geni kodiraju G proteine nishodnog puta receptora tirozin kinaza, kao što je EGFR. Vezivanje liganada na EGFR dovodi do niza konformacionih promena koje uslovljavaju aktiviranje RAS. Aktivirani RAS pokreće RAF proteine na ćelijsku membranu i fosforiliše ih. Na taj način pokreće se serin-treonin kinazna aktivnost sa posledičnom fosforilacijom MEK1/MEK2 dual specifičnih protein kinaza koje aktiviraju ERK1 i ERK2-mitogen-aktivirajuće protein kinaze (MAPK). Ovo rezultira translokacijom u nukleusu. Aktivacija ovog puta kontroliše rast ćelija, ćelijsku diferencijaciju i apoptozu (74-77).

Nekoliko novih target lekova koji inhibišu elemente ovih puteva, testiraju se u kliničkim ispitivanjima. Sorafenib (multipli TKI, inhibitor Raf-kinaza, receptora trombocitnog faktora rasta PDGFR - platelet derived growth factor receptor, receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 i 3 - VEGFR 2 i 3); Trametinib (selektivni inhibitor MEK1), Pimasertib i Selumetinib (selektivni inhibitor MEK1/2).

### **KRAS**

KRAS (Kristen rat sarcoma) je protein koji je član RAS familije proteina i predstavlja važan nishodni signalni put za EGFR (78). Mutacije KRAS gena postoje u oko 15-20% NSCLC slučajeva (79). U metastatskog kolerakalnog carcinoma, KRAS status ima signifikantnu prediktivnu vrednost jer je dokazana klinička korist. Terapija u kojoj je primenjivan cetuximab pokazala je velik limit kod pacijenata sa KRAS wild-type tipom genotipa tumora, kada je primenjivan cetuximab. Nasuprot tome, KRAS mutacija nije prediktor uspeha terapiji cetuximab-om kod NSCLC. U SWOG faza II trajalu, KRAS mutacije nisu pokazale prediktivnu vrednost ni u OR (objective response), ni u PFS (progression free survival) ili OS (overall survival) kod pacijenata sa NSCLC koji su primali

terapiju sa cetuximab-om . Slični rezultati prikazani su i u BMS-099 studiji, kao i u FLEX studiji (80). Rezultate ovih studija je veoma teško tumačiti uglavnom zbog velikih razlika u ispitivanoj histologiji i stadijumu karcinoma bronha ali i relativno malog uzorka u studijama (81).

Meta analize su pokazale da je KRAS mutacija češća kod adenokarcinoma u odnosu na ostale histološke tipove karcinoma bronha ( $p < 0.01$ ) i kod pušača u odnosu na nepušače i bivše pušače ( $p < 0.01$ ). KRAS mutacija često se povezuje sa rezistencijom na EGFR inhibitore i hemioterapiju. TRIBUTE studija, faza III u kojoj su bolesnici sa uznapredovalim NSCLC randomizovani da primaju hemioterapiju ili hemioterapiju sa erlotinibom u prvoj liniji, pokazala je da kod bolesnika sa KRAS mutacijom (bilo ih je 21%) koji primaju kombinovanu terapiju postoji značajno smanjenje PFS i OS (82). U cilju boljeg razumevanja uloge KRAS mutacije u rezistenciji na EGFR TKI urađena je meta analiza koja je postigla udruženu senzitivnost 21% i specifičnost 94% u predikciji kliničkog odgovora na EGFR TKI u odnosu na KRAS mutacioni status (83). Ovi podaci sugerišu da je malo verovatno da će doći do terapijskog odgovora na EGFR TKI kod bolesnika sa KRAS mutacijom, te da je stoga u ovakvim slučajevima najbolje primeniti non-EGFR TKI terapijski protokol. Kod bolesnika sa wild-type KRAS neophodno je pronaći neki drugi biomarker koji bi u ovoj populaciji mogao poslužiti kao prediktor odgovora na EGFR TKI. Iz svih ovih razloga jasno je da nije moguće utvrditi da li je KRAS mutacija nezavisni prognostički faktor ili prediktivni faktor u terapiji NSCLC. (84).

## **ALK, MET I LKB1 - NOVI BIOMARKERI**

### **EML4-ALK translokacija**

Kinaza anaplastičnog limfoma (ALK) je član superfamilije insulinskih receptora tirozin kinaze i normalno je prisutna u ćelijama centralnog nervnog sistema, tankog creva i testisa. EML4-ALK translokacija nalazi se u 3-6% slučajeva NSCLC. Ovi tumori su češći u adenokarcinoma, mlađih bolesnika, muškaraca i nepušača sa NSCLC, pacijenata bez prisutne EGFR i KRAS mutacije i pacijenata koji nisu EGFR TKI responderi (85). ALK genska translokacija [t(2;5)(p23;q35)] originalno je pronađena u podgrupi anaplastičnih krupnoćelijskih limfoma 1994. godine. Translokacija dva gena na kratkom kraku hromozoma 2 između C-terminalnog kinaznog domena ALK i N-terminalnog dela EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like4) nađena je 2007.godine kod bolesnika sa NSCLC u Japanu. Ova translokacija uzrokuje aberantnu aktivaciju nishodnih signalnih puteva (86-91).

ALK genska translokacija [t(2;5)(p23;q35)] originalno je pronađena u podgrupi anaplastičnih krupnoćelijskih limfoma 1994. godine. Translokacija dva gena na kratkom kraku hromozoma 2 između C-terminalnog kinaznog domena ALK i N-terminalnog dela EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like4) nađena je 2007.godine kod bolesnika sa NSCLC u Japanu. Ova translokacija uzrokuje aberantnu aktivaciju nishodnih signalnih puteva kao što su MAP kinaza, PI3-kinaza, signalni provodnici i aktivatori transkripcije (STAT) što dovodi do proliferacije, invazije i inhibicije apoptoze (80-85).

## **MET**

MET (mesenchymal - epithelial transition factor) receptor ili HGF (hepatocyte growth factor receptor) i njegov ligand HGF pokreću ključne intracelularne signalne kaskade. MET kinaza je odgovorna za ćelijsku proliferaciju, invaziju, migraciju i angiogenezu. Disregulacija HGF/MET signalnog puta može nastati usled prekomerne ekspresije HGF-a ili MET-a, amplifikacije MET gena i mutacija (86-88).

MET amplifikacija postoji u oko 5 % NSCLC, povezana je sa lošijom prognozom, a dokazano je da pojačava invazivnost, angiogenezu i preživljavanje u modelima kancerskih ćelija (89). Ćelije ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća sa visokim nivoom MET amplifikacije su veoma osetljive na tretman sa PHA665752 – selektivni inhibitor MET kinaze. Kod 22% NSCLC kod kojih je bila prisutna MET amplifikacija potvrđena je otpornost na EGFR TKI. Takođe je nađeno da ova amplifikacija dovodi do otpornosti na gefitinib, a cMET TKI ponovo uspostavlja osetljivost na gefitinib (90). Novi lekovi za zaustavljanje MET signalnog puta koji su u fazi ispitivanja su: ficlatuzumab (monoklonalno antitelo na HGF), XL 184 (multipli TKI: MET, VEGFR2, i RET inhibitor) i tivantinib (selektivni cMET inhibitor).

Crizotinib je oralni, dvostruki ALK/MET inhibitor registrovan u terapiji EML4-ALK translokacija pozitivnih adenokarcinoma bronha u prvoj liniji lečenja. Crizotinib je kod ALK pozitivnih adenokarcinoma (od kojih je 71% primilo terapiju u prvoj liniji) pokazao izuzetno dobru efikasnost. Američka administracija za hranu i lekove već nakon II faze istraživanja odobrila je crizotinib za rutinsko lečenje ALK pozitivnog adenokarcinoma. Nova generacija HSP90 inhibitora kao što je ganetespib pokazala je takođe efikasnost kod ALK pozitivnih adenokarcinoma (91).

## **LKB1**

LKB1 je serin/treonin kinaza (ranije poznata kao STK11). Mutacija u LKB1 genu je prvi put otkrivena 1997.godine kao mutacija na hromozomu 19p13.3 odgovorna za Peutz-Jeghers sindrom (PJS), retku naslednu bolest. Bolesnici sa PJS su podložni mnogim vrstama



karcinomima različitih organa, ali najčešće ispitivan je u karcinomima gastrointestinalnog trakta.

LKB1 mutacija je ispitivana i kod ne-sitnoćelijskog karcinoma bronha, sa najvećom stopom mutacija kod adenokarcinoma. Za LKB1 se smatra da deluje kao tumor supresor gen preko interakcije sa p53 i CDC42 tako što modulira aktivnost AMP (AMP-aktivirana protein kinaza). Druge osobine LKB1 kao tumor supresor gena bi mogle biti inhibicija mTOR, regulacija ćelijske polarnosti, inhibicija ćelijskog ciklusa i aktivacija p53. Ji et al. objavili su da delecija LKB1 zajedno sa KRAS mutacijom u karcinomu bronha povećava invazivnost, diferencijaciju i sposobnost metastaziranja. Takođe su objavili da postojanje samo mutacije u LKB1 (bez KRAS mutacije) kod miševa ne dovodi do razvoja karcinoma pluća (92).

### **RECEPTOR INSULINU SLIČNOG FAKTORA RASTA TIP 1 (IGF-1R)**

Insulinu sličan faktor rasta tip 1 (IGF-1) i njegov receptor (IGF-1R) su jedan od novih ciljeva molekularne terapije karcinoma bronha. IGF-1R je eksprimovan kod velikog broja humanih maligniteta uključujući i NSCLC. Aktiviranjem ovog receptora pokreće se nishodna signalna kaskada koja podrazumeva aktiviranje RAS/RAF/MAP kinaznog sistema koji aktivira proliferaciju i PI3K signalnog puta koji inhibira apoptozu. U nekim malignim ćelijama IGF-1R je trajno aktivan uzrokujući na taj način konstantnu aktivnost oba nishodna signalna sistema.

Farmakološki pristup inhibicije IGF-1R podrazumeva upotrebu malih IGF-1R tirozin kinaza inhibitora i monoklonalnih antitela usmerenih na IGF-1R. Figitimubab je jedno od prvih razvijenih monoklonalnih antitela specifično usmerenih na IGF-1R. U ranim kliničkim fazama ovo antitelo je pokazalo veoma dobre rezultate u smislu odgovora na terapiju naročito kod bolesnika sa skvamoznim karcinomom bronha ali sledstvene kliničke studije nisu uspele da dokažu ovaj benefit kod bolesnika sa NSCLC (93,94).

Mikrocelularni karcinom oslobađa čitav niz faktora rasta, a najvažniji su angiotenzin, faktor rasta sličan insulinu (Insulin like growth factor – IGF), serotonin, supstanca p, vazopresin i gastrin oslobađajući peptidi (bombezin). Ovi peptidski signalni molekuli se ponašaju kao ligandi sa visokim afinitetom na receptore membrana tumorskih ćelija, koji mogu dovesti do pokretanja velikog broja signalnih intracelularnih sistema i dalje sinteze brojnih pro-tumorskih supstanci. Terapije usmerene na inhibiciju transmembranskih signalnih sistema ili blokadu receptora ćelija SCLC ne daju značajne rezultate. Prevažodno zbog činjenice da u regulaciji karcinogeneze, maligne transformacije, rasta, deobe, ćelijske smrti i neoangiogeneze kod SCLC učestvuje paralelno ogroman broj receptorskih i pod-receptorskih sistema.

### **1.1.5. TUMORSKA ANGIOGENEZA**

Tumorska angiogeneza je osnova za rast tumora i pojavu metastaza i stoga je postala zanimljiva u cilju ispitivanju novih terapijskih opcija kod NSCLC. Glavni deo angiogeneze tumora dešava se upravo u tumorskom tkivu, pa je osnovni postulat u istraživanju blokade neoangiogeneze upravo u velikom anti-tumorskom efektu sa malim neželjenim efektima.

Angiogeneza je kompleksan proces koji još uvek nije potpuno razjašnjen. Vaskularni endotelni faktor rasta VEGF (vascular endothelial growth factor) deluje preko receptora-VEGFR. VEGFR se sastoji iz tri receptorske jedinice: VEGFR1 čija uloga u malignoj neoangiogenezi nije sasvim jasna pri čemu podjedinica ima deset puta veći afinitet za vezivanje VEGF od ostalih delova receptora, ali ima mali potencijal prenošenja (transdukcije) signala. VEGFR2 je centralni signalni receptor odgovoran za celokupni angiogenetski efekat dok je VEGFR3 odgovoran limfangiogenezu. VEGF sintetišu i sekretuju maligne ćelije pa se smatra da uglavnom deluje parakrino na vaskularne endotelne ćelije. Međutim, VEGF mogu da sekretuju i druge ćelije i taj VEGF može da se veže za druge receptore i tako utiče na neoangiogenezu „zaobilaznim“ putem (95).

Visoka koncentracija VEGF u serumu bolesnika i uzorcima tumora kod karcinoma bronha predstavlja loš prognostički faktor i ukazuje na loše preživljavanje bolesnika sa NSCLC. U ispitivanjima primena monoklonalnih antitela usmerenih na blokadu VEGFR, kao što je bevacizumab, dala su povoljne rezultate u preživljavanju do progresije (PFS – progression free survival) kod bolesnika sa NSCLC. Velike multicentrične internacionalne studije pokazale su veću efikasnost hemioterapije u kombinaciji sa bevacizumabom u terapiji uznapredovalog karcinoma bronha, nasuprot kombinovanju TKIs kod kojih nije postojao takav rezultat. Postoji pretpostavka da antiangiogenetski lekovi poboljšavaju snabdevanje tumora krvlju, a samim tim i dopremanje citostatika do tumorskog tkiva putem vaskularne normalizacije, ostavljajući zrele krvne sudove otvorenim i prohodnim, a obliterišući male nezrele krvne sudove, što sve poboljšava efektivni protok krvi kroz tumor. Međutim sam proces dejstva inhibitora VEGFR još uvek nije sasvim jasan, jer visoka koncentracija VEGF u tumorskom tkivu znači lošu prognozu, a u tkivu strome tumora dobru. Samim tim u nekim situacijama VEGF deluje antitumorski ali u drugim ima obrnuto dejstvo (96,97).

### **1.1.6. KLINIČKA SLIKA KARCINOMA BRONHA**

Bolje razumevanje i poznavanje simptoma, odnosno kliničke slike karcinoma bronha važna je za bolje razumevanje ove bolesti, pomaže bržem i tačnijem postavljanju dijagnoze bolesti i omogućava primenjivanje najboljeg terapijskog režima. Takođe je važno istaći, da ne postoje karakteristični simptomi na osnovu kojih bi se odmah pomislilo na karcinom bronha,



što još više otežava ranu dijagnostiku ove bolesti. Prvi simptomi bolesti koji po pravilu dovode pacijenta kod lekara ne znače uvek i početak bolesti jer u trenutku kada se pojave prvi simptomi, karcinom je obično već proširen na okolne strukture (98). Simptomi koji se javljaju kod bolesnika sa karcinomom bronha mogu biti simptomi usled primarnog rasta karcinoma bronha, usled centralne, endobronhijalne ili periferne lokalizacije; simptomi usled regionalnog širenja tumora unutar grudnog koša direktnim zahvatanjem okolnih struktura, simptomi usled metastaziranja u regionalne limfne čvorove, simptomi usled ekstratorakalnog širenja, odnosno udaljenih metastaza i simptomi paraneoplastičnog sindroma. Karcinom bronha se može razviti centralno ili periferno. Periferna lokacija tumora je veoma često asimptomatska sve dok tumor ne dostigne određenu veličinu i dovede do razvoja simptoma bilo svojom veličinom, nekrozom ili zahvatanjem okolnih struktura, za razliku od centralnih tumora, koji se ranije ispoljavaju kliničkim simptomima i znacima.

**Lokalni simptomi bolesti su:** KAŠALJ; KRV U ISPLJUVKU - HEMOPTIZIJE; BOL U GRUDNOM KOŠU; NEDOSTATAK VAZDUHA – DISPNEA.

KAŠALJ je najčešći simptom karcinoma bronha i javlja se u oko 45-75% obolelih. Može biti produktivan i neproduktivan i bolesnici često ne obraćaju pažnju na njega smatrajući ga za „normalan-pušački kašalj“. Kašalj često prestaje posle nekoliko dana i javlja se ponovo nakon izvesnog vremena, tako da može imati intermitentni karakter. Uz kašalj može i ne mora postojati i udružena infekcija. Sam kašalj može biti uzrokovan nadražajem tusigenih zona, mehaničkim nadražajem endoluminalnih i extraluminalnih tumora, edemom i hiperemijom sluznice respiratornog trakta. Treba napomenuti da periferni tumori mogu da narastu do velikih dimenzija, a da ne uzrokuju kašalj.

HEMOPTIZIJE. Skoro trećina bolesnika sa karcinomom bronha se javlja lekaru zbog hemoptizija. Karcinom bronha je uzrok u 20% svih slučajeva hemoptizija. Iz tog razloga kod bolesnika sa hemoptizijama treba sumnjati na karcinom bronha sve dok se radiografski, bronhoskopski ili nekim drugim metodama ova bolest ne isključi. Količina krvi je obično minimalna ali može biti i veća ukoliko postoji ruptura krvnog suda.

BOL U GRUDNOM KOŠU se javlja u oko polovine bolesnika sa karcinomom bronha. Mada je plućni parenhim neosetljiv na bol, peribronhijalni nervi mogu biti odgovorni za nastanak bola, najverovatnije putem n. vagusa. Bol koji se javlja usled rasta primarnog tumora je najčešće usled zahvatanja perivaskularnih i peribronhijalnih nerava i obično je tup, intermitentan i slabo lokalizovan, a pojačava se dubljim udahom ili kašljanjem. Posebna vrsta bola javlja se kod takozvanog Pancoast sindroma, kada je tumor lokalizovan u regiji gornjeg plućnog polja pri čemu zahvata visceralnu i parijetalnu pleuru i regiju plexus brachialis. Bol

je veoma intenzivan, širi se u ruku ili se širi prema lopatici i često je prvi simptom bolesti, a neretko biva shvaćen kao simptom neuromišićnog porekla i pacijenta vodi na dugotrajno bezuspešno lečenje od strane fizijatra.

DISPNEA predstavlja subjektivni osećaj nedostatka vazduha i može biti povezana i sa drugim plućnim bolestima kao što su hronična opstruktivna plućna bolest ili fibroza pluća. Ona je kod karcinoma bronha najčešće izazvana opstrukcijom centralnim tumorima ali se javlja i kod perifernih tumora zbog restrikcije koja je uzrokovana prisustvom pleuralnog izliva ili zbog prisustva bola.

**Simptomi regionalnog širenja bolesti.** Širenje karcinoma bronha može biti u regionalne limfne žlezde, medijastinalne strukture kao i direktno širenje u okolne strukture grudnog koša. Time se razvijaju sledeći simptomi i znaci bolesti:

Zahvatanje NERVUS RECURENSA koje dovodi do promuklosti i disfagije, zahvatanje N. FRENICUSA dovodi do paralize dijafragme i dispnee, zahvatanje CERVIKALNIH simpatičkih nerava, odnosno brahiocefaličkog spleta kod Pancoast tumora koje dovodi do HORNEROVOG SINDROMA (mioza, ptoza i enoftalmus), zahvatanje OSMOG CERVIKALNOG i PRVOG TORAKALNOG NERVA dovodi do ularnog bola i vazomotornih znakova. Vaskularni znaci se javljaju usled zahvatanja srca i velikih krvnih sudova i to su znaci:

SINDROM GORNJE ŠUPLJE VENE koji se najčešće javlja kod mikrocelularnog karcinoma bronha, a manje kod skvamoznog karcinoma, nastaje bilo usled kompresije, bilo usled direktnog zahvatanja gornje šuplje vene tumorom s desne strane. Subjektivno se javljaju znaci nedostatka vazduha, kašalj i glavobolja, a fizičkim pregledom se zapaža dilatacija vena glave, vrata i ruku, odnosno otok i pletora lica, vrata, gornjeg dela grudnog koša i gornjih ekstremiteta uz vidljivu razvijenu kolateralnu vensku cirkulaciju gornjeg dela grudnog koša. Sindrom gornje šuplje vene se smatra hitnim stanjem i zahteva momentalnu primenu hemioterapije ili zračne terapije bez obzira da li postoji ili je nedefinitivna patohistološka dijagnoza bolesti.

Klinički znaci KONSTRIKCIJE PLUĆNE ARTERIJE oponašaju emboliju. Simptomi uključuju akutan ili hroničan bol u grudima, dispneju i kašalj. Duži put kroz medijastinum desne plućne arterije i veća koncentracija limfnih žlezda sa desne strane medijastinuma predominiraju pojavu ove komplikacije kod karcinoma sa desne strane. Ukoliko su zahvaćeni proksimalni delovi, bilo leve bilo desne grane (intraperikardni segment), podrazumeva tumorsku neresektabilnost, dok zahvatanje distalnijih delova plućne arterije samo po sebi nije znak neresektabilnosti.

Karcinom bronha može zahvatiti PERIKARD bilo direktnom ekstenzijom ili retrogradnim limfatičkim putem iz medijastinalnih limfnih čvorova preko epikardijalnih limfatika. Znaci zahvatanja perikarda su: preteća tamponada i iznenadan početak aritmije i/ili uvećanje srčane senke na radiogramu grudnog koša. Simptomi “desnog srca” mogu ali ne moraju biti prisutni. Perikardiocentezom se može evakuisati izliv i time dovesti do prestanka ispoljavanja prisutnih znakova. Zahvatanje samog srca je retka pojava i nastaje hematogenim širenjem.

PLEURALNI IZLIV je češći zbog zahvatanja pleure karcinomom nego zbog opstrukcije medijastinalnih limfatika. Simptomi uključuju dispneu, bol u grudima i kašalj. Ukoliko se dokaže prisustvo malignih ćelija u pleuralnom izlivu, bolesnik je inoperabilan, te je pleuralna punkcija sastavni deo dijagnostičkog postupka. Masivni pleuralni izliv može vitalno ugroziti bolesnika te su tada neophodne evakuacione pleuralne punkcije ili pleurodeza.

Zahvatanje PARIJETALNE PLEURE I GRUDNOG ZIDA odlikuje se pojavom bola koji je izuzetno jak, oštar, perzistentan i dobro lokalizovan.

Regionalno širenje karcinoma bronha u medijastinum može dovesti do kompresije ili zahvatanja ezofagusa i posledične disfagije. Ukoliko se karcinom širi direktno iz bronha u ezofagus može nastati bronhoezofagelana fistula. Znaci koji ukazuju na fistulu su kašalj odmah po unosu hrane, a kao komplikacija može se javiti i posledična aspiraciona pneumonija (98-100).

**Opšti simptomi i znaci bolesti** - Ovi simptomi uključuju anoreksiju, gubitak na telesnoj masi, zamaranje, depresiju. Tačna etiopatogeneza ovih simptoma nije poznata. Ovi simptomi se gube uključivanjem terapijskih protokola. Zbog metaboličke potrebe tumora, povećanog korištenja energije i pored dovoljnog unosa hranljivih materija u organizam, pacijenti imaju gubitak na telesnoj težini. Citokini odgovorni za gubitak telesne mase su tumor nekrosis faktor alfa i hormoni (insulin, kriptokinin, epinefrin i faktor rasta) (101).

**Paraneoplastični sindrom** - Paraneoplastični sindromi su grupa bolesti koje su povezane sa malignom bolesti ali nisu direktno povezane sa primarnim tumorom ili udaljenim metastazama. Vrlo često su zastupljeni u karcinomu bronha. Javljaju se u oko 10% pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom bronha i u oko 50% pacijenata sa mikrocelularnim karcinomom bronha (102). Javljaju se i nekada i pre postavljanja dijagnoze bolesti, a mogu se javiti i u bilo kojoj fazi bolesti. Simptomi često ne odgovaraju veličini primarnog tumora. To su:

- **Endokrini sindromi** - Razlog ovih simptoma je povećana ekspresija hormona normalnih ćelija, a ne njihova povećana produkcija. Najčešći endokrini sindromi u

karcinomu bronha su Kušingov sindrom, hiperkalcemija i sindrom neadekvatnog lučenja antidiuretskog hormona.

- **Hematološki sindromi** - Najčešći hematološki poremećaj je anemija koja je normohromna ili lako hipohromna. Razlozi su nutricionarna deficijencija, krvarenje, postojanje inflamacije i supresija koštane srži zbog primene citoterapije ili zračne terapije. Čest poremećaj je trombocitoza i idiopatska venska tromboza.
- **Neurološki sindromi** - Ovi sindromi su retki. Većina ovih sindroma su posledica autoimune reakcije na "onkoneuralne" antigene koji su porekla tumora ili nervnog sistema. Lamber-Eaton-ov miastenični sindrom javlja se u 3% pacijenata sa mikrocelularnim karcinomom bronha. Nastaje zbog dejstva antitela protiv kalcijumskih kanala na presinaptičkim neuromuskularnim sinapsama. Klinički se ispoljava mišićnom slabošću, suvoćom usta i impotencijom (103). Neurološki sindromi su i paraneoplastična cerebelarna degeneracija, periferna neuropatija, miotonija i karcinomom asocirana retinopatija kao veoma redak sindrom.
- **Muskuloskeletni sindromi** - Klambling prstiju ruku, odnosno batičasti prsti i hipertrofična osteoartropatija se javljaju kod adenokarcinoma bronha i nešto manje u mikrocelularnom karcinomu bronha. Mogu se javiti i bolni otoci, odnosno osetljivost na distalnim ekstremitetima i novostvorene koštane formacije duž osovine dugih kostiju.
- **Dermatološki poremećaji** - To su stečena tiloza, palmarni eritem, kružni eritem i acantosis nigricans (tamna pigmentacija u predelu kože pazušnih jama), iako je ovaj poslednji sindrom najčešći u karcinomu želuca.

**Simptomi sistemskog metastaziranja bolesti** - Karcinom bronha može veoma brzo da se širi čak i u početnim stadijumima bolesti. Najčešće metastaziranje je u organima kao što su mozak, kontralateralno plućno krilo, jetra, nadbubrezi i kosti. Nešto ređe metastaze nalazimo u visceralnim organima, koži, potkožnom tkivu, bubrezima i pankreasu. Simptomi će tada odgovarati organu ili tkivu gde se metastatska bolest nalazi.

### 1.1.7. DIJAGNOSTIČKE METODE I ODREĐIVANJE STADIJUMA BOLESTI

Postavljanje tačne dijagnoze karcinoma bronha kao i stadijuma bolesti od najvećeg je značaja za terapijski pristup ovoj bolesti, a samim tim i njenu prognozu. Svakom bolesniku treba pažljivo uzeti anamnezu kao i detaljan fizikalni pregled uz posebno obraćanje pažnje na postojanje simptoma i znaka primarnog tumora, regionalnog širenja bolesti, udaljenih

metastaza i paraneoplastičnog sindroma, uključujući procenu performans statusa i eventualnog gubitka na težini. Dijagnostičke metode mogu se podeliti u neinvazivne i invazivne.

### **Neinvazivne tehnike dijagnostike karcinoma bronha**

Ove tehnike podrazumevaju biološke, radiološke i izotopske tehnike dijagnostike karcinoma bronha kao i citološki pregled sputuma.

**Radiografija grudnog koša** - Karcinom bronha se sveobuhvatno najčešće otkriva na standardnom radiogramu grudnog koša. On nam daje podatke o veličini, lokalizaciji, anatomskoj zahvaćenosti bolesti kao što su postopstruktivni kolaps, perikardna ili pleuralna efuzija, a pokazuje i prisustvo plućnih metastaza. Pojedini tipovi karcinoma bronha imaju neke radiografske karakteristike. Skvamozni karcinom se u 65% slučajeva javlja u glavnim, lobarnim i segmentalnim bronhijima, što se radiografski prezentuje kao centralni tumor. Ima tendenciju da se širi lokalno i da pokazuje znake postopstruktivnog pneumonitisa i zahvatanja medijastinuma, grudnog zida i dijafragme. Kada je lokalizovan periferno ima tendenciju, više nego ostali tipovi karcinoma, ka centralnoj nekrozi i kavitaciji. Tumori u apeksu pluća (Pancoast tumori) su uglavnom skvamozni karcinomi i imaju tendenciju ranog zahvatanja okolnih struktura, uključujući pleuru, grudni zid, kosti, brahiocefalični splet nerava kao i cervikalni simpatički pleksus. Adenokarcinom se uglavnom javlja periferno i klinički je "nem" sve do pojave udaljenih metastaza. Makrocelularni karcinom se javlja više periferno nego centralno (104). Prikaz zahvaćenosti medijastinuma i zida grudnog koša nije moguć, te se predlaže korištenje kompjuterizovane tomografije (CT) grudnog koša.

**CT grudnog koša** se sprovodi nakon radiograma grudnog koša i znatno je senzitivnija metoda za procenu bolesti u odnosu na standardnu radiografiju. CT grudnog koša uveden je u upotrebu krajem sedamdesetih godina prošlog veka i najviše je korišćena neinvazivna metoda za evaluaciju medijastinuma kod karcinoma bronha. Za precizniju procenu zahvaćenosti medijastinuma, vaskularnih struktura i struktura zida grudnog koša koristi se i intravenska aplikacija-i.v. kontrasta. "Otkrićem" multislajsnih skenera (MSCT) napravljena je fundamentalna promena u dijagnostici svih plućnih oboljenja, pa i karcinoma bronha. Ova tehnologija omogućila je skeniranje kompletnog volumena pluća (grudnog koša) tokom samo jednog zadržavanja daha pružajući mogućnost za stvaranje trodimenzionalne, visokorezolutivne slike, bez artefakata (105). Imajući u vidu ovu mogućnost multislajсни skeneri se koriste i u skriningu za karcinom bronha kada se radi niskodozni protokol (low dose CT). Najnovija istraživanja (106) upućuju da je LDCT opravdano raditi u određenim grupama visokorizičnih pacijenata: 1) pacijenti starosti od 55 do 74 godina, aktivni pušači sa preko 30 kutija godišnje ili bivši pušači sa preko 30 kutija godišnje koji su prestali da puše u poslednjih

15 godina, ili 2) pacijenti preko 50 godina koji su aktivni pušači sa preko 20 kutija godišnje uz bar jedan dodatni riziko faktor (istorija maligniteta, istorija plućnog oboljenja – hronična opstruktivna bolest pluća, plućna fibroza, izlaganje radonu i profesionalna ekspozicija - arsen, hrom, azbest, nikel, kadmijum, berilijum, silicijum, isparavanja dizela, dim uglja i čađ). U ovim grupama se očekuje smanjenje mortaliteta za čak 20% (u poređenju sa grupom skriningovanih klasičnim radiogramom) (107).

Ono što je glavni nedostatak kompjuterizovane tomografije je što ne može da se vidi ono što nije obuhvaćeno skeniranjem-udaljene metastaze kao ni metabolička aktivnost snimljenog tkiva, što je od izuzetne važnosti u određivanju adekvatnog TNM stadijuma bolesti. U poređenju sa standardnim CT nalazom, **pozitron emisiona tomografija (PET)** je superiorna u proceni tumorskih promena u medijastinumu i vanplućne lokalizacije bolesti. Pet skener se danas najčešće nalazi u hibridnom PET/CT aparatu i izgleda vrlo slično „običnom“ CT skeneru. Maligne ćelije imaju brži metabolizam u odnosu na zdrave i zbog toga se na snimku vide kao zone intenzivnijeg nakupljanja radiofarmaka. Tačnost PET skena za medijastinalne metastaze je 74%, senzitivnost 74–84%, specifičnost 73–89%, ima negativnu prediktivnu vrednost 93% i pozitivnu prediktivnu vrednost 79% (108). Kada je nalaz PET skena pozitivan ili su limfne žlezde medijastinuma uvećane, bez obzira na nalaz PET skena, neophodna je histološka potvrda bolesti. U slučaju negativnog PET skena i uvećanih limfnih žlezda u medijastinumu 16 mm i više (CT nalaz), metastatska bolest se može utvrditi u 21% slučajeva. PET sken ima veliku tačnost (89–96%) za utvrđivanje ekstratorakalnih metastaza. Najveću vrednost ima za istraživanje metastaza u nadbubrežima i muskuloskeletnom sistemu. Nije od koristi za detekciju metastaza u CNS-u, zbog velike metaboličke aktivnosti glukoze u normalnom moždanom tkivu. Kod bolesnika sa limfnim žlezdama medijastinuma manjim od 1 cm ima 14,4% lažno negativnih nalaza (109).

**Magnetna rezonanca grudnog koša (MR)** ima limitiranu ulogu u dijagnostici bolesti respiratornog trakta pa time i karcinoma bronha. Razlog su pokreti koji se javljaju usled srčanog rada i respiratornih pokreta. Stoga se MR primenjuje radi dijagnostike promena na grudnom zidu i kičmenom stubu. Prednost MR nad CT-om je u detekciji hilarnih limfnih čvorova kao i detekciji ekstratorakalnih metastaza i to na prvom mestu jetre i nadbubrežnih žlezda (110).

**Scintigrafija skeleta** je dijagnostička metoda koju ne primenjujemo rutinski već samo u slučaju postojanja sumnje na prisustvo metastatskih promena na kostima i u proširenom stajingu (stepenovanju) stadijuma bolesti kod periferno lokalizovanog i time potencijalno resektabilnom mikrocelularnom karcinomu bronha.

## **Invazivne tehnike dijagnostike karcinoma bronha**

Dijagnoza karcinoma bronha se postavlja citološkim ili patohistološkim pregledom. Osnovna invazivna dijagnostička metoda za ovakvo postavljanje dijagnoze je bronhoskopija.

**BRNHOSKOPIJA** je endoskopska metoda direktne eksploracije traheo-bronhijalnog stabla. Prva bronhoskopija izvedena je 1897. g. i izveo ju je Gustav Killian. U slučaju sumnje na karcinom bronha, bronhoskopija se izvodi sa ciljem: da direktnom vizualizacijom tumora potvrdi sumnju na karcinom bronha uspostavljenju na osnovu Rtg snimka, da se dobiju uzorci radi patohistološkog/citološkog pregleda, da se ustanovi resektabilnost i da se ustanovi da li su i kojoj meri bolesnikove smetnje nastale usled endobronhijalne bolesti. Bronhoskopija može biti rigidna i fleksibilna (fiberbronhoskopija).

Osnovne bronhoskopske tehnike za uzorkovanje tkiva su:

1. Bronhobiopsije kleštima-(forceps biopsije), koje se mogu izvoditi na dva načina: bronhobiopsije (BB) vidljivih endobronhijalnih masa kao što je slučaj kod centralnih tumora i transbronhijalne biopsije (TBB) gde je lezija periferno i nije vidljiva endobronhijalno. Biopsija vidljivih endobronhijalnih lezija ima dijagnostičku senzitivnost od 88%, prema podacima iz 30 studija, dok u slučaju perifernih biopsija koje se izvode pod kontrolom fluoroskopa, zbirni podaci pokazuju dijagnostičku senzitivnost od 52% (111).
2. Transbronhijalne iglene aspiracije, punkcije (TBP, TBNA-transbronchial needle aspiration), su minimalno invazivni načini određivanja medijastinalne patologije sa osetljivošću od 20-80%; ranije se dobijao samo citološki uzorak, a novijim iglama i histološki uzorak.
3. Četkanjem (brushing) se potvrđuje bolest u 50-90% kod endobronhijalne lezije sa senzitivnošću od 45-72% i specifičnosti od 98%.
4. Bronhijalno ispiranje (lavaža) predstavlja tehniku kojom se dobija aspiriran sekret iz bronhijalnog stabla kroz radni kanal bronhoskopa nakon instilacije fiziološkog rastvora u disajne puteve. Materijal dobijen ovom tehnikom ne predstavlja material iz bronhoalveolarnih prostora. Od pomoći je za dobijanje citološke potvrde centralnih endobronhijalnih lezija, patogenih organizama kod nespecifičnih i specifičnih upala i kod gljivičnih infekcija.
5. Bronhoalveolarna lavaža (BAL) ima za cilj dobijanje reprezentativnog celularnog uzorka iz distalnih disajnih puteva i alveola.

Savremene dijagnostičke tehnike upotrebljavaju se za postavljanje dijagnoze mnogobrojnih plućnih oboljenja: karcinoma bronha, pneumonija, tuberkuloze, sarkoidoze,



vaskulitisa i brojnih drugih oboljenja. Pored ovoga, dijagnostičke tehnike upotrebljavaju se i za određivanje stadijuma proširenosti pojedinih oboljenja, a najviše karcinoma bronha (112).

### **Savremene bronhološke dijagnostičke tehnike**

U proteklih desetak godine, fiber-optičku bronhoskopiju ili fleksibilnu bronhoskopiju u potpunosti je zamenila videobronhoskopija. Razlika između ove dve tehnike je u načinu stvaranja i prenosa svetlosnih impulsa. Dok je kod fiber-optičke bronhoskopije ovakva transmisija i transformacija signala tekla preko fiberoptičkih vlakana, danas ova tehnologija u potpunosti zavisi o charged-couple device sistema, odnosno CCD kameri koja se nalazi na distalnom kraju bronhoskopa. Na ovaj način omogućena je reprodukcija slike u visokoj rezoluciji, detekcija detalja ali i višestruko uvećanje slike radi posmatranja arhitektonike bronhijalne sluznice.

**Autofluorescentna videobronhoskopija (AFI)** Integracijom sistema AFI sa videobronhoskopskim sistemima visoke moći povećanja, dobijen je hibridni sistem autofluorescentne videobronhoskopije sa uvećanjem slike, visoke rezolucije što omogućuje detekciju vrlo suptilnih promena citoarhitektonike sluznice bronha. U videoprocessoru, autofluorescentni svetlosni signal pretvara se u zeleni spektar, a zelena reflektovana svetlost se pretvara u crveni i plavi spektar. Tako obrađena slika se sintetiše u procesoru i projektuje na ekranu. Normalna slika AFI je zato zelena, dok su patološki procesi tamno zeleni, a jače izražene patološke promene su ljubičaste i tamno smeđe.

Indikacije za AFI su:

1. Detekcija malignih i premalignih lezija kod bolesnika koji pripadaju rizičnim grupama (pušači, HOBP, osobe sa ranije dijagnostikovanim malignitetom).
2. Detekcija sinhronih karcinoma bronha.
3. Detekcija radiološki okultnog karcinoma bronha (pozitivna samo citologija sputuma).
4. Procena ekstenzivnosti endoskopski vidljivog karcinoma bronha.
5. Praćenje (follow-up) bolesnika nakon hirurškog lečenja karcinoma bronha (113).

**Videobronhoskopija uskog snopa svetlosti (NBI)** je nova tehnika respiratorne endoskopije dizajnirana za evaluaciju submukozne kapilarne mreže bronhijalne sluznice. Sistem koristi dva snopa svetlosti: plavi snop (390-445 nm) i zeleni snop (530-550 nm) koji se izdvajaju pomoću optičkog filtera smeštenog iza ksenonskog izvora svetlosti.

Indikacije za NBI videobronhoskopiju:

1. Detekcija prekanceroznih lezija i ranog stadijuma karcinoma bronha (naročito u rizičnim grupama).



2. Procena vaskularizacije šava nakon hirurške intervencije ili transplantacije pluća.
3. Detekcija sinhronih tumora.
4. Procena ekstenzivnosti endobronhijalnog tumora i selekcija nivoa resekcije.

**Enodbronhijalni ultrazvuk (EBUS)** 1992. g. Hurter i Hanrath su prvi koristili endobronhijalni ultrazvuk-endobronchial ultrasound (EBUS) kod pacijenata sa karcinomom pluća da bi opisali izgled bronhijalnog stabla, peribronhijalnih struktura i samog tumora. EBUS postoji u dve forme: radijalni EBUS i linearni EBUS. Oba vrste koriste transdjuser koji proizvodi ultrazvučne talase i koji prima i reflektuje ultrazvučne talase. Procesor potom integriše talase reflektovane sa pojedinih tkivnih površina i pretvara ih u dvodimenzionalnu ultrazvučnu sliku.

**Radialna proba (RP) EBUS** koristi rotirajući transdjuser na kraju probe i produkuje time sliku od 360° i to prema najdužoj aksisi bronhoskopa. Kako je voda odličan prenosilac zvučnih talasa, proba je dizajnirana i sa balonom, koji je napunjen vodom, čime je omogućeno ultrazvučno dobijanje slike vazduhom ispunjenih pluća. 20-MHz frekventna proba se najčešće koristi iako se primenjuju i probe od 12-MHz i 30-MHz. Ova frekvencija penetrira u tkivo oko 4 do 5 cm sa rezolucijom od 1 mm, što omogućava identifikaciju svih slojeva bronhijalnog zida. 20-MHz frekventna proba se koristi najčešće iako se primenjuju i probe od 12-MHz i 30-MHz. Ova frekvencija penetrira u tkivo oko 4 do 5 cm sa rezolucijom od 1 mm, što omogućava identifikaciju svih slojeva bronhijalnog zida. Radijalni EBUS prvobitno se koristio bez vodiča, a poslednjih godina koristi se sa vodičem (guide sheath). Ovo je doprinelo značajnom povećanju senzitivnosti u postavljanju dijagnoze perifernih plućnih lezija, jer se time smanjuje mogućnost „gubitka“ lokalizovane promene prilikom otklanjanja probe iz bronha. Ovo je naročito doprinelo povećanju senzitivnosti u dijagnostici perifernih plućnih lezija manjih od 2 cm (115).

**Linearni (real time) EBUS** Na početku 21. veka predstavljene su linearne bronhoskopske ultrazvučne sonde koje omogućuju uzorkovanje u stvarnom vremenu (real time), što nije bilo moguće kod primene radijalne ultrazvučne sonde. Iglom dugačkom 10-40 mm moguće je uzorkovati leziju relativno udaljenu od bronhijalnog zida. Transbronhijalna iglena aspiracija (TBNA) je osnovna bronhoskopska metoda uzorkovanja medijastinalnih limfnih čvorova u dijagnostikovanju limfadenopatije i određivanju stadijuma bolesti karcinoma bronha (116). Ova metoda omogućava precizno lokalizovanje ekstrabronhijalnih struktura uključujući krvne sudove (korištenjem Dopler snimanja) i limfnih čvorova. EBUS-TBNA je korisna, manje invazivna, stejdžing tehnika u odnosu na medijastinoskopiju i nudi

pristup širem krugu pozicija mediastinalnih limfnih čvorova (pozicije 2, 3, 4, 7, 10, 11). Najveći značaj ove bronhoskopske tehnike je u diferenciranju zahvatanja mediastinalnih limfnih čvorova, odnosno diferencijarnju N2 stadijuma karcinoma bronha (117).

**Transtorakalna iglena punkcija (TTP)** je postala pouzdana tehnika sa minimumom propratnih neželjenih pojava i komplikacija. Izvodi se specijalnom iglom ili kao transtorakalna iglena aspiracija. Navode se tri jasne indikacije za izvođenje TTP, od kada se sumnja na karcinom bronha: potreba da se uspostavi citološka dijagnoza kod neresektabilnih/inoperabilnih bolesnika, potreba da se determiniše ćelijski tip promene za koju se sumnja da je metastatske prirode ili sekundarni primarni karcinom bronha i potreba da se ustanovi citološka dijagnoza kod bolesnika sa povećanim operativnim rizikom uprkos kojeg bi se pristupilo hirurškom zahvatu ukoliko bi dijagnoza bila pozitivna. TTP ima tačnost u dokazivanju dijagnoze od 50-96% sa malo lažno pozitivnih rezultata...

**Punkcija i biopsija dostupnih uvećanih limfnih čvorova** supraklavikularno, na vratu ili u drugim regijama, kao i punkcija dostupnih tumorskih promena se izvodi kada postoji opravdana sumnja da su metastatske prirode. Ukoliko se radi o uvećanim limfnim čvorovima supraklavikularne ili vratne regije predstavlja (N3) bolest i svrstava se u IIIb stadijum koji označava inoperabilnost. Isto tako, ukoliko se radi o pozitivnom nalazu dostupne tumorske promene i potvrdi se metastatska priroda istog, bolest se svrstava u IV stadijum, koji takođe označava inoperabilnost. Ukoliko se punkcijom ne obezbedi reprezentativan uzorak indikovana se **biopsija promene**, kojom se dobija uzorak za histološki pregled.

**Pleuralna punkcija** je invazivna metoda koja ima dijagnostički i terapijski značaj. Ako je izliv masivan i ugrožava bolesnika, pleuralna punkcija može istovremeno biti i dijagnostička (ako se citološkim pregledom dijagnostikuje malignitet). Ako postoje i drugi znaci karcinoma bronha pozitivan pleuralni izliv svrstava tumor u M1a, odnosno bolest u IV stadijumu. Ovo je i terapijska metoda koja kao palijativna metoda oslobađa bolesnika od simptoma nastalih usled velike količine tečnosti u pleuralnom prostor. Etiološki nejasan pleuralni izliv (ponavljane punkcije) je indikacija za **pleuroskopiju (torakoskopiju)**.

Od **hirurških dijagnostičkih metoda** izuzev torakoskopije koja je pomenuta primenjuju se:

**Video asistirana torakoskopija (VATS)** je procedura izbora kako za dijagnozu tako i tretman pleuralnih oboljenja. VATS se koristi sve više u preoperativnoj proceni i stejdžingu karcinoma bronha. Koristi se u proceni zahvaćenosti različitih struktura (grudnog zida, dijafragme, mediastinuma i velikih krvnih sudova) što se nije moglo sa sigurnošću ustanoviti CT-om ili MR pregledom. Procena zahvaćenosti više od jednog lobusa kod tumora koji je

situiran u blizini fisure sa respiratornom rezervom koja ne dozvoljava resekciju više od jednog lobusa, proceni invazije medijastinalnih struktura (paraezofagealnih limfnih žlezda, ezofagusa, perikarda itd.) i proceni širenja tumora van bronhijalnog stabla naročito u predelu hilusa (117).

Medijastinoskopija je takođe invazivna metoda za direktno eksplorisiranje medijastinalnih struktura. Ređe se koristi u dijagnostičke svrhe, kada su u pitanju promene u gornjem medijastinumu, koje nisu dostupne drugim invazivnim tehnikama. Najčešće se koristi u okviru stejdžinga karcinoma bronha i određivanju N2, odnosno N3 zahvaćenosti limfnih čvorova.

**Medijastinoskopija** je zlatni standard za histološki stejdžing kod karcinoma bronha, visoke senzitivnosti (86 do 92%) i specifičnosti (100 %) što znači da nema lažno pozitivnih rezultata, ali ima i preko 10% lažno negativnih. Medijastinoskopijom se može pristupiti pretrahealnim limfnim čvorovima (pozicija 1 i 3), obostrano visokim i niskim paratrahealnim limfnim čvorovima (pozicije 2 i 4 levo i desno) i subkarinalnim limfnim čvorovima (pozicija 7). Limfni čvorovi medijastinuma koji se ne mogu uzorkovati ovom metodom su pozicije 5-aortopulmonalni čvorovi, 6-paraaortalni čvorovi, 8-paraezofagealni čvorovi i 9-limfni čvorovi plućnog ligamenta. Video medijastinoskopija je tehničko unapređenje standardne medijastinoskopije po Carlensu. Primena video kamere daje bolji uvid u anatomske detalje i šire vidno polje što olakšava edukaciju, standardizaciju postupka i kompletnu limfadenektomiju (VAMLA). Primena video medijastinoskopije za biopsiju limfnih čvorova ima manje komplikacija i daje više reprezentativnih biopsija. U svakodnevnom radu mana video medijastinoskopije je duže vreme za pripremu opreme i izvođenje procedure, a zbog većeg prečnika instrumenta potrebna je veća incizija na vratu (118).

### 1.1.8. TNM KLASIFIKACIJA I STADIJUM BOLESTI

TNM sistem (Tumor, Nodes and Metastases) je osnova klasifikacije svih malignih tumora. Prvobitno je postavio Pierre Denoix krajem četrdesetih godina prošlog veka. "T" (Tumor) predstavlja status primarnog tumora, a slova ili brojevi koji mu se dodaju označavaju veličinu tumora i/ili zahvatanje susednih struktura i organa direktnim širenjem tumora. "N" (Nodus) predstavlja status regionalnih limfnih čvorova, a slovom ili brojevima je označena gradacija proširenosti njihove zahvaćenosti. "M" (Metastaze) označava prisustvo udaljenih metastaza, sa slovom ili brojevima koji ukazuju na njihovo odsustvo ili prisustvo. Prvo izdanje Priručnika za stejdžing karcinoma (Manual for Staging of Cancer) je publikovano 1977. Poslednja, sedma revizija, TNM klasifikacije karcinoma bronha prihvaćena je u leto 2009. godine, a njena primena je započela 01. januara 2010. Do tada je važila šesta revizija ( Prilog

1.), odnosno peta, pošto u šestoj reviziji TNM sistema nije bilo promena vezanih za karcinom bronha. Sedma revizija je donela nekoliko izmena, pre svega koje se tiču veličine tumora. Shodno tome pojavile su se kategorije T1a, T1b, T2a i T2b kao potpuno nove u okviru T statusa, dok je veličina preko 7cm uzela učešće u klasifikaciji T3 (ranije T2). Takođe tumor sa odvojenim nodusima u istom režnju T3 (ranije T4) i tumor sa nodusima u istom plućnom krilu ali u drugom režnju T4 (ranije M1). U okviru N statusa nije bilo bitnih izmena. Izmene se odnose i na M status, odnosno pleuralna diseminacija, maligni pleuralni izlivi i pleuralni nodusi kao i perikardni izlivi klasifikuje se kao M1a bolest, ranije T4, takođe i tumorski nodus(i) u kontralateralnom režnju plućnom režnju klasifikuju se kao M1a. Udaljene metastaze, van grudnog koša klasifikuju se kao M1b (119). Shodno ovim izmenama i grupisanje na stadijume bolesti je pretrpelo izmene, uzimajući u obzir preživljavanje bolesnika po tako izmenjenim grupama.

Sedma revizija TNM klasifikacije karcinoma bronha *Goldstraw P. IASLC Staging Manual in Thoracic Oncology. IASLC. Denver, Colorado, USA, 2009.* ( Prilog 2.)

Načini TNM klasifikovanja su sledeći:

1. cTNM je kliničko-dijagnostički stejdžing - baziran na bilo kom dijagnostičkom postupku sem torakotomije (fizički pregled, rutinski i specijalni rendgenogrami, bronhoskopija, ezofagoskopija, medijastinoskopija, medijastinostomija, torakocenteza, torakoskopija, kao i bilo koji drugi postupak za dokazivanje ekstratorakalnih metastaza). Konačni stejdžing za bolesnike koji nisu torakotomirani.
2. ycTNM odnosi se na inicijalnu (neoadjuvantne) terapiju (tokom i pre).
3. sTNM je hirurško-evaluativni stejdžing - baziran na informacijama dobijenih za vreme eksplorativne torakotomije, uključujući rezultate biopsija urađenih za to vreme.
4. pTNM je posthirurški-patološki stejdžing-baziran na nalazima torakotomije i patološkog pregleda resektata.
5. ypTNM je posthirurški-patološki stejdžing baziran na nalazima torakotomije i patološkog pregleda resektata posle inicijalne (neoadjuvantne terapije).
6. rTNM je retreatmanski stejdžing-kod bolesnika sa progresivnom bolesti; svi dostupni dijagnostički postupci pre daljeg tretmana.
7. aTNM je autopsijski stejdžing -postmortalno ispitivanje.

### 1.1.9. HISTOLOŠKA PODELA KARCINOMA BRONHA

Širok spektar benignih i malignih neoplazmi može da se razvije u bronhima i distalno u plućnom parenhimu. Termin bronhogeni karcinom koji se često koristi da označi sve forme malignih tumora epitela u plućima, nije najbolji jer ne potiču svi karcinomi u plućima od bronha. Najpovoljniji termin je bronhopulmonalni karcinom koji, nažalost, nije u široj upotrebi. U literaturi na engleskom jeziku se ustalio termin karcinom pluća (lung cancer), dok u našoj literaturi preovladava termin karcinom bronha. Podela tumora pluća menjala se tokom godina. Najšire prihvaćena klasifikacija tumora bronha je klasifikacija Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO). Često se koristi praktična, klinički zasnovana podela bronhogenih karcinoma na sitnoćelijske-mikrocelularne karcinome (SCLC - small cell lung carcinoma) i ne-sitnoćelijske karcinome - nemikrocelularne karcinome (NSCLC - non small cell lung carcinoma). Raniju histološku klasifikaciju je potrebno primenjivati za karcinome pluća sa skvamoznom morfoloijom, neuroendokrinom diferencijacijom i druge varijante karcinoma.

Novija klasifikacija obuhvata podelu adenokarcinoma na resekcionim uzorcima i na sitnim biopsijama i citologiji (120). Upotreba termina bronhioloalveolarni karcinom nije više u upotrebi.

#### ***Klasifikacija adenokarcinoma u resekcionim uzorcima:***

- **Preinvazivne lezije**
  - atipična adenomatozna hiperplazija (AAH), periferno lokalizovana proliferacija lako do srednje atipičnih ćelija koje oblažu alveole i ponekad respiratorne bronhiole, veličine do 5mm u prečniku. Nije udružena sa intersticijalnom inflamacijom i fibrozom. Nema dokaza o progresiji AAH u AIS, često prisutan na periferiji AIS ili invazivnog adenokarcinoma.
  - adenokarcinom *in situ* (AIS; ranije BAC): < 3 cm čvor, lokalizovan, neinvazivan, bez metastatskog rizika, 100% 5-godišnje preživljavanje ako je tumor kompletno resekiran. Rast neoplastičnih ćelija duž preegzistirajućih alveolarnih struktura (lepidični rast) bez dokaza stromalne vaskularne i pleuralne invazije. Papilarni ili mikropapilarni podtip i intraalveolarne ćelije: odsutni. Tri tipa AIS-a mucinozni, nemucinozni ili mešani tip.
- **Minimalno invazivni adenokarcinom (MIA):** < 3cm solitarni čvor sa predominantno lepidičnim rastom i <5mm invazije. Nema rizika od metastaziranja, skoro 100% petogodišnje preživljavanje nakon kompletne resekcije. Postoje tri tipa: mucinozni, nemucinozni ili mešani tip.

- **Invazivni adenokarcinom**, notira se semikvantitativno svaki predominantni tip ako je zastupljen >5%. Predominantno **lepidični** adenokarcinom (LPA) karakteriše proliferacija pneumocita tip II, i/ili Clara ćelija duž alveolarnih septa (slično AIS iMIA), ćelije ne proizvode sluz (ranije nemucinozni BAC). Invazivnost se definiše prisustvom najmanje jednog fokusa invazije > 5mm, invazije limfatika, krvnih sudova i pleure, prisustvo nekroze i nekog drugog histološkog podtipa (acinarni, papilarni, mikropapilarni i/ili solidni). Invazivni mucinozni adenokarcinom sa predominantno lepidičnim rastom karakteriše pneumonična konsolidacija, multipli čvorovi >3cm, invazija >5mm, peharaste ili cilindrične ćelije (ranije mucinozni BAC).
  - **Varijante invazivnog adenokarcinoma**
    - invazivni mucinozni adenokarcinom,
    - koloidni adenokarcinom,
    - fetalni adenokarcinom,
    - crevni adenokarcinom.

*U sitnim biopsijama i citologiji adenokarcinom* karakteriše kohezivna grupa, acinarne, papilarne i mikropapilarne formacije, citoplazmatske vakuole, ekscentrična jedra, prominentni neukleolusi, fini hromati i mucinozna pozadina. Postoji više tipova adenokarcinoma : *adenokarcinom glandularne formacije, mikropapilarni adenokarcinom, adenokarcinom sa lepidičnim rastom, mucinozni adenokarcinom, koloidni adenokarcinom, adenokarcinom sa signet ring karakteristikama i adenokarcinom sa clear cell karakteristikama.*

#### 1.1.10. TERAPIJA KARCINOMA BRONHA

Terapija karcinoma bronha je kompleksna i deluje ne samo na kurativnom planu, nego i na palijativnom, kako na fizičkom tako i na psiho-socijalnom nivou. Vidovi terapije karcinoma bronha su: hirurška terapija, radioterapija, hemioterapija i palijativna terapija.

#### HIRURŠKO LEČENJE

Operativni zahvat je terapijska metoda izbora za bolesnike u stadijumu 0, I i II stadijumu nemikrocelularnog karcinoma bronha (NSCLC) ukoliko to dozvoljava funkcionalna procena. Tumor može biti resektabilan, odnosno pogodan za hiruršku resekciju, ali bolesnik može i ne mora biti operabilan u zavisnosti od stanja bolesnika, a pre svega kardiorespiratorne rezerve. Detaljno preoperativno ispitivanje opšteg zdravstvenog stanja pacijenta, posebno respiratorne rezerve, je od izuzetne važnosti za procenu efekata hirurške intervencije.

## Savremene epidemiološke i tehnološke promene koje utiču na hiruršku dijagnostiku i lečenje

- Porast broja perifernih adenokarcinoma (niži stadijum, povećana stopa resektabilnosti);
- Porast broja pacijenata sa sinhronim ili metahronim primarnim tumorom u drugim organskim sistemima;
- Porast broja pacijenata sa drugim primarnim karcinomom bronha posle izlečenog prvog tumora;
- Starenje populacije: pacijenti u odmakloj dobi sa brojnim komorbiditetima (smanjena medicinska operabilnost);
- Unapređenje hirurške opreme i tehnike (uređaji, potrošni materijal);
- Pобољшanje intenzivno medicinskog lečenja (bezbednije operacije kod medicinski rizičnih pacijenata);
- Uvođenje u upotrebu minimalno invazivnih hirurških procedura;
- Uvođenje alternativa za lečenje ranog perifernog karcinoma pluća – stereotaktična radiohirurgija, perkutane ablacije.

Stadijum 0 nemikrocelularnog karcinoma bronha je karcinom bronha *in situ*, koji je po definiciji neinvazivni i ne metastazira. Terapija izbora bi trebalo da je hirurgija, međutim prisutna je visoka incidenca sekundarnih primarnih tumora, od kojih su mnogi nereseptabilni. Kao alternativa hirurškog tretmana, preporučuje se endoskopska terapija: argon plazma koagulacija, elektrokauterizacija, brahiterapija, laser resekcija i fotodinamska terapija. Hirurgija je terapija izbora za bolesnike u I stadijumu nemikrocelularnog karcinoma bronha. Posle hirurške resekcije bolesnika u I stadijumu bolesti, petogodišnje preživljavanje prevazilazi 50%, a kod bolesnika u prvom stadijumu sa T1 tumorom petogodišnje preživljavanje prevazilazi 70%. Kod pacijenata sa narušenom plućnom funkcijom dolaze u obzir minimalno invazivne hirurške tehnike (VATS asistirana lobektomija i VATS lobektomija) i sublobarne resekcije sa limfadenektomijom, segmentektomija ili "wedge" resekcija.

**Minimalno invazivna (VATS) lobektomija** je hirurška metoda za odstranjenje režnja zahvaćenog tumorom kroz više malih incizija bez širenja rebara, pri čemu se preparat (resecirani režanj) unutar grudnog koša stavlja u nepropusnu kesu i zatim vadi kroz najveću od incizija tako da ne dođe do diseminacije bolesti (120).



**Sublobarna resekcija** je atipična resekcija ili anatomska segmentektomija koja se izvodi kod medicinski rizičnih pacijenata sa karcinomom bronha u Ia i Ib stadijumu. Subpopulacija pacijenata koji mogu imati koristi od sublobarne resekcije i definisanje pravila za izvođenje su:

- Bezbedna je i efikasna alternativa lobektomiji kod visoko rizičnih pacijenata sa stadijumom I NSCLC;
- Korisna je kod pacijenata starijih od 75 godina sa stadijumom I NSCLC;
- Anatomski segmentektomija može biti korisnija od široke atipične resekcije kod pacijenata koji dobijaju sublobarnu resekciju u stadijumu I NSCLC;
- Hirurška margina  $> 1$  cm ili jednaka prečniku tumora je potrebna kod izvođenja sublobarne resekcije pluća za NSCLC;
- Adjuvantna intraoperativna brahiterapija kod sublobarne resekcije ima stopu lokalnih recidiva uporedivu sa lobektomijom.

Hirurška intervencija je metoda izbora u lečenju bolesnika NSCLC i u II stadijumu bolesti. Posle hirurške resekcije bolesnika u II stadijumu bolesti, petogodišnje preživljavanje prevazilazi 35%. Dodatno zračenje ležišta tumora se često koristi za poboljšanje lokalne kontrole bolesti. Glavne kontroverze vezane za NSCLC se odnose na lečenje IIIA stadijuma bolesti. Multimodalni pristup je osnovni terapijski princip (hemo i radioterapija, eventualno hirurgija). Jedan od najvažnijih faktora koji utiču na lečenje bolesnika u IIIA stadijumu bolesti je zahvaćenost mediastinalnih limfnih žlezda (N2). Bolesnici sa N2 žlezdama se nalaze između bolesnika sa resektabilnom i bolesnika sa neresektabilnom bolešću, te samim tim predstavljaju grupu koja zahteva najkompleksnije liječenje.

Raspored terapijskih procedura se razlikuje u USA i Evropi u tome što evropski pristup (Tabela 4.) dozvoljava primarno operativno lečenje kod pacijenata sa N2 bolesti u jednoj poziciji i to pozicijama 4R i 5, dok američki pristup (Tabela 5.) podrazumeva neoadjuvantnu terapiju uvek kod poznate N2 bolesti u jednoj poziciji. Kako su postoperativne komplikacije nakon neoadjuvantne hemioterapije znatno češće i teže kod pacijenata starijih od 75 godina, kod postojanja N2 bolesti na jednoj poziciji se preferira primarna hirurgija (122).



*Tabela 4. Evropski pristup za IIIA stadijum bolesti*

NSCLC N2 podgrupa	Primarna hirurgija	Neoadjuvant HT	Adjuvantna HT/RT	Primarna HT	Primarna RT	Hirurgija posle neoadj
N2 finalno	Da	-	Da			-
Okultna N2	Da	-	Da			-
Single N2- 4R	Da	Ne	Da	Da (za inoperabilne)	Da (za inoperabilne)	-
Single N2 - 5	Da	Ne	Da	Da (za inoperabilne)	Da (za inoperabilne)	-
Multipla N2	Ne	Da	Da			Da za CR/PR
Single N2 - 7	Da/Ne	Da/Ne	Da			Da za CR/PR
Postindukcio na N2	Ne	-	Da			-

*Tabela 5. Američki pristup za IIIA stadijum bolesti*

NSCLC N2 podgrupa	Primarna hirurgija	Neoadjuvant HT	Adjuvantna HT/RT	Primarna HT	Primarna RT	Hirurgija posle neoadj
N2 finalno	Da	-	Da			-
Okultna N2	Da	-	Da			-
Single N2- 4R	Ne	Da	Da (za inoperabilne)	Da (za inoperabilne)	Da (za inoperabilne)	-
Single N2 - 5	Ne	Da	Da (za inoperabilne)	Da (za inoperabilne)	Da (za inoperabilne)	-
Multipla N2	Ne	Da	Da	Da	Da	Da za CR/PR
Single N2 - 7	Ne	Da	Da	Da	?	Da za CR/PR
Postindukcio na N2	Ne	-	Da			-

Sedma revizija TNM klasifikacije karcinoma bronha je u stadijum IIIA svrstala i bolesnike sa T4 tumorom bez zahvatanja limfnih čvorova (N0). Bolesnici sa T4 tumorom se smatraju primarno neresektabilnim. Bolesnici u IV stadijumu bolesti su inoperabilni. U pojedinačnim slučajevima se može razmatrati operativni zahvat kod solitarnih metastaza u mozgu i nadbubrežnim žlezdama, jedino ukoliko je moguća ekstirpacija iste pre ili posle torakotomije.

## HEMIOTERAPIJA U LEČENJU KARCINOMA BRONHA

### LEČENJE NEMIKROCELULARNOG KARCINOMA BRONHA

#### Rani stadijum NSCLC

Kod bolesnika sa kompletno reseciranim nemikrocelularnom karcinomom bronha, adjuvantna hemioterapija cisplatinским dubletima poboljšava preživljavanje bez bolesti i ukupno preživljavanje bolesnika (123). Rezultati velikog istraživanja, *The International Adjuvant Lung Cancer Trial (IALT)* su pokazali statistički duže preživljavanje kod bolesnika u I, II i III stadijumu koji su primili adjuvantnu hemioterapiju na bazi cisplatine (124). U ANITA istraživanju (*The Adjuvant Navelbine International Trialist Association*) upoređivano je preživljavanje 840 bolesnika u Ib, II i IIa stadijumu koji su postoperativno dobijali cisplatin/vinorelbin protokol i bolesnika koji su samo praćeni. Adjuvantna hemioterapija je produžila preživljavanje bolesnika koji su primili adjuvantnu hemioterapiju na bazi cisplatine (125).

Preporuke za primenu adjuvantne hemioterapije i radioterapije kod kompletno reseciranih bolesnika od I-IIIa stadijuma bolesti (*National Comprehensive Cancer Network-NCCN i American Society of Clinical Oncology-ASCO*)

#### Preporuke za adjuvantnu terapiju

##### Stadijum Preporuka

- IA Adjuvantna hemioterapija se ne preporučuje
- IB Adjuvantna hemioterapija se ne preporučuje za rutinsku upotrebu (visoko rizični bolesnici)
- IIA Adjuvantna hemioterapija na bazi cisplatine se preporučuje
- IIB Adjuvantna hemioterapija na bazi cisplatine se preporučuje
- IIIA Adjuvantna hemioterapija na bazi cisplatine se preporučuje

U Tabeli 6. prikazani su hemioterapijski protokoli koji se koriste u adjuvantnoj terapiji, prema vodiču *National Comprehensive Cancer Network-NCCN* i vodiču Komisije za citotoksične lekove Ministarstva za zdravlje Republike Srbije.

Tabela 6. Hemioterapijski protokoli koji se koriste u adjuvantnoj terapiji

Preporučeni hemioterapijski protkoli			
cisplatin 100mg/m <sup>2</sup> dan 1.	etoposid 100mg/m <sup>2</sup> dan 1.-3	svakih 28 dana	4 ciklusa
cisplatin 100mg/m <sup>2</sup> dan 1	vinorelbin 25-30mg/m <sup>2</sup> dan 1.8.15.22.	svakih 28 dana	4 ciklusa
cisplatin 50mg/m <sup>2</sup> dan 1. i 8.	vinorelbin 25mg/m <sup>2</sup> dan 1.8.15.22.	svakih 28 dana	4 ciklusa
Drugi prihvatljivi protokli bazirani na cisplatinu			
cisplatin 75mg/m <sup>2</sup> dan 1.;	gemcitabin 1250mg/m <sup>2</sup> dan 1.8.	svakih 21 dana	4 ciklusa
za adenokarcinom, makrocelularni karcinom i NSCLC NOS			
Hemioterapijski protokoli za bolesnike sa komorbiditetima koji ne tolerišu cisplatin			
paklitaksel 200 mg/m <sup>2</sup> dan 1.	karboplatin AUC 6 dan 1.	svakih 21 dan	4 ciklusa

Lečenje lokalno uznapredovalog ili stadijum III bolesti predstavlja kontroveržno područje, uglavnom zbog velike heterogenosti različitih podgrupa. Treći stadijum se kreće od resektabilnih tumora do neresektabilne bolesti, "bulky disease" sa multiplim zahvatanjem limfnih čvorova. Danas je stadijum III podeljen u šest podgrupa već prema lokalizaciji, veličini i vremenu kada je utvrđeno prisustvo bolesti u limfnim čvorovima (126). Za bolesnike za neresektabilnim IIIA i IIIB stadijumom kombinovani modalitet terapije (hemioradioterapija) je bolja opcija u odnosu na samo radioterapiju (127). Konkurentna hemioterapija podrazumeva, prema vodiču *National Comprehensive Cancer Network-NCCN* i vodiču Komisije za citotoksične lekove Ministarstva za zdravlje Republike Srbije, kombinovani režim paklitaksel 45-50mg/m<sup>2</sup> sedmično sa karboplatin-om AUC 2 konkurentno sa radioterapijom (RT). Sekvencijalna hemioradioterapija podrazumeva svake 3 nedelje 2 ciklusa paklitaksel 200 mg/m<sup>2</sup> sa karboplatin-om AUC 6, a nakon toga se primenjuje radioterapija. Definisana je i konkurentna hemioradioterapija sa hemioterapijom u nastavku lečenja i to dva režima: cisplatin 50mg/m<sup>2</sup> dan 1. sa etoposid 50mg/m<sup>2</sup> dan 1-5., konkurentno sa RT, a nakon toga cisplatin 50mg/m<sup>2</sup> i etoposid 50 mg/m<sup>2</sup>, 2 dodatna ciklusa ili paklitaksel 45-50mg/m<sup>2</sup> sedmično sa karboplatin AUC 2 sedmično konkurentno sa RT, a nakon toga paklitaksel 200 mg/m<sup>2</sup> i karboplatin AUC 6 2 dodatna ciklusa.

### **Četvrti stadijum nemikrocelularnog karcinoma bronha**

Prema podacima Nacionalnog Instituta za karcinom, *National Cancer Institute*, 40% novodijagnostikovanih bolesnika ima četvrti stadijum bolesti. Hemioterapija na bazi platine produžava preživljavanje, poboljšava kvalitet života i smanjuje simptome kod bolesnika s dobrim performans statusom. Brojni lekovi se koriste u hemioterapiji u četvrtom stadijumu bolesti i to su najčešće derivati platine (cisplatin, karboplatin), taksani (docetaksel, paklitaksel), vinorelbin, vinblastin, etoposide, pemetreksed i gemcitabin. Smatra se da su kombinacije lekova delotvornije u odnosu na "single" hemioterapiju, te da za 30 do 40% povećavaju jednogodišnje preživljavanje kod ovih bolesnika (128).

### **Terapija održavanja**

Prema *National Comprehensive Cancer Network-NCCN* preporukama, nakon završene prve linije hemioterapije potrebno je uraditi CT grudnog koša radi procene terapijskog efekta. Smatra se da oko 25% bolesnika razvija progresiju nakon inicijalnog lečenja. Terapija održavanja je sistemska terapija koja se može davati pacijentima sa uznapredovalim nemikrocelularnim karcinomom nakon 4-6 ciklusa hemioterapije prve linije. Kandidati za primenu terapije održavanja su oni bolesnici koji imaju smanjenje tumora na primenu prve terapijske linije ili stabilnu bolest, a u toku hemioterapije su ispoljili minimalnu toksičnost (129).

### **Ciljana terapija**

Naziv ciljana terapija je odnosi se na primenu agenasa koji blokiraju molekularne sisteme izvan jedra ćelije, ponekad čak i izvan maligne ćelije, a imaju za cilj inhibiciju maligne proliferacije. Dva sistema ili puta su od najvećeg značaja u terapiji karcinoma bronha, put receptora epidermalnog faktora rasta (*epidermal growth factor receptor- EGFR*) u tumorskim ćelijama i put receptora vaskularnog endotelijalnog faktora rasta u endotelnim ćelijama (*vascular endothelial growth factor receptor - VEGFR*). Molekularni putevi ovih sistema se mogu inhibisati na tri načina: 1. Na ekstracelularnim domenima EGFR putem monoklonalnih antitela (cetuximab) ili VEGFR (bevacicumab), čiji je cilj vezivanje EGF-a ili VEGF-a pre vezivanja za receptore; 2. Inhibicija na intracelularnom domenu tirozin-kinaze pomoću inhibitora tirozin kinaze (TKIs) od kojih su najpoznatiji erlotinib, gefitinib, vandetanib i 3. Inhibicija pomoću multikinaza inhibitora na intracelularnom domenu receptora pomoću sunitiniba, sorafeniba, axitiniba i drugih agenasa (130-134).

## LEČENJE MIKROCELULARNOG KARCINOMA BRONHA

Bez terapije, SCLC ima agresivniji klinički tok od bilo koje vrste plućnog tumora, koji je udružen sa ranim lokoregionalnim i udaljenim metastazama, uz medijanu preživljavanja od momenta postavljanja dijagnoze od samo 2 do 4 meseca. Oko 10% bolesnika ima *disease free period* ( period bez bolesti) 2 godine od početka bolesti. Bolesnici s ograničenom bolešću (*limited disease LD*) imaju bolju prognozu od bolesnika sa proširenom bolešću (*extensive disease ED*). Za bolesnike sa ograničenom bolešću medijana preživljavanja je od 16 do 24 meseci i 5-godišnje preživljavanje je 14% do 20%. Kod bolesnika sa proširenom bolešću medijana preživljavanja od 6 do 12 meseci, ali je dugoročno preživljavanje retko (135).

Bolesnike sa ograničenom bolešću treba lečiti primenom polihemioterapije uz zračnu terapiju. Preporučuje se hemioterapijski protokol cisplatin/etoposid. Preporučuje se primena maksimalno 6 ciklusa hemioterapije jer nije ustanovljeno produženje preživljavanja aplikacijom većeg broja ciklusa. Kod bolesnika sa proširenom bolesti preporučuje se primena cisplatine u kombinaciji sa etoposidom. Karboplatin može biti prihvatljiva opcija. Kod određenog broja bolesnika hemioterapija se ne može aplikovati zbog niskog performans statusa i prisutnih komorbiditeta. Kod takvih bolesnika se u sklopu kliničkih trajala aplikovao peroralni etoposid, ali nije pokazao značajan efekat na preživljavanje bolesnika i smanjenje simptoma bolesti, tako da se ne preporučuje u terapiji prve linije.

## RADIOTERAPIJA U LEČENJU KARCINOMA BRONHA

Radioterapija (RT) predstavlja važan modalitet u lečenju malignih bolesti. Procenjuje se da se oko 50% svih obolelih od malignih bolesti leči i radioterapijom. Radioterapija se može primeniti kao:

1. neoadjuvantna (indukciona), samostalna ili u kombinaciji sa hemioterapijom u cilju „*down-staging-a*“,
2. primarna, samostalna (definitivna) kod bolesnika sa inoperabilnim ili neresektabilnim nemikrocelularnim karcinomom bronha (NSCLC – *Non-Small Cell Lung Cancer*),
3. palijativna, kod bolesnika sa nekurabilnim NSCLC i
4. adjuvantna, postoperativna kod bolesnika sa resektabilnim NSCLC (136).

U okviru planiranja različitih shema RT razmatraju se, pored ukupne doze i: doza po frakciji, broj frakcija na dan, broj frakcija u toku nedelje i način primene. Kontinuirana RT se sprovodi neprekidno (izuzev u dane vikenda) u ukupnoj dozi od 50-65 Gy koristeći 1.8-2.0 Gy po frakciji dnevno, odnosno 5 dana (frakcija nedeljno). „*Split-course*“ se sprovodi po brzom hiperfrakcionisanom režimu, odnosno 2.5-4.0 Gy po frakciji, 5 dana (frakcija) nedeljno, nakon

čega sledi 3 nedelje pauze te se ceo ciklus potom ponavlja. Kod hipofrakcionisanja se koristi smanjen broj frakcija sa većom dozom zračenja po frakciji (>3 Gy dnevno), jednom do tri puta nedeljno, u ukupnoj dozi koja je ista ili nešto manja od konvencionalne. Kod hiperfrakcionisanja se koriste manje doze po frakciji, ali sa više frakcija na dan (2-3), a ubrzana hiperfrakcionisana terapija se takođe primenjuje 2-3 puta dnevno, ali su doze po frakciji uobičajene, čime se vreme tretmana skraćuje (136).

Radioterapijski principi su se dramatično promenili sa pojavom trodimenzionalnog planiranja tokom 1980-ih godina i nastavljaju da se menjaju u pogledu implementacije novih tehnologija. CT-simulacija i trodimenzionalni sistem planiranja (3DTPS – *Three-Dimensional Radiation Treatment Planning System*) obezbeđuju uslove za izvođenje 3D konformalne radioterapije (3DCRT – *3D Conformal Radiation Therapy*), koja se danas rutinski koristi u kliničkoj praksi u cilju isporuke velike doze zračenja u ciljno tkivo sa maksimalnom poštedom okolnih zdravih tkiva i organa (138).

### **Radioterapija za NSCLC**

RT predstavlja efikasan metod lečenja za lokalnu kontrolu bolesti i može se koristiti kao definitivni metod lečenja kod selektiranih bolesnika. Zbog svojih karakteristika RT se obično dobro podnosi, a obezbeđuje i dobru palijaciju simptoma pogotovu kod inoperabilnih bolesnika. Palijativna korist od primene RT se ogleda u kontroli simptoma kao što su: hemoptizije, kašalj, otežano disanje, bol, anksioznost, umor, i poteškoće u spavanju. Radioterapija može da se koristi samostalno ili u kombinaciji sa hemioterapijom (139). Istovremena primena HT i RT predstavlja način da se iskoristi sinergizam različitih modaliteta lečenja u cilju postizanja što bolje lokalne kontrole bolesti, ali i metastatske diseminacije. Konkurentni režimi mogu biti kraći u ukupnom trajanju, ali sa ispoljenom većom toksičnošću što može voditi redukciji prethodno planirane doze. Rezultati aktuelnih trajala ukazuju na poboljšanu stopu preživljavanja obolelih od uznapredovalog NSCLC koji su lečeni konkurentnim režimima sa HT baziranoj na platini (140).

**Postoperativna RT za NSCLC.** Uloga post-operativne radioterapije (PORT) u lečenju NSCLC je nejasna. Aktuelno, dostupni podaci ukazuju da je PORT indikovana za stadijume II i III (N pozitivni), ali ne i u stadijumu I NSCLC. Međutim, još uvek se polemise u kojim slučajevima je opravdana primena PORT i u kojim slučajevima je opravdana primena RT sa ili bez (pre, u toku i posle) hemioterapije (141). uloga PORT za NSCLC i dalje ostaje kontroverzna. PORT popravljaja lokalnu kontrolu, naročito u slučajevima N pozitivnih II i III stadijuma, ali je njen efekat na preživljavanje nejasan. nove studije sugerišu da PORT može poboljšati ne samo lokalnu kontrolu već i preživljavanje za pN2. Bolesnici sa pN2/IIIA

stadijumom predstavljaju grupu za primenu PORT pored adjuvantne HT. (Idealno, PORT bi trebalo sprovoditi korišćenjem najboljih tehnologija, kao što su 3D konformalna RT), sa limitirajućom dozom na okolne vitalne organe i dozom isporučenom na target ne većom od 54 Gy (142, 143).

### **Stereotaktična ablativna radioterapija**

Stereotaktična ablativna radioterapija (SABR - *Stereotactic Ablative Radiotherapy*), poznata i kao stereotaktična telesna radioterapija (SBRT- *Stereotactic Body Radiotherapy*) koristi napredne tehnike imobilizacije i jedinstveno polje zračenja u isporuci precizne oligofrakcionisane radioterapije u ciljno tkivo kod različitih vrsta tumora. SABR je ustanovljena kao tehnološki inovativna terapija za rani stadijum NSCLC, a vremenom je prerasla u standardnu terapijsku opciju kod inoperabilnih bolesnika. SABR je radiobiološki jedinstvenija u odnosu na konvencionalnom frakcioniranom radioterapijom (*Conventionally Fractionated Radiotherapy – CFRT*). Red veličine doze po frakciji iznosi 10-20 Gy u komparaciji sa 1.8-2 Gy kod konvencionalnog frakcionisanja. Ovim ablativnim efektom je pogođeno i normalno okružujuće tkivo, te se kao imperativ navodi izbegavanje nepotrebne toksičnosti zdravog tkiva. Poboljšanje u određivanju preciznih targeta, dozimetriji i isporuci zračenja dovela je do poboljšanja poštode zdravog tkiva i učinila ove visoke doze zračenja po frakciji veoma učinkovitim uprkos mogućim neželjenim efektima (144). Kod bolesnika sa stadijumom I NSCLC, SABR obezbeđuje značajno duže petogodišnje preživljavanje u odnosu na konformalnu 3DRT. SABR se takođe može koristiti i u slučajevima limitiranog broja plućnih metastaza i u palijativne svrhe. Rezultati studija ukazuju da se SABR može koristiti i za palijaciju skeletenih, moždanih i jetrenih metastaza (145, 146).

## **1.2. BETA ESTROGEN RECEPTOR U KARCINOMU BRONHA**

Razlike u ispoljavanju karcinoma bronha među polovima primećene su u poslednjih nekoliko decenija. U ovim epidemiološkim karakterisitkama prvo je uočena razlika u pušačkom statusu među polovima i prema tim podacima značajno je veći broj žena nepušača koje imaju karcinom bronha što upućuje na zaključak da postoje polom uslovljene razlike u nastanku ove bolesti i da su za to verovatno odgovorni polni hormoni. Primer za to je podatak da su oko 15% žena sa karcinomom bronha nepušači, a muškaraca nepušača sa karcinomom bronha ima oko 5%, kao i da su 20% muškaraca i 50% žena sa karcinomom bronha imali i druge faktore rizika za nastanak karcinoma bronha bez obzira na pušački status (147). Multicentrična studija iz 2007. g. pokazala je da je incidenca karcinoma bronha za žene



nepušače mnogo veća, 14.4-20.8 na 100,000 stanovnika godišnje, u odnosu na incidencu kod muškaraca nepušača koja je iznosila 4.8-13.7 (148). Ovakvi epidemiološki pokazatelji usmerili su istraživače u pravcu ispitivanja uticaja ženskih polnih hormona estrogena i progesterona na ulogu u kancerogenezi karcinoma bronha. Studije su pokazale da su estrogeni receptori (ER), posebno ER beta ( $ER\beta$ ) i progesteronski receptori (PR) ekspresovani u karcinom pluća kod ljudi. Studije su takođe pokazale da je  $\beta$ -estradiol promotor tumorske proliferacije u karcinomu bronha kao i da davanje ER antagonista smanjuje tumorsku proliferaciju u NSCLC ćelijskim linijama u xenograf modelu tumora (149). Ovakvi rezultati potvrđuju pretpostavku da estrogen signalni put sa ostalim hormonskim signalnim putevima igra značajnu ulogu u tumorskoj kancerogenezi.

### **1.2.1. Estrogen i karcinom bronha**

Uticaj estrogenog signalnog puta u različitim fiziološkim mehanizmima kao i u tumorskog kancerogenezi ispituje se nekoliko poslednjih decenija, naročito u oblasti karcinogeneze karcinoma dojke. Estrogeni receptori su dobro poznata superfamilija nukleusnih steroidnih receptora, pri čemu postoje dva tipa ovih receptora: estrogen receptor beta ( $ER\beta$ ) i estrogen receptor alfa ( $ER\alpha$ ). Oni imaju uticaj na ćelijske funkcije preko svojih liganda koji su fiziološki i normalno prisutni estrogeni u cirkulaciji: estron,  $17\beta$ -estradiol i estriol (150). Estradiol je prvenstveno reproduktivni hormon koji je sintetiše u ovarijumima, dok se estron i estriol sintetišu u jetri iz estradiola. Ova dva ER,  $ER\alpha$  i  $ER\beta$  su produkti odvojenih gena, ESR1 i ESR2, pri čemu je ESR1 je lokalizovan na hromozomu 6 dok je ESR2 lokalizovana na hromozomu 14. Prvi je otkriven  $ER\alpha$ , 1986.g. pri čemu je ovaj receptor najispoljeniji u tkivu dojke, jajnika i endometrijuma, da bi potom bio otkriven i  $ER\beta$  1996. g. čiji je nivo najviši u tkivu pluća, bubrega, kolona, kostima, mozgu, endotelnim ćelijama, prostati, jajnicima i testisima (151). Oba receptora sadrže funkcionalne domene, AF1 i AF2 koji su uključene u funkcije ćelijskog jedra, odnosno AF1 je ligand nezavisna aktivna domena lokalizovana u blizini amino veza DNK, dok je AF2 lokalizovan na karboksi nastavku i ligand je zavisna domena receptora. Oba ER imaju sličan afinitet za  $17\beta$ -estradiol ali  $ER\alpha$  se veže za  $17\beta$ -estradiol i estron sa većim afinitetom, dok  $ER\beta$  ima veći afinitet za vezivanje sa estriolom (152).

### **1.2.2. Estrogen u normalnom tkivu pluća**

Biološka aktivnost estrogena nije ograničena samo na reproduktivne organe već ima važnu ulogu i na sisteme organa za koje se tradicionalno mislilo da nisu pod uticajem



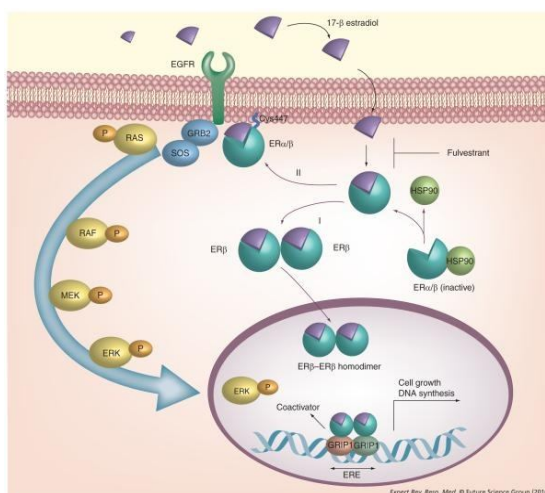
hormona. U plućima ER $\beta$  je visoko zastupljen u pneumocitima i ćelijama bronhijalnog epitela i važna mu je funkcija u održavanju ekstracelularnog matriksa pluća. Gubitak ER $\beta$  eksperimentalnih miševa vezan je za razvijanje plućnih abnormalnosti i sistemske hipoksije kod njih (153). U istraživanju u kome su upoređivani miševi sa prisustvom ER $\beta$  ili inaktivisanom ER $\beta$ , nađeno je da u miševa kod kojih je ER $\beta$  inaktivisan, postoji smanjen broj alveola, smanjenje nivoa surfaktanta, smanjenje nivoa trombocitnog faktora rasta i granulocitno makrofagnog kolonostimulišućeg faktora (154).

### 1.2.3. Ekspresija estrogenog receptora beta - ER $\beta$ u karcinomu bronha

Ispitivanje estrogenih receptora u tkivu tumora pluća datira od 1980-te g. Od tada potiču najranija istraživanja u ovoj oblasti, istraživanje *Beattie*-a i autora koji su ispitali ekspresiju steroidnih hormonskih receptora u 55 resekata NSCLC. Rezultati su pokazali da je u zdravom tkivu pluća postojala ekspresija ovih receptora u 33% uzoraka, a slična ekspresija postojala je i u tkivu adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma bronha (155). Prisustvo ER, naročito ER $\alpha$  u tumorima pluća ima konverznu ulogu. Ovaj receptor, kao ligand aktivisani transkriptivni faktor, reguliše transkripciju različitih estrogen ciljnih gena i povezan je sa razvojem estrogen zavisnih karcinoma kao što su karcinom dojke i endometrijalni karcinom. Ekspresija ovog estrogenog receptora povezana je sa dobrom prognozom u ovih tumora. U hepatocelularnom karcinomu kao i u karcinomu želuca povećana je ekspresija ER $\alpha$  i ona je različita po polu. Brojna istraživanja nisu pokazala značajnost ovog receptora niti kliničkopatološku perspektivu u karcinomu bronha (156-160).

Ekspresija ER $\beta$  je mnogo više prisutna u karcinomu bronha i kreće se od 9%-98%, ali je u većini studija ekspresija bila iznad 30% (161-168). Slično kao kod karcinoma dojke, dodavanje  $\beta$ -estradiola stimuliše rast tumorskih ćelija u eksperimentima na ćelijskim kulturama. *In vivo* studijama administracija estradiola stimuliše rast tumorskih ćelija u miševa. Ovakvi rezultati prikazani su u studiji *Hammoud*-a sa saradnicima, koji su izučavali efekat estradiola u adenokarcinomu miševa i pronašli ekspresiju onkogene forme K-ras familije sa istovremenom delecijom na Tp53 (169). Rezultati iste studije pokazali su i da se volumen tumora smanjuje otklanjanjem jajnika miševa, kao i da estradiol povećava nivo tumorskih ćelija. Sve ovo ukazuje na hipotezu da je etrogeni signalni put u karcinomu bronha sličan onom u karcinomu dojke, iako postoje i znatne razlike u značaju estrogena koji ima glavnu ulogu u nastanku karcinoma dojke, dok u karcinomu bronha estrogen ima veću ulogu u progresiji tumora i metastatskom širenju bolesti (170-172).

Leterarni podaci ukazuju na to da estrogene imaju uticaj u karcinogenezi karcinoma bronha genomskim i negenomskim signalnim putevima. U klasičnom modelu genomskog signalnog puta, ligandi se vežu za ER što se rezultuje u obliku homodimera i heterodimera. Kompleks ligand-receptor veže se za estrogen odgovorne elemente (estrogen *response elements*- ERE) u okviru promotera estrogen odgovornih gena koji iniciraju transkripciju ciljnih gena (173). Negenomski signalni put estrogena može da se odvija aktivacijom epidermalnog faktora rasta (*epidermal grow factor receptor*- EGFR), mitogen aktivisanom protein kinazom 1 (MAPK1), ili membranski asociranim estrogenim receptorima (174). U više studija *in vitro* pokazano je da membranski asocirani ER koji su ko-lokalizovani sa EGFR i 17 $\beta$ -estradiol rezultuju u brzom fosforilaciji MAPK signalnog puta u ćelijskim linijama karcinoma bronha i tako indikuju membranski signalni put u NSCLC od strane ER (175-177). Postoji dokaz da postoji povratni mehanizam (*feedback*) između ER i EGFR koji je regulisan od strane EGFR proteinske ekspresije, tako što primena antiestrogena i smanjenja ER $\beta$  ekspresije postoji kod primene inhibitora EGFR. Najnoviji podaci pokazuju i da mitohondijalni ER $\beta$  mogu imati ulogu u inhibiciji apoptoze preko interakcije sa proapoptičnim proteinom Bad kao i prekidanjem Bad-Bcl-XL i Bad-Bcl2 interakcije (178). Mehanizam navedenih signalnih puteva uzrokovanih aktivnošću ER $\beta$  u karcinomu bronha pokazana je na Slici 5.



Slika 5. Estrogen receptor-posredovan signalni put u karcinomu bronha

#### 1.2.4. Prognošički uticaj beta estrogenog receptora (ER $\beta$ ) u karcinomu bronha

Broj objavljenih radova o ekspresiji hormonalnih receptora u karcinomu bronha raste, rezultati prekliničkih studija pokazuju njihovu značajnu ulogu u karcinogenezi tumora bronha, ali je još uvek nemoguće ovakve rezultate primeniti u kliničkoj praksi. Još uvek nije poznato da li hormonski receptorski status u karcinomu bronha može predstavljati prognošički faktor i

da li može uticati na izbor terapijskog tretmana. Više studija bavilo se ispitivanjem ER kao prognostičkog faktora u karcinomu bronha, pri čemu su neke studije pokazale da je ekspresija ER povezana sa dobrom prognozom bolesti (179-184), dok su opet druge studije pokazale suprotno (185-190). Neke od studija su pokazale da je ER status dobar prognostički faktor ali samo za osobe muškog pola, kao i da je prisustvo ER $\beta$  u žena vezan za lošiju prognozu bolesti (191,192).

### **1.2.5. Beta estrogen receptor (ER $\beta$ ) kao prediktivni marker u terapiji karcinoma bronha**

Postoje predlozi ali ne i klinički odobreni trajali sa upotrebom hormonske terapije u karcinomu bronha. Hormonska terapija se odavno koristi u karcinomu dojke, a nova ispitivanja idu u pravcu upotrebe istih u terapiji karcinoma bronha. Nekoliko predkliničkih studija je pokazalo da hormonska terapija utiče na smanjenje rasta tumora u eksperimentima *in vivo*, pri čemu su korišteni imunokompromitovani xenografti sa ER pozitivnim tkivom karcinoma bronha koji su tretirani estradiolom, estradiolom sa fulvestrantom ili samo fulvestrantom. Kod tumorskog tkiva koje je bilo tretirano estradiolom došlo je do porasta tumora, dok je tretman sa fulvestrantom doveo do smanjenja tumorskog rasta za 40% (193). Neke od studija su evaluirale dodavanje fulvestranta inhibitorima EGFR sa ciljem blokiranja istovremeno ER i EGFR signalnih puteva. Rezultati su ukazali na bolju inhibiciju tumorskog rasta (194-198). Slični rezultati dobijeni su i u studijama kod kojih je korištena kombinacija vandetaniba (inhibitor VEGFR i EGFR) kojima je dodavan fulvestrant čime je dobijena inhibicija rasta tumora u xenograftima, poredeći rezultate upotrebe ovih terapijskih modaliteta ponaosob (195,196).

Ispitivano je i dejstvo selektivnih estrogen receptor modulatora (SERMs) kao što su tamoxifen i raloxifen. Više faza studija ispitivalo je uticaj dodavanja ovih hormonskih modulatora platinskim hemioterapijskim režimima nesitnoćelijskih karcinoma bronha. Terapijski odgovor je iznosio 18-25% u pacijenata koji su prethodno primali terapiju baziranu na platinskom režimu, a koji su kasnije primali kombinovani terapijski tretman (platinski hemioterapijski protokoli sa SERMs). Došlo se do zaključka da je dodavanje hormonskih modulatora (SERMs) omogućilo prevazilaženje rezistencije na platinski režim inhibicijom protein kinaza C signalnog puta (197-200).

Rađene su i studije u kojima je ispitivan značaj postmenopausalno primenjene hormonske terapije, (hormon replacement therapy – HRT) i nastanka karcinoma bronha. Neke od studija su pokazale da ova terapija nema uticaja na incidencu i stopu mortaliteta karcinoma

bronha u ispitivanih žena, dok su druge studije kojoj će se verovatno po rezultatima pridružiti i randomizovani klinički trajal Organizacije WHI (Women's Health Initiative), pokazale da nema značajnijeg pada incidence karcinoma bronha kod postemopauzalnih žena koje su primale HRT, ali je značajan pad stope mortaliteta karcinoma bronha u ispitivanih. Ovakve studije potvrđuju da postoje partikule estrogenih receptora u NSCLC koji su osetljive na hormonski uticaj, bio on intratumorski ili sistemski (201,202).

U toku su rane faze trajala koji imaju za cilj identifikaciju prethodno navedenih traget lokusa i njihovu moguću upotrebu u hormonskoj terapijskoj strategiji za ovu grupu pacijentkinja. Jedna od studija koja se bavila ispitivanjem hormonskih receptora u karcinomu bronha i mogućnosti upotebe hormonske terapije u ovoj bolesti, bila je studija koju su objavili Traynor sa autorima, faza I trajal, u kojoj su ispitivane pacijentkinje koje su bile u postmenopauzi sa odmaklim NSCLC pri čemu su primale kombinovanu terapiju (tirozin inazni inhibitor - Gefitinib sa hormoskom terapijom - Fulvestrant). Primarni cilj studije bilo je ispitivanje bezbednosti navedene kombinovane terapije, a studija je imala za cilj i ispitivanje molekularnih prediktora terapije. U studiju su bile uključene 22 pacijentkinje u postmenopauzalnom periodu života sa dijagnostikovanim karcinomom bronha u stadijumu IV. Pacijentkinje su primale dnevnu terapiju sa gefitinibom i jedan put mesečno terapiju sa injekcijom Fulvestranta. Rezultati su pokazali dobru podnošljivost kombinovane terapije, dobijena toksičnost bila je uglavnom posledica progresije bolesti. Efikasnost terapije nije bila primarni ispitivani cilj ali su dobijeni sledeći rezultati: ukupan odgovor na terapiju – overall response rate (ORR) od 15%; period bez progresije bolesti – progresion free survival (PFS) od 12 nedelja i ukupno preživljavanje – overall survival (OS) od 38.5 nedelja. Takođe je dobijeno da je visoko pozitivan nalaz ER $\beta$  u tkivu tumora povezan sa ukupnim preživljavanjem od čak 65.5. nedelja u odnosu na 21 nedelju kod pacijentkinja sa niskom ili nepostojećom ekspresijom ovog receptora. U studiji nije ispitivan EGFR receptorski status, te nije potpuno jasno da li je duže preživljavanje vezano za ulogu Gefitiniba u EGFR pozitivnih pacijentkinja pri čemu je kod ovih pacijenkinja vikoka i ER $\beta$  ekspresija (203). Zbog toga rezultati ove studije ne mogu obezbediti definitivan zaključak o upotrebi antiestrogena u karcinomu bronha iako pokazuju da ER ekspresija može biti prediktor za primenu hormonske terapije u karcinomu bronha. Svakako dobijeni rezultati upućuju na potrebu izvođenja većih trajala koji bi se bavili ispitivanjem uticaja hormonskih receptora u karcinomu bronha i mogućnosti pridruživanja hormonske terapije ostalim terapijskim modalitetima u tretmanu ove bolesti.

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Kao jedan od mogućih faktora koji utiču na uzlazni trend pojave karcinoma bronha kod žena pored pušenja, navodi se i hormonalni status (estrogeni status), tim pre što je procenat pušača u ženskoj populaciji obolelih od karcinoma pluća još uvek manji nego u muškoj populaciji. Estrogeni se mogu ponašati kao promotori u procesu kancerogeneze, preko receptor posredovanih mehanizama, preko kojih dovode do ćelijske proliferacije. U dosadašnjim radovima imunohistohemijski je dokazano uglavnom negativno prisustvo ER $\alpha$  u zdravom tkivu pluća kao i u tkivu karcinoma pluća, dok je ER $\beta$  bio signifikantno povišen u tkivu tumora pluća u odnosu na zdravo tkivo. Takođe je njihov nivo bio najviši u adenokarcinomu u odnosu na druge patološke tipove tumora. Dalja ispitivanja rađena su u pravcu različitosti među polovima i uticajnu ER na preživljavanje obolelih od karcinoma bronha.

Prema ovome smo definisali ciljeve našeg istraživanja:

1. Određivanje terapijskog odgovora kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma pluća prema prisutnosti beta estrogenog receptora u tkivu tumora.
2. Ustanoviti kakvo je preživljavanje pacijenata sa adenokarcinomom pluća prema prisutnosti beta estrogenog receptora (ER $\beta$ ) u tkivu tumora.
3. Utvrditi razlike u preživljavanju i terapijskom odgovoru po polu, a prema estrogen beta receptorskom statusu.
4. Beta estrogen receptor može biti prognostički faktor za pacijente sa adenokarcinomo pluća

Hipoteze koje je ova doktorska disertacija postavila bile su:

1. Bolji terapijski odgovor kod beta estrogen pozitivnih pacijenata.
2. Duže preživljavanje obolelih od adenokarcinoma pluća kod beta estrogen pozitivnih pacijenata.
3. Postoje razlike u prisutnosti beta estrogenih receptora u tkivu tumora adenokarcinoma pluća među polovima, bolji terapijski odgovor i duže preživljavanje u estrogen beta pozitivnih pacijenata muškog pola.
4. Pozitivan beta estrogen receptor je povoljan prognostički faktor u pacijenata sa adenokarcinomom pluća.

### 3. MATERIJAL I METODE:

#### 3.1. ISPITANICI

Doktorska studija je delom retrospektivnog, a delom prospektivnog karaktera. Studija je u potpunosti izvedena u Institutu za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Studija je obuhvatila ukupno 200 pacijenata kod kojih je u toku 2006, 2007. i 2008. g. citološki i patohistološki postavljena dijagnoza adenokarcinoma bronha. Prisutnost ER $\beta$  ispitivana samo na patohistološkim uzorcima tkiva tumora za sve ispitanike. Pacijenti su potom praćeni do 2010, 2011. godine ili do datuma koji je označen kao datum smrti. Svi pacijenti koji su odlučili da učestvuju u studiji su informisani o procedurama, potencijalnim benefitima i rizicima i svi su potpisali informisani pristanak. Svi bolesnici uključeni u studiju morali su ispunjavati sve kriterijume za uključenje, a nisu smeli imati ni jedan kriterijum za isključenje iz studije.

Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su:

- oba pola starija od 18 godina
- histološki dijagnostikovani ADENOKARCINOM pluća
- svi klinički stadijumi bolesti
- performans stadijum ECOG skalom (0-2)

Kriterijumi za isključenje iz studije:

- pacijenti sa komorbiditeta koji po ACE-27 indeks skali komorbiditeta odgovaraju oceni 2 i 3
- postojanje neke druge maligne bolesti
- korišćenje ranije hormonske terapije

U uzorku su bili analizirani:

- demografski podaci (pol, status i za žene fertilni period)
- pušački status ( broj godina pušenja i broj cigareta na dan)
- simptomi i znaci bolesti
- stadijum bolesti (Prilog 1)
- performans stadijum (Prilog 2)
- način lečenja

- procena terapijskog odgovora (Prilog 3)
- preživljavanje po mesecima

Za ispitivanje prisutnosti beta estrogen receptora korišteni su uzorci tkiva adenokarcinoma pluća dobijeni biopsijom uzetom pri bronhoskopiji ili uzetom pri operaciji sa tkiva tumora. U uzetom materijalu prisustvo beta estrogenog receptora određeno je imunohistohemijском metodom.

Odabrani uzorci tkiva za histološku analizu fiksirani su u 10% formalinu, ukalupljeni u parafin i sečeni na rezove debljine 5 $\mu$ . Deparafinisani tkivni isečci su bojeni metodom hematoksilin-eozin (HE) I analizirani. Na osnovu HE bojenih preparata izabran je reprezentativan uzorak za imunohistohemijска ispitivanja.

### **3.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA METODA (IHH)**

Za imunohistohemijсke analize su korišćeni uzorci tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafin, sečeni na preseke debljine 4 $\mu$ . Posle deparafinizacije i blokiranja endogene peroksidaze sa 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 minuta, isečci su zbog demaskiranja antigena, tretirani u 10mM citratnom puferu (0,1 M limunska kiselina, 0,1 M natrijum citrat C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, pH 6,0) u mikrotalasnoj rerni, 2x10 minuta, nakon čega su ispirani dejonizovanom vodom. Imunohistohemijска identifikacija ispitivanih antigena je vršena primenom standardne ABC tehnike. Primanjeno je primarno monoklonsko antitelo u optimalnim ili komercijalnim koncentracijama (ECL, Amersham Pharmacia Biotech): Estrogen receptor (beta), Clone EMR02, NCL-ER-beta, Novocastra.

#### **Imunohistohemijска analiza estrogen receptora**

Za određivanje ekspresije hormonskih receptora u uzorcima tumorskog tkiva korišćena je imunohistohemijска metoda upotrebom estrogen primarnog antitela koji markira nuklearne steroidne receptore. Ekspresija estrogen receptora je procenjivana semikvantitativno prema procentu tumorskih ćelija čija su jedra bila jasno ili intenzivno obojena crvenkasto-smeđe. Imunohistohemijсko bojenje tumačeno je kao pozitivno u slučajevima kada je više od 10% tumorskih ćelija pokazivalo jasnu bojenu reakciju.

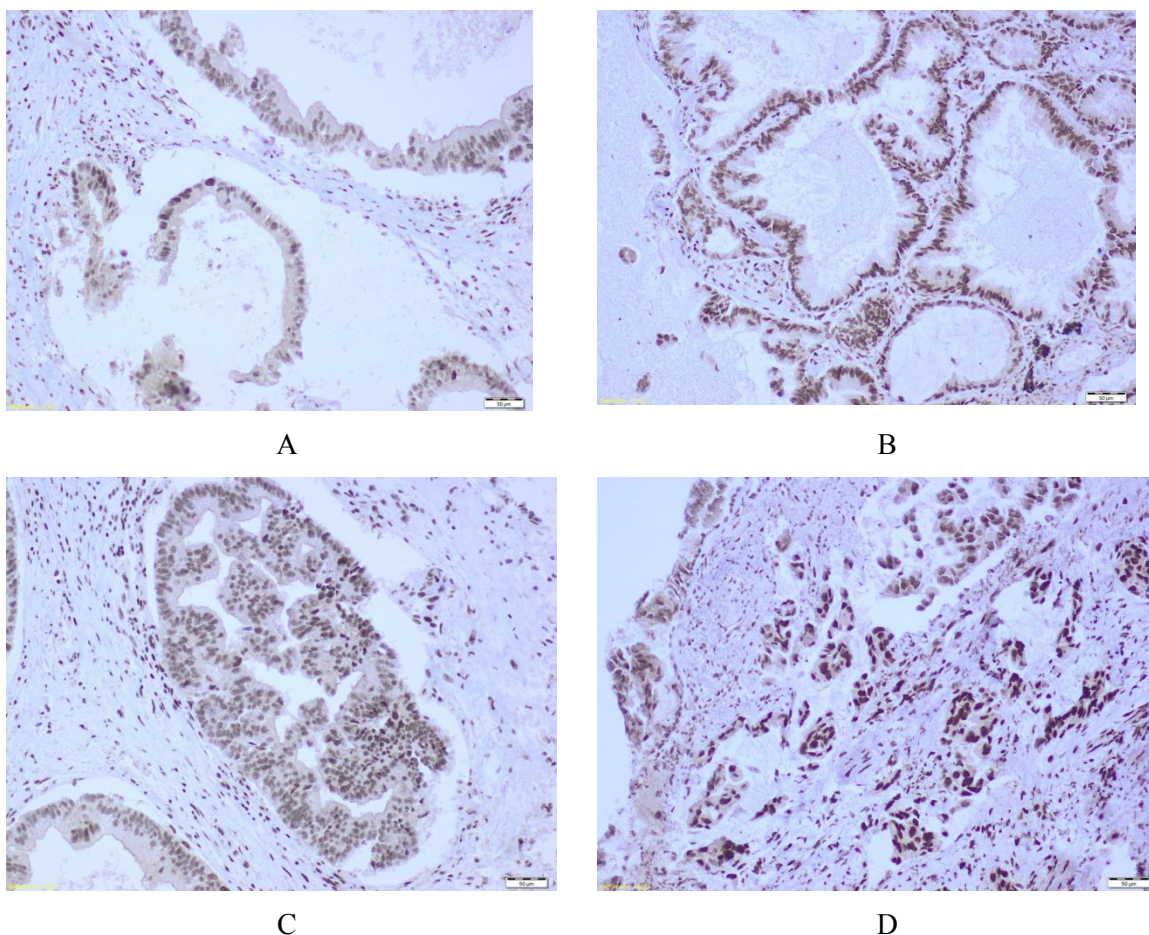
Svi tumori podeljeni su u četiri grupe:

- negativan receptorni status: negativna reakcija ili  $\leq 10\%$  pozitivnih tumorskih ćelija,
  - pozitivan receptorni status
- Skor 1: pozitivna reakcija u 11-30% tumorskih ćelija



- Skor 2: pozitivna reakcija u 31-50% tumorskih ćelija
- Skor 3: pozitivna reakcija u više od 50% tumorskih ćelija

Tokom statističke obrade, svi nivoi pozitivne ekspresije hormonskih receptora, skor 1, skor 2 i 3, prevedeni su u jednu, sveobuhvatnu pozitivnu grupu.



*Slika 6. (A. B. C. D.): Imunohistohemijska analiza estrogen receptora - pozitivno bojenje - pozitivan nalaz beta estrogenog receptora u adenokarcinomu pluća - pozitivan receptorski status*

Uzorak je podeljen u dve grupe, A grupa - 100 žena i B grupa - 100 muškaraca, sa histološki postavljenom dijagnozom adenokarcinoma pluća, a obe grupe su bile podeljene u dve podgrupe prema estrogenom statusu, odnosno obe grupe su imale podgupu pacijenata estrogen beta tumor negativnog statusa i podgrupu pacijenata estrogen beta tumor pozitivnog statusa.

Kumulativno preživljavanje praćeno je u obe grupe (A grupa i B grupa) i računato je od momenta postavljanja dijagnoze do nastupanja smrtnog ishoda ili do kraja 2011. g.



Kao izvor podataka korištene su istorije bolesti i Onkološki kartoni ispitivanih pacijenata, odnosno registar malignih bolesti grudnog koša Instituta za plućne bolesti Vojvodine.

### **3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

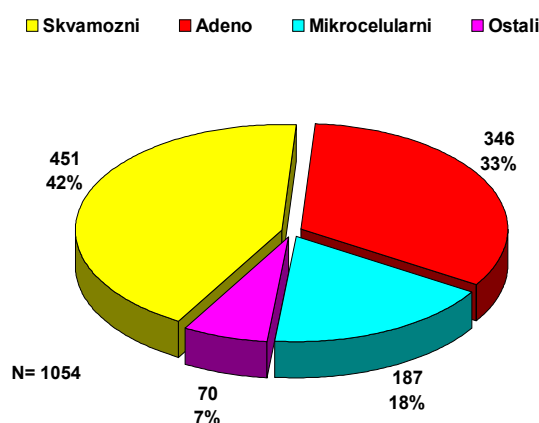
Podaci su uneti u kompjutersku bazu podataka pri čemu je korišten program SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Analiza podataka koristila je deskriptivne statističke metode, apsolutne frekvencije i procene. Značajnost razlika testirana je parametarskim i neparametarskim testovima (T-test,  $\chi^2$  test).

Kumulativna preživljavanja prikazana su Kaplan-Meier-ovim krivama. Univarijantna analiza preživljavanja je vršena Mantel-Cox i Breslow analizom.

Multivarijantnom analizom je urađena identifikacija nezavisnih prognostičkih faktora preživljavanja bolesnika sa adenokarcinomom pluća (Cox Regression Analizom). Rezultati su prezentovani tekstualno, tabelarno i grafički.

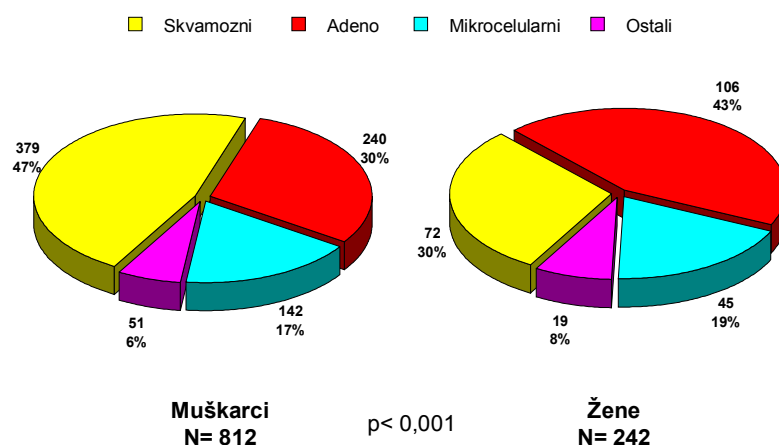
## 4. REZULTATI

U 2006. g. kada je započeta naša studija, broj novotkrivenih slučajeva karcinoma bronha iznosio je 1054. Prema četiri osnovna patohistološka tipa karcinoma bronha najviše je bio zastupljen skvamozni karcinom bronha, potom adenokarcinom, sledio je mikrocelularni karcinom i najmanje zastupljeni ostali tipovi tumora (Grafikon br. 1.).



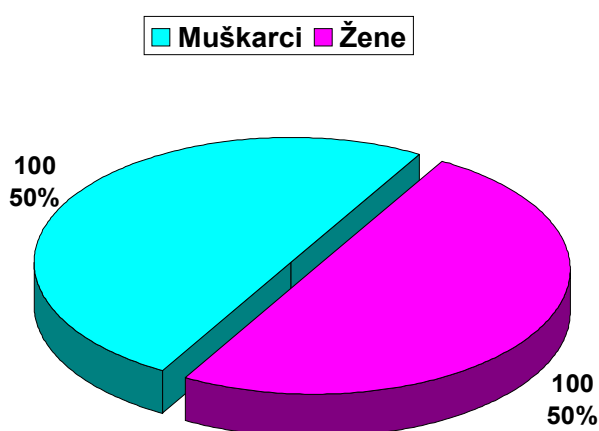
Grafikon 1. Histološki tip karcinoma bronha - 2006. godina

Kod muškaraca u 2006.g. najučestaliji patohistološki tip tumora bio je skvamozni karcinom 379 (47%), sledio je adenokarcinom sa 240 pacijenata (30%), mikrocelularni karcinoma bronha imalo je njih 142 (17%), a ostali tip tumora 51 (6%). U žena adenokarcinom pluća je bio najzastupljeniji patohistološki tip tumora, imalo ga je 106 (43%) pacijentkinja, sledio je skvamozni karcinom bronha sa 72 (30%) žena, mikrocelularni karcinom bronha imalo je 45 (19%) njih i ostali tipovi tumora 45 (19%) žena (Grafikon br. 2.).



Grafikon 2. Histološki tip karcinoma bronha po polu - 2006. godina

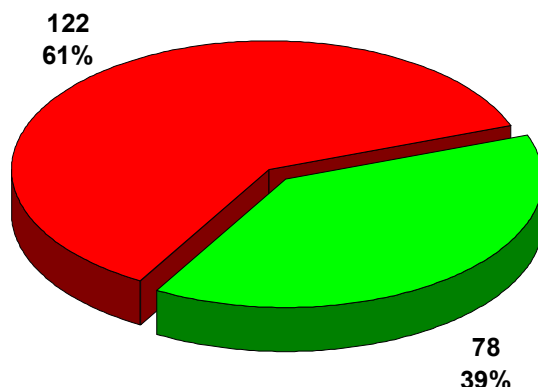
U našoj studiji su ukupno prikupljeni i analizirani podaci za 200 pacijenta (100 ženskog pola i 100 muškog pola) kod kojih je u toku 2006. 2007. ili 2008.g. dijagnostikovano adenokarcinomom pluća u i koji su sistematski praćeni tokom 2010. i 2011. i 2012.g. godine (Grafikon br. 3.).



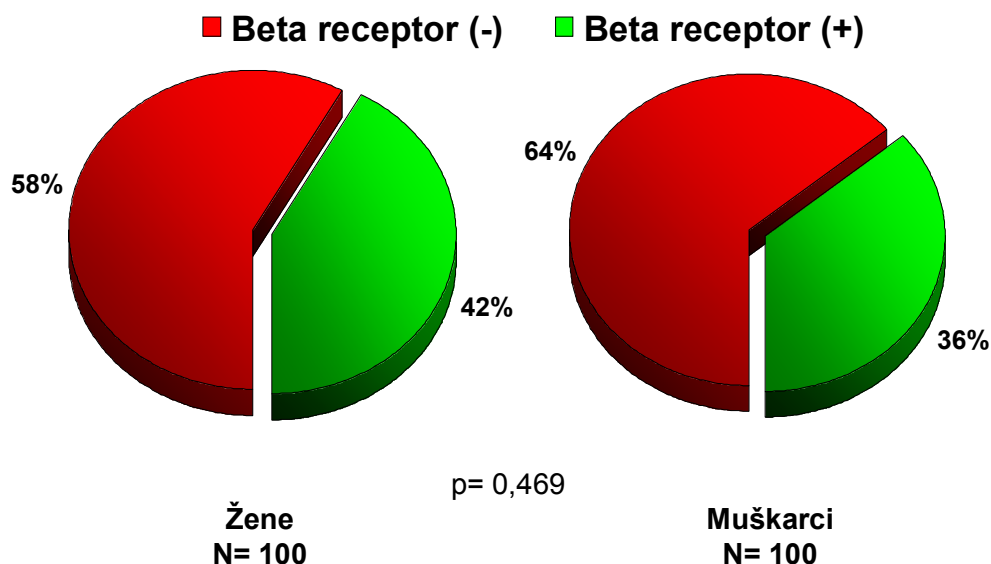
Grafikon 3. Distribucija pacijenata po polu

Sa negativnim nalazom beta receptora u tkivu tumora je bilo 122 pacijenta (61,0%), a sa pozitivnim 78 (39,0%) (Grafikon 4). Među pacijentima muškog pola pozitivan nalaz je imalo 36,0%, a među ženama 42,0%. Nije bilo statistički značajne razlike u nalazu prisutnosti beta receptora u odnosu na pol pacijenata ( $p = 0,469$ ) (Grafikon br. 5.).

■ Beta receptor (-) ■ Beta receptor (+)



Grafikon 4. Distribucija pacijenata u odnosu na nalaz beta receptora



Grafikon 5. Distribucija pacijenata u odnosu na nalaz beta receptora i pol

U studiji je prosečna starost pacijenata je iznosila  $59,4 \pm 9,5$  godine (opseg od 31 - 80 godina). Prosečna starost pacijenata muškog pola je bila  $60,2 \pm 9,2$  godine (opseg od 33 - 80 godina), a pacijenata ženskog pola  $58,6 \pm 9,29$  godine (opseg od 31 - 80 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol ( $p= 0,237$ ).

Prosečna starost pacijenata koji su imali negativan nalaz beta receptora (-) je bila  $58,4 \pm 9,39$  godine (opseg od 31 - 80 godina), a pacijenata koji su imali pozitivan nalaz beta receptora (+)  $61,0 \pm 9,62$  godine (opseg od 35 - 80 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na nalaz beta receptora ( $p= 0,065$ ) (Tabela br. 1.).

*Tabela 1. Prosečna starost pacijenata u odnosu na na pol pacijenata i nalaz beta receptora (p= 0,065)*

<i>Starost pacijenata</i>	<i>N</i>	<i>Prosek</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Beta receptor (-)	122	58,4	9,39	31	80
Beta receptor (+)	78	61,0	9,65	35	80
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>200</i></b>	<b><i>59,4</i></b>	<b><i>9,54</i></b>	<b><i>31</i></b>	<b><i>80</i></b>

Prosečna starost žena koje su imale negativan nalaz beta receptora (-) je bila 57,2±9,40 godine (opseg od 31 - 78 godina), a žena koje su imale pozitivan nalaz beta receptora (+) 60,6±10,3 godine (opseg od 35 - 80 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na nalaz beta receptora (p= 0,083) (tabela 2).

*Tabela 2. Prosečna starost žena u odnosu na nalaz beta receptora (p= 0,083)*

<i>Starost žena</i>	<i>N</i>	<i>Prosek</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Beta receptor (-)	58	57,2	9,40	31	78
Beta receptor (+)	42	60,6	10,3	35	80
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>58,6</i></b>	<b><i>9,88</i></b>	<b><i>31</i></b>	<b><i>80</i></b>

Prosečna starost muškaraca koji su imali negativan nalaz beta receptora (-) je bila 59,6±9,30 godine (opseg od 33 - 80 godina), a muškaraca koji su imali pozitivan nalaz beta receptora (+) 61,4±8,94 godine (opseg od 35 - 80 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na nalaz beta receptora (p= 0,346) (Tabela br. 3.).

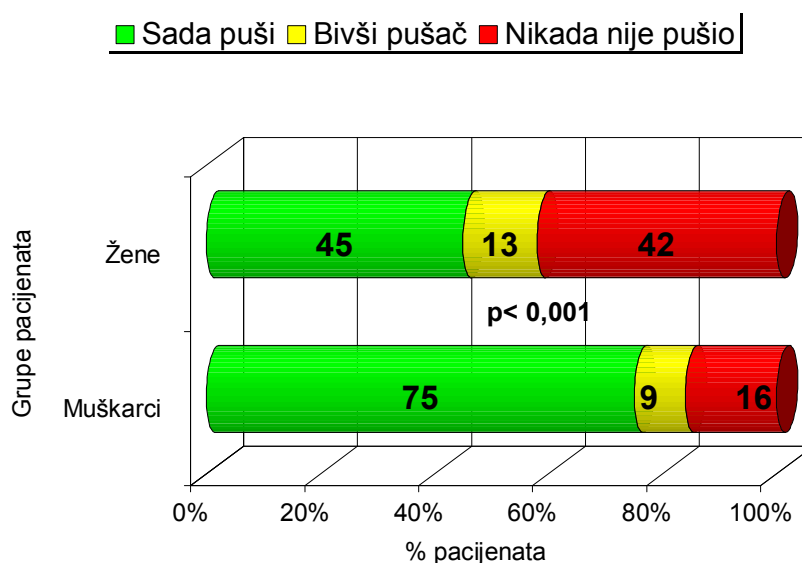
*Tabela 3. Prosečna starost muškaraca odnosu na nalaz beta receptora (p= 0,346)*

<i>Starost muškaraca</i>	<i>N</i>	<i>Prosek</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Beta receptor (-)	64	59,6	9,30	33	80
Beta receptor (+)	36	61,4	8,94	39	76
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>60,2</i></b>	<b><i>9,17</i></b>	<b><i>33</i></b>	<b><i>80</i></b>

Pušačka navika pacijenata je kategorisana kao sadašnji pušač, bivši pušač i nikada nije pušio. U radu je najviše je bilo sadašnjih pušača (60%), zatim pacijenata koji nikada nisu pušili (29%) i bivših pušača (11,0%). Pušačka navika se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ) u odnosu na pol, jer među pacijentima muškog pola ima čak 75% pušača, a kod žena je taj procenat manji i iznosi 45% (Tabela br. 4. i Grafikon br. 6.).

Tabela 4. Pušačka navika pacijenata u odnosu na pol ( $p < 0,001$ )

Pušačka navika	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Sada puši	75	75,0	45	45,0	120	60,0
Bivši pušač	9	9,0	13	13,0	22	11,0
Nikada nije pušio	16	16,0	42	42,0	58	29,0
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>



Grafikon 6. Distribucija pacijenata u odnosu na pol i pušačku naviku

Najviše pacijenata sa pozitivnim beta receptorom je bilo među onima koji nikada nisu pušili (51,7%), zatim kod bivših pušača (36,4%) i najmanje kod pacijenata koji su aktivni pušači (33,3%). Dobijena razlika je na granici statističke značajnosti ( $p = 0,060$ ) (Tabela 5.).

Tabela 5. Beta receptor u odnosu na pušačku naviku pacijenata ( $p= 0,060$ )

Pušačka navika	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Sada puši	80	66,7	40	33,3	120	100
Bivši pušač	14	63,6	8	36,4	22	100
Nikada nije pušio	28	48,3	30	51,7	58	100
<b>Ukupno</b>	<b>122</b>	<b>61,0</b>	<b>78</b>	<b>39,0</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Muškarci koji nikada nisu pušili su imali pozitivan beta receptor u 50,0%, kod aktivnih pušača pozitivan beta receptor je imalo 34,7% i najmanje kod bivših pušača 22,2%. Dobijena razlika nije statistički značajna ( $p= 0,340$ ) (tabela 6). Žene nepušači su imale pozitivan beta receptor u 52,4%, bivši pušači (46,2%) i najmanje žene koje su aktivni pušači (31,1%). Dobijena razlika nije statistički značajna ( $p= 0,126$ ) (Tabela 7.).

abela 6. Beta receptor u odnosu na pušačku naviku - muškarci ( $p= 0,340$ )

Muškarci Pušačka navika	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Sada puši	49	65,3	26	34,7	75	100
Bivši pušač	7	77,8	2	22,2	9	100
Nikada nije pušio	8	50,0	8	50,0	16	100
<b>Ukupno</b>	<b>64</b>	<b>64,0</b>	<b>36</b>	<b>36,0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Tabela 7. Beta receptor u odnosu na pušačku naviku - žene ( $p= 0,126$ )

Žene Pušačka navika	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Sada puši	31	68,9	14	31,1	45	100
Bivši pušač	7	53,8	6	46,2	13	100
Nikada nije pušio	20	47,6	22	52,4	42	100
<b>Ukupno</b>	<b>58</b>	<b>58,0</b>	<b>42</b>	<b>42,0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

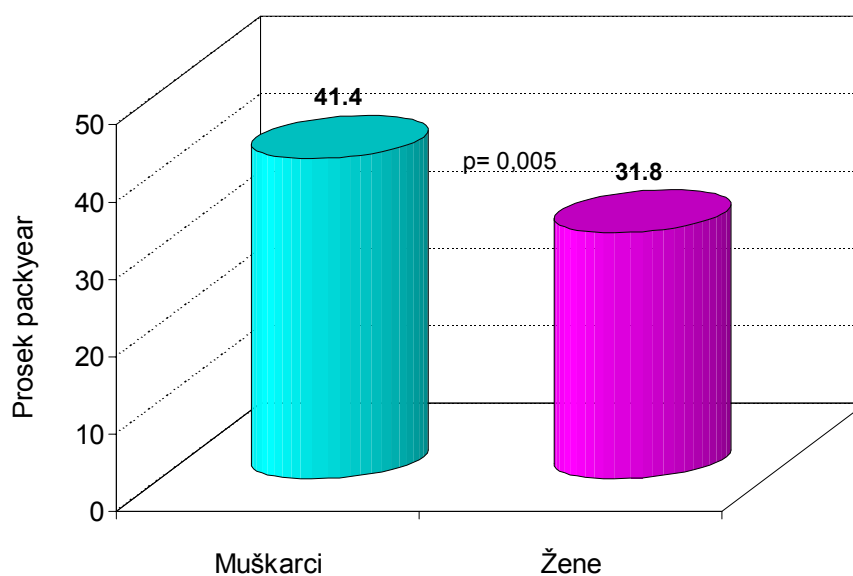
Prosečna količina popušanih cigareta izraženih po packyear metodologiji je bila 37,6 u celoj grupi ispitanika. Kod muškaraca je prosek 41,4, a kod žena 31,8 i razlika je statistički značajna ( $p= 0,005$ ) (Tabela 8 i Grafikon 7). Kod pacijenata sa negativnim nalazom beta receptora ER $\beta$



(-) prosek je bio 35,9, a kod pacijenata koji su ER $\beta$  (+) 40,7 i razlika nije statistički značajna ( $p= 0,175$ ) (Tabela 9.).

Tabela 8. Prosečna upotreba cigareta (packyear) u odnosu na pol pacijenata ( $p= 0,005$ )

<i>Upotreba cigareta</i>	<i>N</i>	<i>Prosek packyear</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Muškarci	85	41,4	19,3	37,3	45,6
Žene	58	31,8	20,0	26,6	37,1
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>143</i></b>	<b><i>37,6</i></b>	<b><i>20,1</i></b>	<b><i>34,2</i></b>	<b><i>40,9</i></b>



Grafikon 7. Prosečna upotreba cigareta (packyear) u odnosu na pol pacijenata

Tabela 9. Prosečna upotreba cigareta (packyear) u odnosu na nalaz beta receptora pacijenata ( $p= 0,175$ )

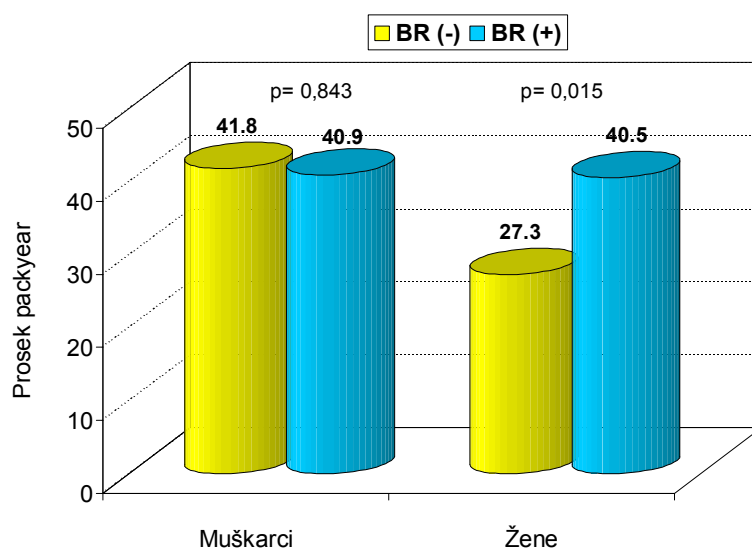
<i>Upotreba cigareta</i>	<i>N</i>	<i>Prosek packyear</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Beta receptor (-)	94	35,9	19,7	5	100
Beta receptor (+)	49	40,7	20,7	8	100
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>143</i></b>	<b><i>37,6</i></b>	<b><i>20,1</i></b>	<b><i>5</i></b>	<b><i>100</i></b>

Prosečna količina popušanih cigareta, izraženih po packyear metodologiji, je bila 41,8 kod muškaraca koji su ER $\beta$ (-), a 40,9 kod muškaraca sa ER $\beta$ (+) ER $\beta$  i razlika nije statistički značajna ( $p= 0,843$ ). Prosečna količina popušanih cigareta je bila 27,3 packyear kod žena koje

su ER $\beta$ (-), a 40,5 kod žena koje su ER $\beta$ (+) i razlika je statistički značajna ( $p= 0,015$ ) (Tabela 10. i Grafikon 8.).

Tabela 10. Prosečna upotreba cigareta (packyear) u odnosu na pol pacijenata i nalaz beta receptora

Upotreba cigareta	N	Prosek packyear	SD	Min	Max	p
Muškarci & BR (-)	56	41,8	20,2	8	100	0,843
Muškarci & BR (+)	29	40,9	17,7	20	90	
Žene & BR (-)	38	27,3	15,3	5	75	0,015
Žene & BR (+)	20	40,5	24,9	8	100	



Grafikon 8. Prosečna upotreba cigareta (packyear) u odnosu na pol i  $\beta$  receptor

Najčešće pridružene bolesti kod ispitivanih pacijenata bile su kardiovaskularne (43,5%), HOBP (23,5%), gastrointestinalne (13,5%) i diabetes melitus (10,5%). Nije postajala statistički značajna razlika u prisustvu pridruženih bolesti u odnosu na pol ispitanika (Tabela 11.).

Tabela 11. Pridružene bolesti u odnosu na pol pacijenata

Pridružena oboljenja	p	Muškarci		Žene		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Kardiovaskularna	0,775	42	42,0	45	45,0	87	43,5
HOBP	0,317	27	27,0	20	20,0	47	23,5
Gastrointestinalna	0,679	12	12,0	15	15,0	27	13,5
Diabetes melitus	1,000	11	11,0	10	10,0	21	10,5
Neurološka	0,591	6	6,0	9	9,0	15	7,5
Psihijatrijska	0,746	6	6,0	4	4,0	10	5,0
Reumatska	1,000	3	3,0	4	4,0	7	3,5
Bubrežna	0,052	11	11,0	3	3,0	14	7,0
<b>Imunološka</b>	<b>0,137</b>	<b>3</b>	<b>3,0</b>	<b>9</b>	<b>9,0</b>	<b>12</b>	<b>6,0</b>

Prosečan broj pridruženih oboljenja (sistema) kod svih pacijenata je bio  $1,20 \pm 1,08$  (opseg od 0-4 sistema). Prosečan broj obolelih sistema kod pacijenata muškog pola je bio  $1,21 \pm 1,08$  (opseg od 0 - 4 sistema), a kod pacijenata ženskog pola  $1,19 \pm 1,08$  (opseg od 0 - 4 sistema) i nije bilo statistički značajne razlike na pol ( $p=0,897$ ) (Tabela 12.).

Tabela 12. Broj obolelih sistema u odnosu na pol ( $p=0,897$ )

Broj sistema	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
0	31	31,0	32	32,0	63	31,5
1	31	31,0	32	32,0	63	31,5
2	28	28,0	24	24,0	52	26,0
3	6	6,0	9	9,0	15	7,5
4	4	4,0	3	3,0	7	3,5
1+	69	69,0	68	68,0	137	68,5
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Najčešći simptomi kod ispitivanih pacijenata bili su kašalj (61,0%), otežano disanje (55,0%), bol u grudnom košu (32,0%) i gubitak telesne težine (22,5%). Osim kod simptoma otežanog gutanja ( $p=0,041$ ) nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol ispitanika (Tabela 13.).

Tabela 13. Prisustvo simptoma u odnosu na pol

Simptomi	p	Muškarci		Žene		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Kašalj	0,664	63	63,0	59	59,0	122	61,0
Hemoptizije	0,782	6	6,0	8	8,0	14	7,0
Smetenje CNS	0,614	3	3,0	1	1,0	4	2,0
Otežano disanje	0,477	52	52,0	58	58,0	110	55,0
Promuklost	1,000	3	3,0	4	4,0	7	3,5
Gubitak težine	0,498	20	20,0	25	25,0	45	22,5
Bol u kostima	0,054	5	5,0	14	14,0	19	9,5
Bol u grudnom košu	0,649	30	30,0	34	34,0	64	32,0
Smetnje u gutanju	0,041	8	8,0	1	1,0	9	4,5
Povišena temperatura	1,000	10	10,0	11	11,0	21	10,5

Najčešći ECOG status kod ispitivanih pacijenata je bio ECOG 1 (74,0%), zatim ECOG 2 (20,5%) i ECOG 0 (5,0%). Žene su češće imale ECOG 2 nego muškarci (26,6%: 15,0%), ali razlika nije bila statistički značajna (Tabela 14.).

Tabela 14. ECOG status u odnosu na pol (p= 0,134)

ECOG	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
0	5	5,0	6	6,0	11	5,5
1	80	80,0	68	68,0	148	74,0
2	15	15,0	26	26,0	41	20,5
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Pozitivan hereditet je imalo 14,0% ispitivanih pacijenata. U odnosu na pol ispitanika nije bilo statistički značajne razlike (p= 0,839) (M - 13,0% : Ž - 15,0%). U odnosu na nalaz beta receptora takođe nije bilo statistički značajne razlike u hereditetu (p= 0,973): beta receptor (-) sa 13,9% i beta receptor (+) sa 14,1% (Tabela 15.).

Tabela 15. Hereditet u odnosu na pol i prema beta receptoru

<i>Hereditet</i>	<i>Bez herediteta</i>		<i>Sa hereditetom</i>		<i>p</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
Muškarci - 100	87	87,0	13	13,0	0,839
Žene - 100	85	85,0	17	15,0	
beta receptor (-) (n=122)	105	86,1	17	13,9	0,973
beta receptor (+) (n=78)	67	85,9	11	14,1	
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>172</i></b>	<b><i>86,0</i></b>	<b><i>28</i></b>	<b><i>14,0</i></b>	

Prosečan indeks telesne mase (ITM) kod svih pacijenata je bio 24,1±3,76 (opseg od 16,0- 42,2 kg/m<sup>2</sup>). Prosečan ITM muškaraca je bio 23,6±3,11 (opseg od 17,3 - 32,9), a kod pacijenata ženskog pola 24,6±4,27 (opseg od 16,0 - 42,2) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol (p= 0,062). Grupisanjem pacijenata na osnovu ITM (pothranjen, normalan i gojazan) dobijeno je da su pacijentkinje statistički značajno češće bile gojazne (p= 0,032) (tabela 16). Prosečan ITM kod pacijenata sa negativnim beta receptorom je bio 24,3±4,11 (opseg od 17,3 - 42,2), a kod pacijenata sa pozitivnim nalazom beta receptora 23,8±3,13 (opseg od 16,0 - 34,2) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na nalaz beta receptora (p= 0,354).

Tabela 16. Indeks telesne mase u odnosu na pol (p= 0,032)

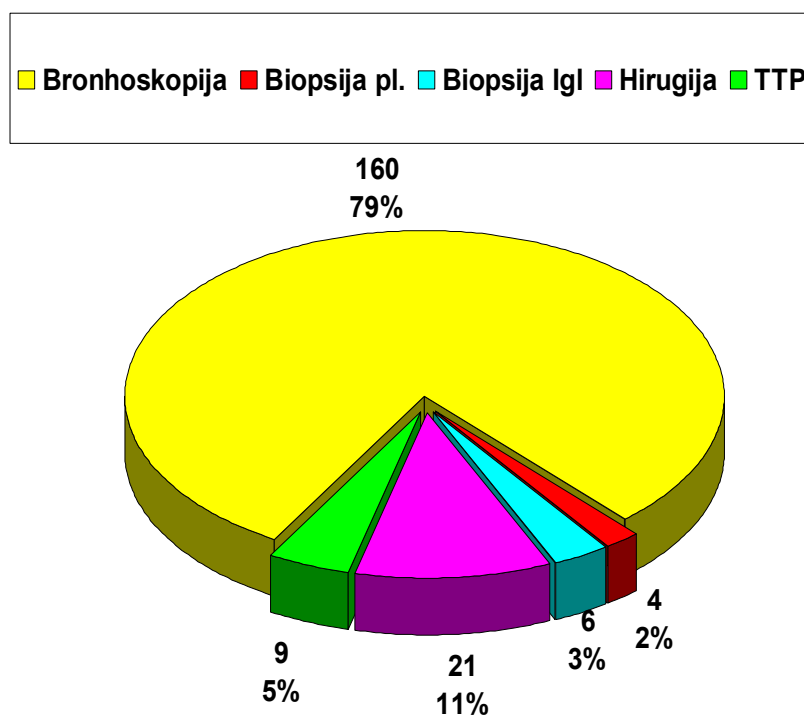
<b>Indeks telesne mase</b>	<i>Muškarci</i>		<i>Žene</i>		<i>Ukupno</i>	
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Pothranjen	2	2,0	5	5,0	7	3,5
Normalan	94	94,0	82	82,0	176	88,0
ITM > 30 (gojazan)	4	4,0	13	13,0	17	8,5
<b><i>Ukupno</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>200</i></b>	<b><i>100</i></b>

Procenat žena koje su u menopauzi bio je 85,6%. U odnosu na nalaz beta receptora nije bilo statistički značajne razlike (p= 0,798) u procentu žena sa menopauzom ili fertinlih žena u odnosu na nalaz beta receptora (Tabela 17.).

Tabela 17. Fertilitet žena u odnosu na beta receptor ( $p= 0,798$ )

Beta receptor	Fertilne		Menopauza		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
beta receptor (-)	8	14,5	47	85,5	55	100
beta receptor (+)	6	14,3	36	85,7	42	100
<b>Ukupno</b>	<b>14</b>	<b>14,4</b>	<b>83</b>	<b>85,6</b>	<b>97</b>	<b>100</b>

Najčešći način postavljanja dijagnoze karcinoma bronha je bio putem bronhoskopije, kojim su dobijeni patohistološki uzorci za naknadno imunohistochemijsko bojenje. Sledili su ostali načini dobijanja dijagnoze. Ukoliko je dijagnoza postavljena nekom od citološki obrađenih uzoraka sledila je imunohistochemijska analiza na naknadnom hirurškom postoperativnom patohistološkom uzorku tumora (Grafikon 7.).



Grafikon 9. Distribucija pacijenata po načinu postavljanja dijagnoze

U odnosu na stadijum bolesti najviše pacijenata je bilo u stadijumu IV (31,5%), zatim IIIa (23,5%) i IIIb (19,5%). Postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) u distribuciji pacijenata prema stadijumima u odnosu na pol. Stadijum IV je češći kod žena (37,0%) nego muškaraca (26,0%) (Tabela 18.).

Tabela 18. Stadijum karcinoma bronha u odnosu na pol ( $p < 0,001$ )

Stadijum karcinoma	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Ia	2	2,0	3	3,0	5	2,5
Ib	15	15,0	8	8,0	23	11,5
IIa	2	2,0	3	3,0	5	2,5
IIb	7	7,0	11	11,0	18	9,0
IIIa	16	16,0	31	31,0	47	23,5
IIIb	32	32,0	7	7,0	39	19,5
IV	26	26,0	37	37,0	63	31,5
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Nije bilo statistički značajne razlike ( $p = 0,661$ ) u distribuciji pacijenata prema stadijumima u odnosu na nalaz beta receptora (Tabela 19).

Tabela 19. Stadijum karcinoma bronha u odnosu na beta receptor ( $p = 0,661$ )

Stadijum karcinoma	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Ia	4	3,3	1	1,3	5	2,5
Ib	14	11,5	9	11,5	23	11,5
IIa	3	2,5	2	2,6	5	2,5
IIb	14	11,5	4	5,1	18	9,0
IIIa	25	20,5	22	28,2	47	23,5
IIIb	24	19,7	15	19,2	39	19,5
IV	38	31,1	25	32,1	63	31,5
<b>Ukupno</b>	<b>122</b>	<b>100</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Najčešći terapijski tretman kod ispitivanih pacijenata je bila samo hemioterapija kod 92 pacijenta (46,0%), zatim kombinovana hemio i radio terapija kod 27 pacijenata (13,5%). Od analiziranih 200 pacijenata njih 62 (31%) je bilo operisano. Radioterapiju je imalo 5 pacijenata (2,5%), a samo na simptomatskoj terapiji je bilo 15 pacijenata (7,5%) (Tabela 20.).



Tabela 20. Terapijski modaliteti

Terapija	Operacija		Ukupno
	Da	Ne	
Samo hemioterapija	20	92	112
Samo radioterapija	1	4	5
Hemio i radio terapija	23	27	50
Samo simptomatska	18	15	33
<b>Ukupno</b>	<b>62</b>	<b>138</b>	<b>200</b>

Najčešći terapijski modalitet u odnosu na beta estrogen receptorski za obe grupe pacijenata je bila samo hemioterapija; za ER $\beta$ (-) ovu terapiju imalo je 45,9% pacijenata, a u grupi ER $\beta$ (+) njih 46,2%. Udružena hemio i radio terapija je zastupljenija u grupi pacijenata ER $\beta$  (+) 21,8% u odnosu na ER $\beta$ (-) pacijente - 8,2%. Operacija i udružena hemio i radio terapija su češće u grupi pacijenata sa ER $\beta$ (-), njih 15,6% nego kod ER $\beta$ (+) pacijenata, njih 5,1%. Postoji statistički značajna razlika u terapijskim modalitetima u odnosu na nalaz beta receptora ( $p= 0,004$ ) (Tabela 21).

Tabela 21. Terapijski modaliteti u odnosu na beta receptor ( $p= 0,004$ )

Terapija	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Samo simptomatska	7	5,7	8	10,3	15	7,5
OP sa simptomatskom t.	11	9,0	7	9,0	18	9,0
OP sa hemioterapijom	17	13,9	3	3,8	20	10,0
OP sa radio terapijom	1	0,8	0	0,0	1	0,5
OP sa hemioradio t.	19	15,6	4	5,1	23	11,5
Samo hemioterapija	56	45,9	36	46,2	92	46,0
Samo radio terapija	1	0,8	3	3,8	4	2,0
Hemio i radio terapija	10	8,2	17	21,8	27	13,5
<b>Ukupno</b>	<b>122</b>	<b>100</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Najčešći terapijski odgovor kod ispitivanih pacijenata je bila progresija bolesti (44,0%) i delimična regresija (34,5%). Stabilnu bolest je imalo 8 pacijenata (4,0%), a regresiju bolesti je imalo 17,5%. Nije bilo statistički značajne razlike ( $p= 0,449$ ) u terapijskom odgovoru u odnosu na nalaz beta receptora (tabela 22).

Tabela 22. Terapijski odgovori u odnosu na nalaz beta receptora ( $p= 0,449$ )

Terapijski odgovor	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Stabilna bolest	4	3,3	4	5,1	8	4,0
Regresija	18	14,8	17	21,8	35	17,5
Progresija	58	47,5	30	38,5	88	44,0
Delimična regresija	42	34,4	27	34,6	69	34,5
<b>Ukupno</b>	<b>122</b>	<b>100</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Progresija bolesti je bila češća u grupi pacijenata sa negativnim nalazom beta receptora (47,5% : 38,5%), ali ne postoji statistički značajna razlika ( $p= 0,207$ ) (tabela 23).

Tabela 23. Terapijski odgovori u odnosu na beta receptor ( $p= 0,207$ )

Terapijski odgovor	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Bez progresije	64	52,5	48	61,5	112	56,0
Progresija	58	47,5	30	38,5	88	44,0
<b>Ukupno</b>	<b>122</b>	<b>100</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Kod žena, progresija bolesti je bila češća u grupi pacijenata sa negativnim nalazom beta receptora u odnosu na nalaz beta estrogen pozitivnog tumora (55,2% : 33,3%) i postoji statistički značajna razlika ( $p= 0,050$ ) (Tabela 24 i Grafikon 8).

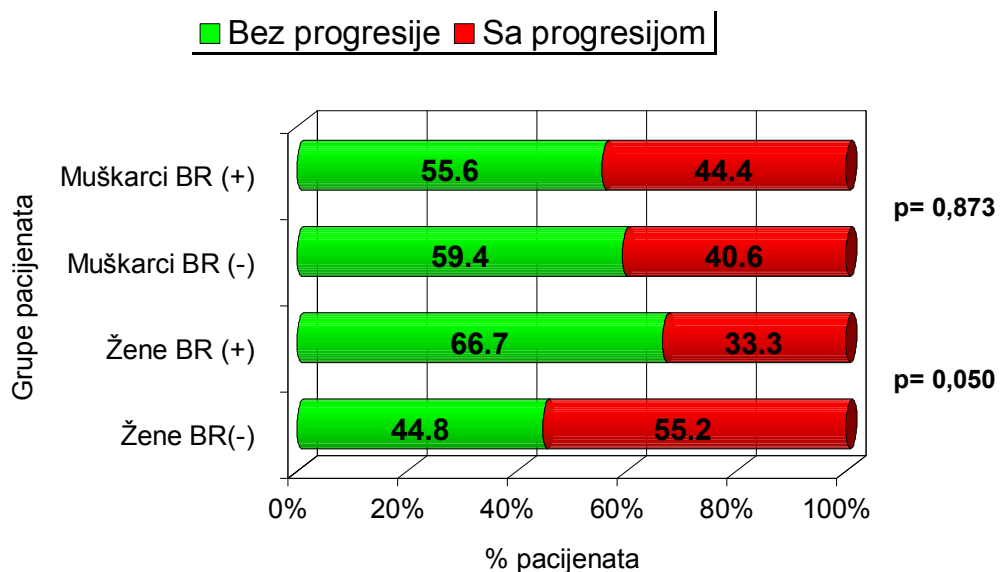
Tabela 24. Terapijski odgovori kod žena u odnosu na beta receptor ( $p= 0,050$ )

Terapijski odgovor	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Bez progresije	26	44,8	28	66,7	54	54,0
Progresija	32	55,2	14	33,3	46	46,0
<b>Ukupno</b>	<b>58</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Kod muškaraca, progresija bolesti je bila češća u grupi pacijenata sa pozitivnim nalazom beta receptora (44,4% : 40,6%) ali ne postoji statistički značajna razlika ( $p= 0,873$ ) (Tabela 25. i Grafikon 8.).

Tabela 25. Terapijski odgovori kod muškaraca u odnosu na beta receptor ( $p= 0,873$ )

<b>Muškaraca</b>	<i>beta receptor (-)</i>		<i>beta receptor (+)</i>		<b>Ukupno</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Bez progresije	38	59,4	20	55,6	58	58,0
Progresija	26	40,6	16	44,4	42	42,0
<b>Ukupno</b>	<b>64</b>	<b>100</b>	<b>36</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>



Grafikon 8. Terapijski odgovor u odnosu na pol i nalaz  $\beta$  receptora

Najčešći terapijski odgovor kod muškaraca je bila delimična regresija bolesti (43,0%) i progresija bolesti (42,0%). Stabilnu bolest je imalo 3 pacijenta (3,0%), a regresiju bolesti je imalo 12,0%. Nije bilo statistički značajne razlike ( $p= 0,668$ ) u terapijskom odgovoru u odnosu na nalaz beta receptora (Tabela 26.).

Tabela 26. Terapijski odgovori kod muškaraca u odnosu na beta receptor ( $p= 0,668$ )

<b>Terapijski odgovor</b>	<i>beta receptor (-)</i>		<i>beta receptor (+)</i>		<b>Ukupno</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Stabilna bolest	1	1,6	2	5,6	3	3,0
Regresija	8	12,5	4	11,1	12	12,0
Progresija	26	40,6	16	44,4	42	42,0
Delimična regresija	29	45,3	14	38,9	43	43,0
<b>Ukupno</b>	<b>64</b>	<b>100</b>	<b>36</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Najčešći terapijski odgovor kod žena je bila progresija bolesti (46,0%) i delimična regresija (26,0%). Stabilnu bolest je imalo 5 pacijenata (5,0%), a regresiju bolesti je imalo 23,0%. Nije bilo statistički značajne razlike ( $p=0,157$ ) u terapijskom odgovoru u odnosu na nalaz beta receptora (Tabela 27.).

Tabela 27. Terapijski odgovori kod žena u odnosu na beta receptor ( $p=0,157$ )

Terapijski odgovor	beta receptor (-)		beta receptor (+)		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Stabilna bolest	3	5,2	2	4,8	5	5,0
Regresija	10	17,2	13	31,0	23	23,0
Progresija	32	55,2	14	33,3	46	46,0
Delimična regresija	13	22,4	13	31,0	26	26,0
<b>Ukupno</b>	<b>58</b>	<b>100</b>	<b>42</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

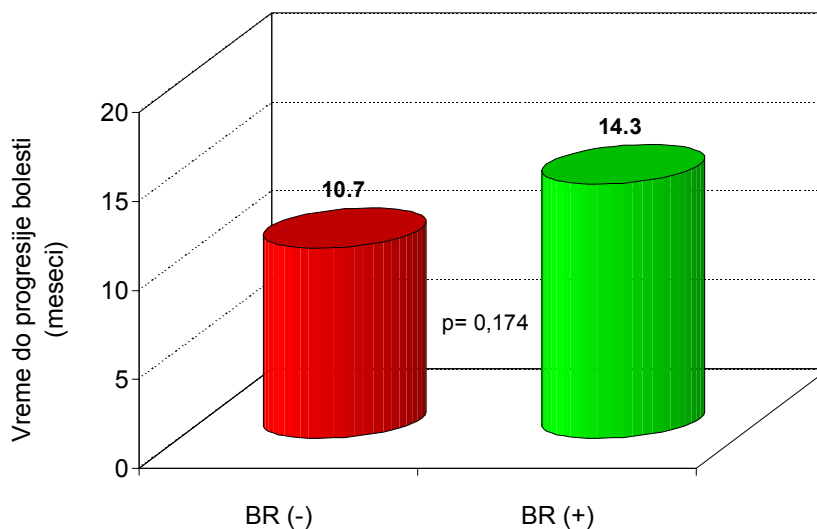
Prosečno vreme do pojave progresije bolesti je bilo 12,1 meseci (opseg 0 - 83, medijana 4). Kod muškaraca je prosek 11,8, a kod žena 12,4 i razlika nije statistički značajna ( $p=0,551$ ) (tabela 28). Kod pacijenata sa BR (-) prosek je 10,7, a kod pacijenata sa BR (+) 14,3 i razlika nije statistički značajna ( $p=0,174$ ) (Tabela 29. i Grafikon 9.).

Tabela 28. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti u odnosu na polpacijenata ( $p=0,551$ )

Pol pacijenata	N	Prosek	SD	Medijana	IQR	Min	Max
Muškarci	100	11,8	17,2	6,5	14	0	83
Žene	100	12,4	20,0	4,0	14	0	77
<b>Ukupno</b>	<b>200</b>	<b>12,1</b>	<b>18,6</b>	<b>5</b>	<b>14,0</b>	<b>0</b>	<b>83</b>

Tabela 29. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti u odnosu na nalaz beta receptora ( $p=0,174$ )

Beta receptor	N	Prosek	SD	Medijana	IQR	Min	Max
Negativan	122	10,7	17,8	4,0	13,0	0	83
Pozitivan	78	14,3	19,7	6,0	22,3	0	77
<b>Ukupno</b>	<b>200</b>	<b>12,1</b>	<b>18,6</b>	<b>5</b>	<b>14,0</b>	<b>0</b>	<b>83</b>



Grafikon 9. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti u odnosu na nalaz  $\beta$  receptora ( $p= 0,174$ )

Kod žena sa BR (-) prosek je 9,46, a kod žena sa BR (+) 16,5 i razlika je statistički značajna ( $p= 0,041$ ) (Tabela 30. i Grafikon 10.).

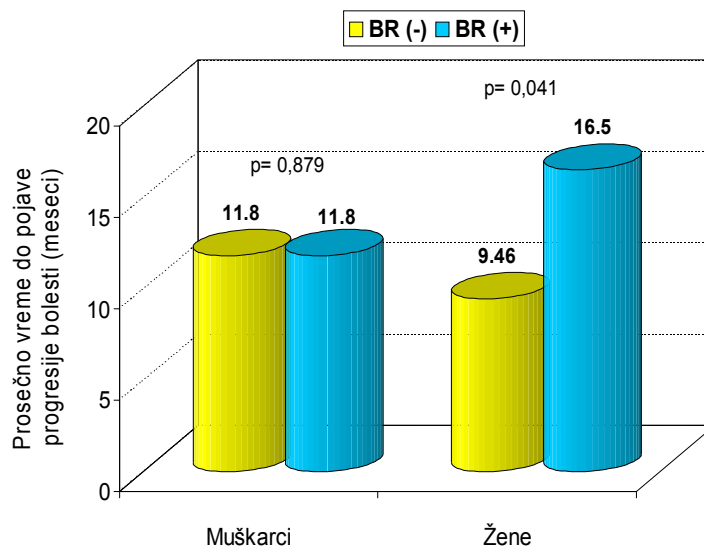
Tabela 30. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti u odnosu na nalaz beta receptora kod žena ( $p= 0,041$ )

<i>Beta receptor</i>	<i>N</i>	<i>Prosek</i>	<i>SD</i>	<i>Medijana</i>	<i>IQR</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Negativan	58	9,46	17,8	0,0	12,0	0	72
Pozitivan	42	16,5	22,3	6,0	24,8	0	77
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>12,4</b>	<b>20,0</b>	<b>4,0</b>	<b>14,0</b>	<b>0</b>	<b>77</b>

Kod muškaraca sa BR (-) prosek je 11,8, a kod muškaraca sa BR (+) 11,8 i razlika nije statistički značajna ( $p= 0,879$ ) (Tabela 31. i Grafikon 10.).

Tabela 31. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti u odnosu na nalaz beta receptora kod muškaraca ( $p= 0,879$ )

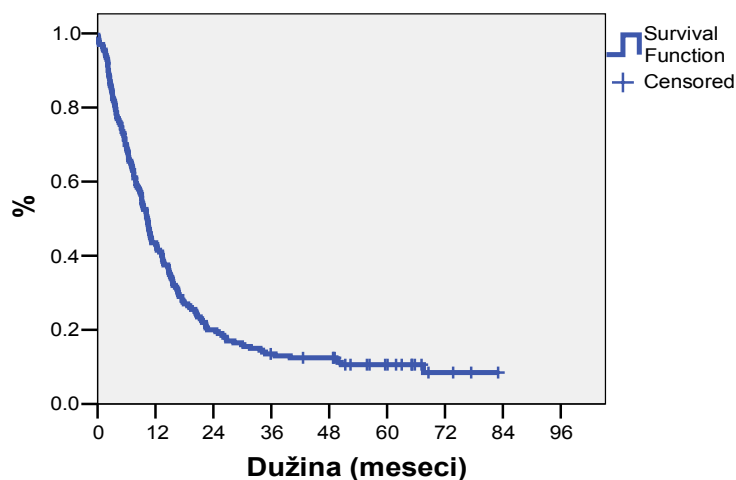
<i>Beta receptor</i>	<i>N</i>	<i>Prosek</i>	<i>SD</i>	<i>Medijana</i>	<i>IQR</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Negativan	64	11,8	17,9	7,0	13,8	0	83
Pozitivan	36	11,8	16,1	6,0	17,8	0	50
<b>Ukupno</b>	<b>100</b>	<b>11,8</b>	<b>17,2</b>	<b>6,5</b>	<b>14,0</b>	<b>0</b>	<b>83</b>



Grafikon 10. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti u odnosu na pol i  $\beta$  receptor

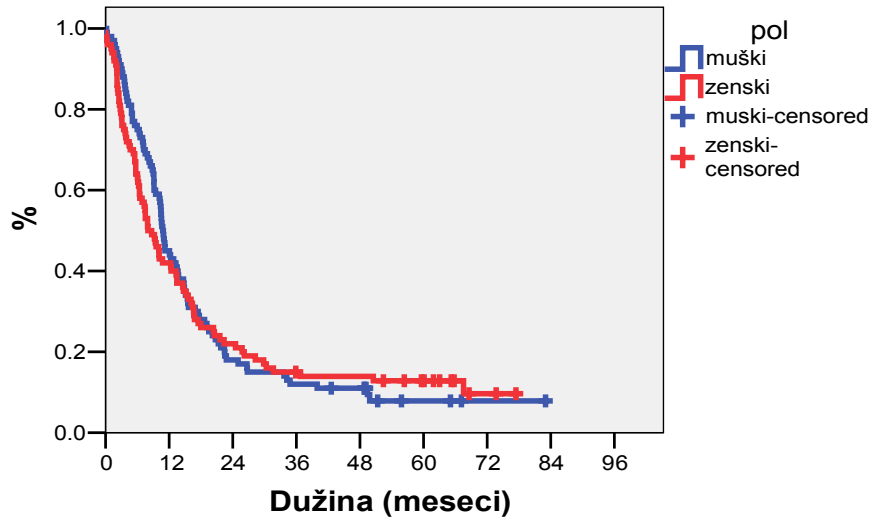
### Analiza preživljavanja

Kumulativno petogodišnje preživljavanje svih pacijenata iz studije (n= 200) je bilo  $10,6 \pm 2,2\%$ . Preživljanje na godinu dana je bilo  $43,5 \pm 3,5\%$ , a na dve godine  $20,0 \pm 2,8\%$  (Grafikon 11.).



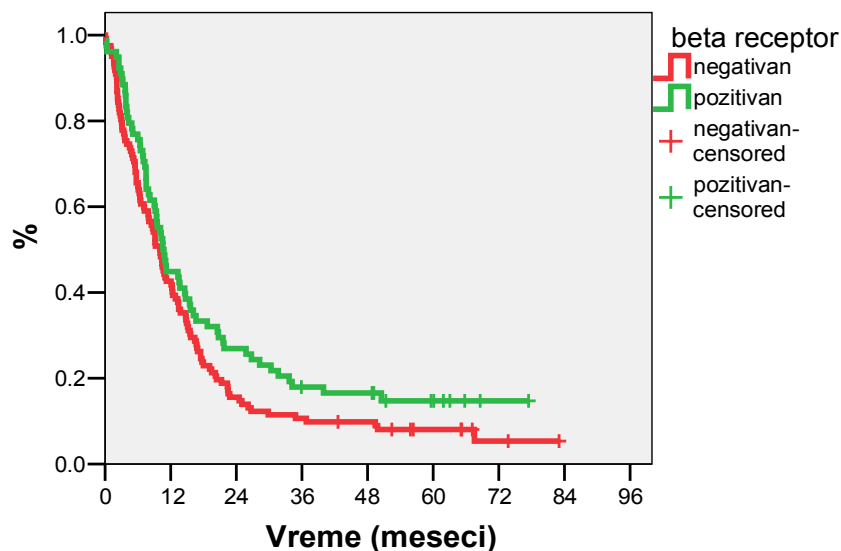
Grafikon 11. Kumulativno preživljavanje pacijenata

Dvogodišnje preživljavanje pacijenata muškog pola (n=100) je bilo  $18,0 \pm 3,8\%$ , a pacijenata ženskog pola (n=100) je bilo  $22,0 \pm 4,1\%$  (petogodišnje M:  $7,9 \pm 2,9\%$ , Ž:  $12,9 \pm 3,4\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u kumulativnom preživljavanju pacijenata u odnosu na pol (Mantel-Cox analiza  $p= 0,802$ ) (Grafikon 12.).



Grafikon 12. Preživljavanje pacijenata u odnosu na pol

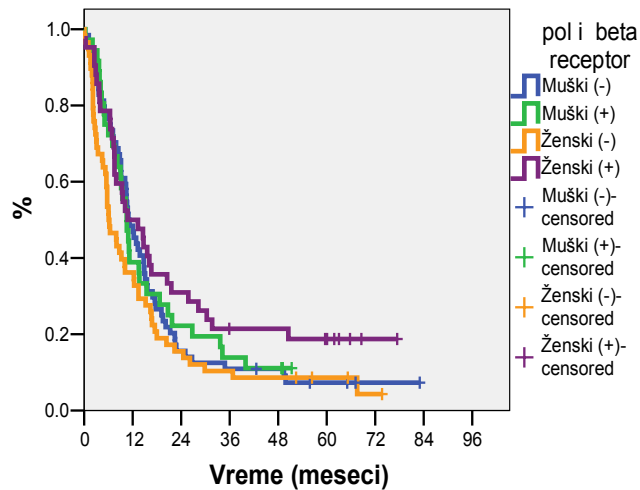
Dvogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata sa negativnim beta( $\beta$ -) receptorom ( $n= 122$ ) je bilo  $15,6 \pm 3,3\%$ , a pacijenata sa pozitivnim beta ( $\beta$ +) receptorom ( $n= 78$ ) je bilo  $26,9 \pm 5,0\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta$ -):  $8,0 \pm 2,5\%$ , ( $\beta$ +) :  $14,7 \pm 4,1\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju pacijenata u odnosu na nalaz beta receptora (Mantel-Cox:  $p= 0,074$ ) (Grafikon 13.).



Grafikon 13. Preživljavanje pacijenata u odnosu na nalaz beta receptora

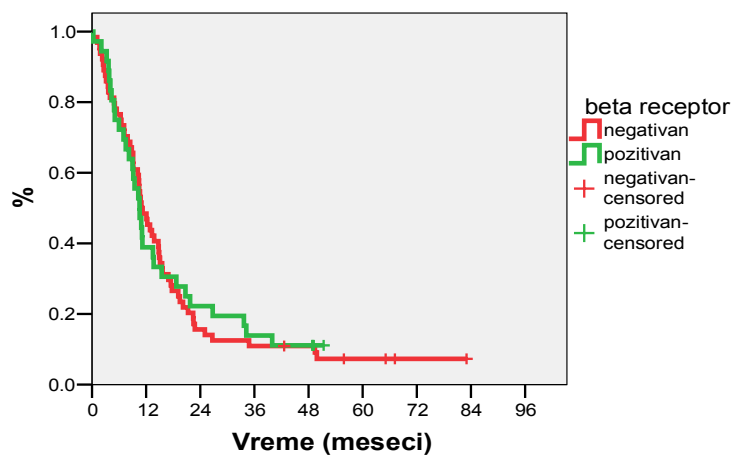
Analizirano je kumulativno preživljavanje u odnosu na pol pacijenata i nalaz beta receptora (muškarci (-), muškarci (+), žene (-), žene (+)). Žene sa pozitivnim beta receptorom imale su statistički značajno veće preživljavanje nego ostale tri grupe (Breslow:  $p= 0,037$ ; Mantel-Cox:  $p= 0,112$ ) (Grafikon 14.).



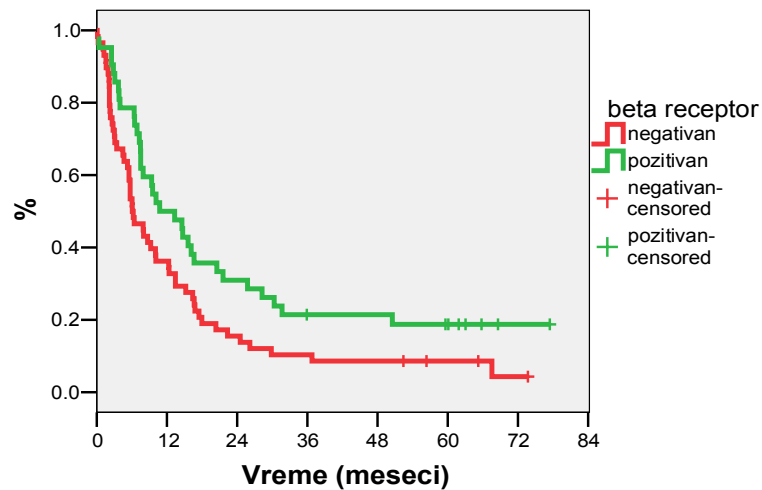


Grafikon 14. Preživljavanje pacijenata u odnosu na pol i nalaz beta receptora

Dvogodišnje preživljavanje muškaraca sa  $\beta^-$  receptorom u mesecima ( $n=64$ ) je bilo  $15,6 \pm 4,5\%$ , a sa  $\beta^+$  receptorom ( $n=36$ ) je bilo  $22,2 \pm 6,9\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta^-$ ):  $7,3 \pm 3,3\%$ , ( $\beta^+$ ):  $0,0 \pm 0,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju muškaraca u odnosu na nalaz beta receptora (Mantel-Cox:  $p=0,380$ ) (grafikon 15). Dvogodišnje preživljavanje žena sa  $\beta^-$  receptorom ( $n=58$ ) je bilo  $15,5 \pm 4,8\%$ , a sa  $\beta^+$  receptorom ( $n=42$ ) je bilo  $31,0 \pm 7,1\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta^-$ ):  $8,6 \pm 3,7\%$ , ( $\beta^+$ ):  $18,8 \pm 6,1\%$ ). Žene sa  $\beta^+$  receptorom imaju statistički značajno duže preživljavanje nego žene sa  $\beta^-$  receptorom (Mantel-Cox:  $p=0,024$ ) (Grafikon 16.).

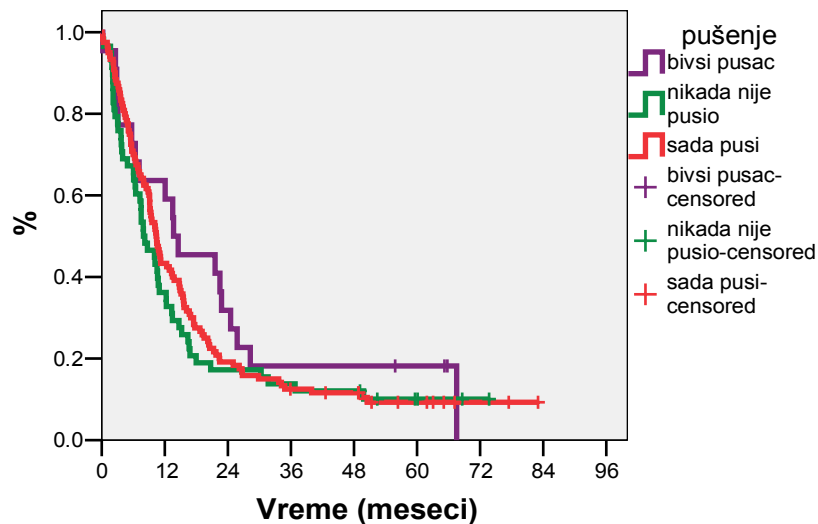


Grafikon 15. Preživljavanje muškaraca u odnosu na nalaz beta receptora



Grafikon 16. Preživljavanje žena u odnosu na nalaz beta receptora

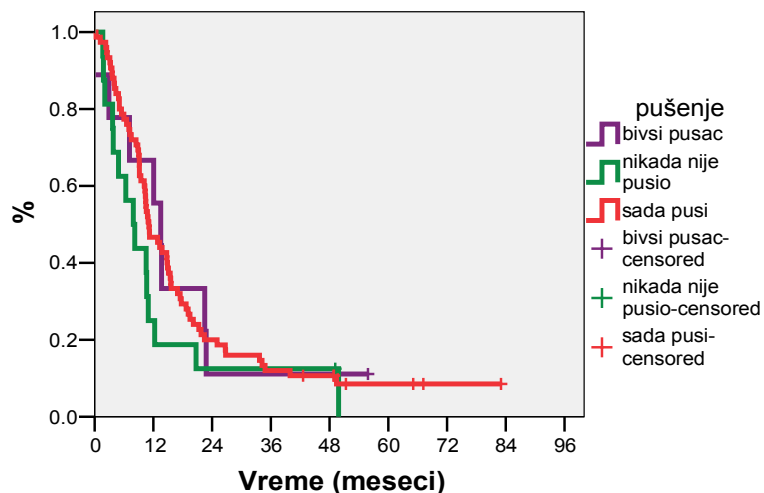
Dvogodišnje kumulativno preživljavanje u mesecima pacijenata koji su pušači (P) (n= 120) je bilo  $19,2 \pm 3,6\%$ , bivših pušača (BP) (n= 22) je bilo  $31,8 \pm 9,9\%$ , a nepušača (NP) (n= 58)  $17,2 \pm 5,0\%$  (petogodišnje preživljavanje (P):  $9,3 \pm 2,8\%$ , (BP):  $18,2 \pm 8,2\%$  i (NP):  $10,1 \pm 4,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju pacijenata u odnosu na pušačku naviku (Mantel-Cox analiza  $p= 0,360$ ) (Grafikon 17.).



Grafikon 17. Preživljavanje pacijenata u odnosu na pušačku naviku

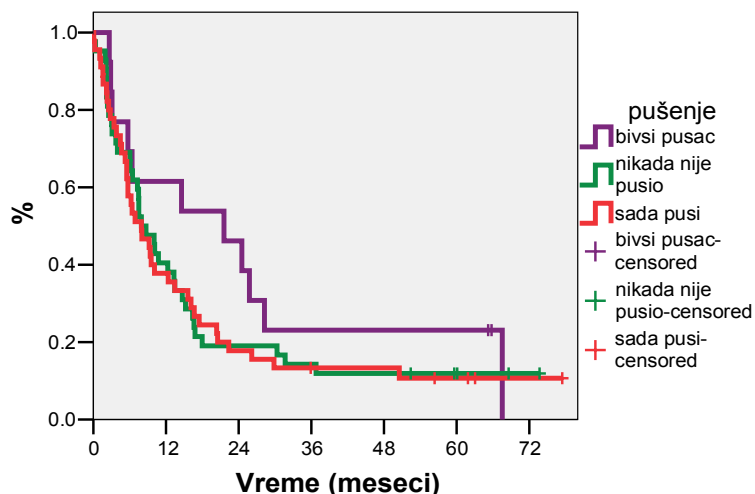
Dvogodišnje kumulativno preživljavanje muškaraca pušača (n= 75) je bilo  $20,0 \pm 4,6\%$ , bivših pušača (n= 9) je bilo  $11,1 \pm 10,5\%$ , a nepušača (n= 16)  $12,5 \pm 8,3\%$  (petogodišnje preživljavanje (P):  $8,5 \pm 2,8\%$ , (BP):  $11,1 \pm 10,5\%$  i (NP):  $0,0 \pm 0,0\%$ ). Nije

bilo statistički značajne razlike u preživljavanju muškaraca u odnosu na pušačku naviku (Mantel-Cox:  $p=0,380$ ) (Grafikon 18.).



Grafikon 18. Preživljavanje muškaraca u odnosu na pušačku naviku

Dvogodišnje kumulativno preživljavanje žena koje su bile pušači ( $n=45$ ) je bilo  $17,8 \pm 5,7\%$ , bivših pušača ( $n=13$ ) je bilo  $46,2 \pm 13,8\%$ , a nepušača ( $n=42$ ) je bilo  $19,0 \pm 6,1\%$  (petogodišnje preživljavanje (P):  $10,7 \pm 4,7\%$ , (BP):  $23,1 \pm 11,7\%$  i (NP):  $11,9 \pm 5,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju žena u odnosu na pušačku naviku (Mantel-Cox:  $p=0,470$ ) (Grafikon 19.).

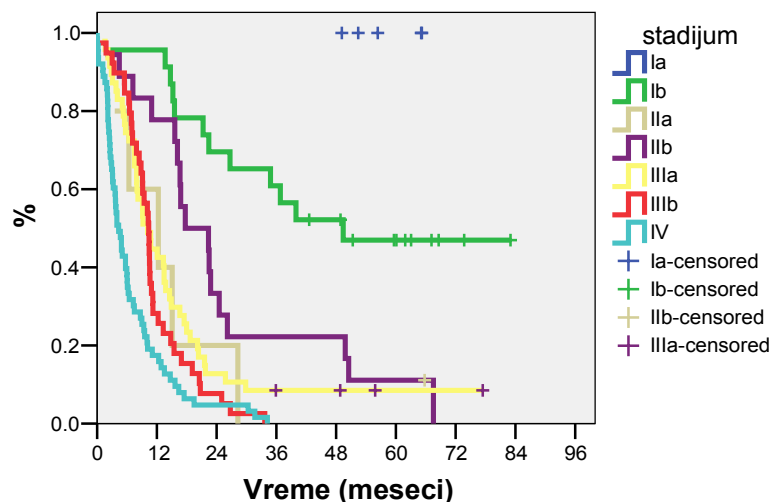


Grafikon 19. Preživljavanje žena u odnosu na pušačku naviku

Niko od 5 pacijenata sa stadijumom Ia nije umro u periodu praćenja, a svih 5 pacijenata sa stadijumom IIa su umrla zaključno sa 28 mesecom. Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa stadijumom Ib ( $n=23$ ) je bilo  $47,0 \pm 10,6\%$ , sa IIb ( $n=16$ ) je bilo  $11,1 \pm 7,4\%$ ,

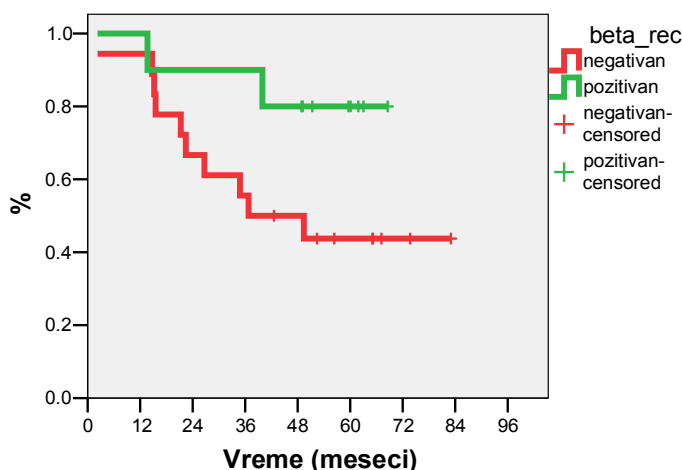
sa IIIa (n= 47) je bilo  $8,5 \pm 4,1\%$ , sa IIIb (n= 39) je bilo  $0,0 \pm 0,0\%$  (svi umrli od 34 meseca) i sa stadijumom IV (n= 63) je bilo  $6,3 \pm 3,1\%$ .

Postoji statistički značajna razlika (Mantel-Cox analiza  $p < 0,001$ ) u preživljavanju pacijenata u odnosu na stadijum bolesti (Grafikon 20).



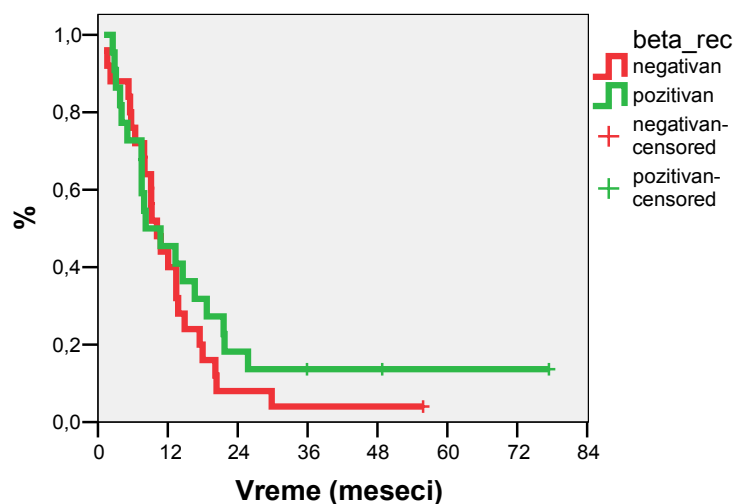
Grafikon 20. Preživljavanje pacijenata u odnosu na stadijum bolesti

Dvogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata u Ia ili Ib stadijumu i sa  $\beta$ -receptorom je bilo  $66,7 \pm 11,1\%$ , a pacijenata sa  $\beta^+$  receptorom je bilo  $90,0 \pm 9,5\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta^-$ ):  $41,8 \pm 11,9\%$ , ( $\beta^+$ ):  $80,0 \pm 12,6\%$ ). Postoji granično statistički značajna razlika (Mantel-Cox:  $p = 0,088$ ) u kumulativnom preživljavanju pacijenata sa stadijumom bolesti Ia ili Ib u odnosu na nalaz beta receptora (Grafikon 21).



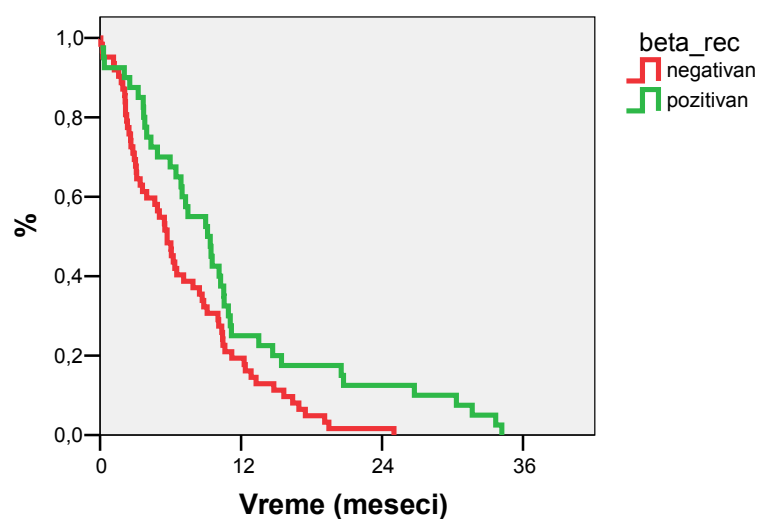
Grafikon 21. Preživljavanje pacijenata u stadijumu Ia ili Ib u odnosu na nalaz beta receptora ( $p = 0,088$ )

Dvogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata u IIIa stadijumu i sa  $\beta$ - receptorom je bilo  $8,0 \pm 5,4\%$ , a pacijenata sa  $\beta+$  receptorom je bilo  $18,2 \pm 8,2\%$ . Ne postoji statistički značajna razlika (Mantel-Cox:  $p= 0,419$ ) u preživljavanju pacijenata sa stadijumom bolesti IIIa u odnosu na nalaz beta receptora (Grafikon 22).



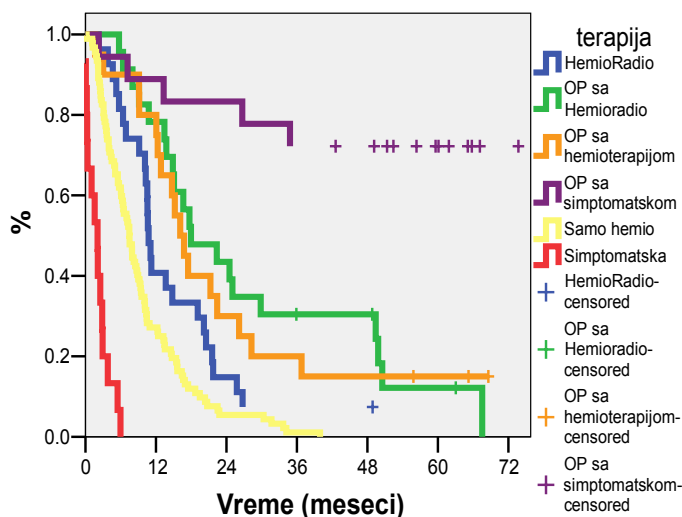
Grafikon 22. Preživljavanje pacijenata u stadijumu IIIa u odnosu na nalaz beta receptora ( $p= 0,419$ )

Jednogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata u IIIb ili IV stadijumu i sa  $\beta$ - receptorom je bilo  $19,4 \pm 5,0\%$ , a pacijenata sa  $\beta+$  receptorom je bilo  $25,0 \pm 6,8\%$ . Postoji statistički značajna razlika (Mantel-Cox:  $p= 0,013$ ) u preživljavanju pacijenata sa stadijumom bolesti IIIb ili IV u odnosu na nalaz beta receptora (Grafikon 23.).



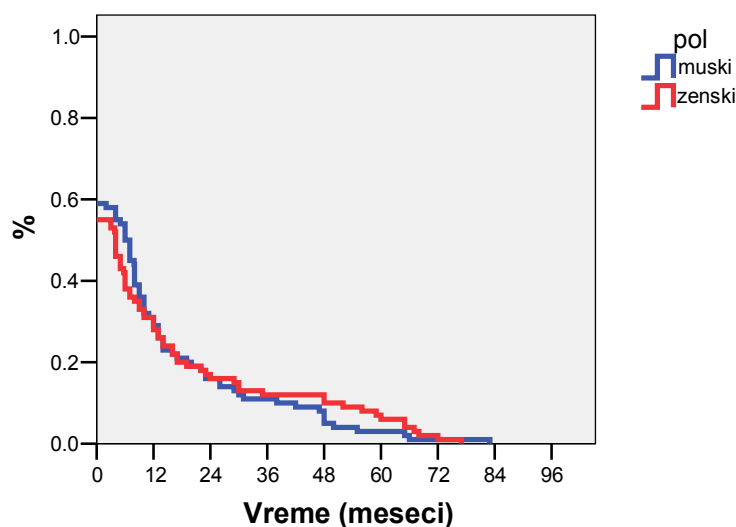
Grafikon 23. Preživljavanje pacijenata u stadijum IIIb ili IV u odnosu na nalaz beta receptora ( $p= 0,013$ )

Dvogodišnje preživljavanje pacijenata u mesecima sa operacijom (OP) i simptomatskom terapijom je bilo  $83,3 \pm 8,8\%$ , sa OP i hemioradio terapijom je bilo  $43,5 \pm 10,3\%$ , OP i hemio terapijom je bilo  $30,0 \pm 10,2\%$ , a udruženom hemio i radio terapijom je bilo  $14,8 \pm 6,8\%$  (petogodišnje preživljavanje OP i simptomatska:  $72,2 \pm 10,6\%$ , OP i hemioradio:  $12,2 \pm 7,7\%$ , OP i hemio terapija:  $15,0 \pm 8,0\%$ , a udružena hemio i radio  $7,4 \pm 5,0\%$ ). Razlika u kumulativnom preživljavanju u odnosu na primenjenu terapiju je statistički značajna (Mantel-Cox,  $p < 0,001$ ) (Grafikon 24.).



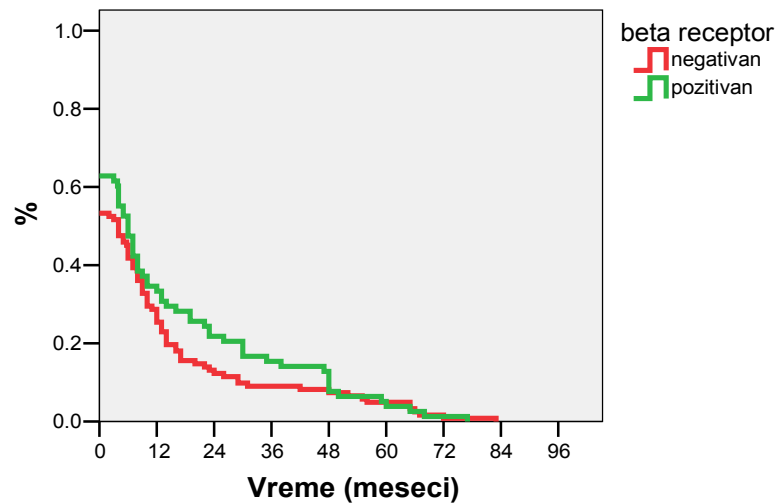
Grafikon 24. Preživljavanje pacijenata u odnosu na primenjenu terapiju

Bez pojave progresije bolesti posle 2 godine praćenja kod muškaraca je bilo  $16,0 \pm 3,7\%$ , a kod žena je bilo  $17,0 \pm 3,7\%$  (a na 5 godina odnos je iznosio  $4,0 \pm 2,0\% : 6,0 \pm 2,4\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u periodu do pojave progresije bolesti u odnosu na pol pacijenata (Mantel-Cox:  $p = 0,894$ ) (Grafikon 25.).



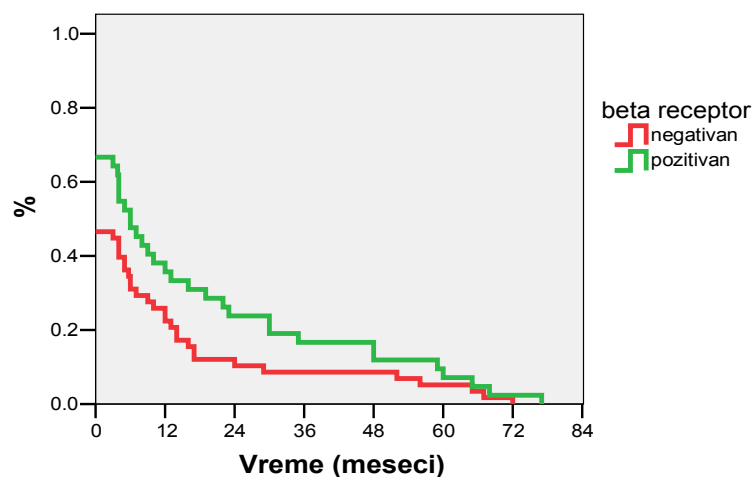
Grafikon 25. Bez pojave progresije bolesti u odnosu na pol pacijenata

Bez pojave progresije bolesti na 2 godine kod pacijenata sa  $\beta^-$  receptorskim statusom (n= 122) bilo je  $12,3 \pm 3,0\%$ , a kod pacijenata sa  $\beta^+$  receptorskim statusom (n= 78) je bilo njih  $21,8 \pm 4,6\%$  (p= 0,156) (na 5 godina  $4,9 \pm 2,0\%$  :  $5,1 \pm 2,5\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na u pojavu progresije bolesti u odnosu na nalaz beta receptora (Mantel-Cox: p= 0,300) (Grafikon 26.).



Grafikon 26. Bez pojave progresije bolesti u odnosu na beta receptor

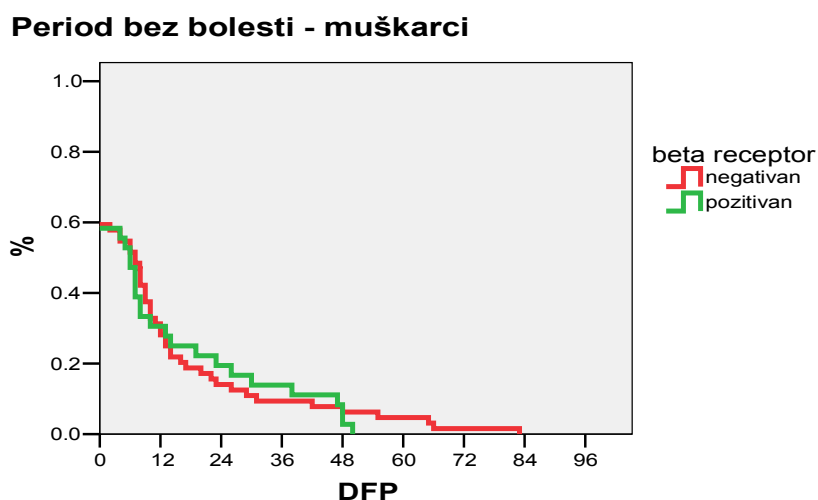
Bez pojave progresije bolesti na 2 godine kod žena sa  $\beta^-$  receptorskim statusom (n= 58) je bilo  $12,1 \pm 4,3\%$ , a kod žena sa  $\beta^+$  receptorskim statusom (n= 42) je bilo  $23,8 \pm 6,8\%$  (na 5 godina  $5,2 \pm 2,9\%$  :  $7,1 \pm 4,0\%$ ). Postojala je statistički značajna razlika u pojavi progresije bolesti u odnosu na nalaz estrogen beta receptora kod žena (Mantel-Cox, p= 0,049) (Grafikon 27.).



Grafikon 27. Bez progresije bolesti kod žena u odnosu na beta receptor



Bez pojave progresije bolesti (disease free period – DFP) na 2 godine kod muškaraca sa  $\beta$ - receptorskim statusom (n= 64) je bilo njih  $14,1 \pm 4,3\%$ , a kod muškaraca sa  $\beta+$  receptorskim statusom (n= 36) je bilo njih  $19,4 \pm 6,6\%$  (na 5 godina  $4,7 \pm 2,6\% : 0,0 \pm 0,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi progresije bolesti u odnosu na nalaz estrogen beta receptora kod muškog pola (Mantel-Cox,  $p= 0,797$ ) (Grafikon 28.).



Grafikon 28. Bez progresije bolesti kod muškaraca u odnosu na beta receptor

## MULTIVARIJANTNA ANALIZA

Cox regresionom analizom (Cox Regression) su analizirani nezavisni prediktori preživljavanja pacijenata sa adenokarcinomom pluća.

Kao nezavisne varijable korišćeni su svi riziko faktori koji su prikupljeni: pol, starost pacijenata, stadijum bolesti, komorbiditet, Kao zavisna varijabla korišćeno je vreme do nastanka smrtnog ishoda ili vreme do poslednjeg perioda praćenja.

Multivarijantnom Cox regresionom analizom kao nezavisni prediktor mortaliteta izdvojeni su:

1. nalaz beta receptora –  $p < 0,001$
2. stadijum bolesti stage –  $p < 0,001$
3. primenjena terapija –  $p < 0,001$

## 5. DISKUSIJA

Karcinom bronha je i dalje jedan od najučestalijih karcinoma u svetu, kako kod muškaraca, tako i kod žena. Vodeći je uzrok smrtnosti u Evropi, Engleskoj, Sjedinjenim Američkim Državama i u našoj zemlji. Prema najnovijim statističkim podacima karcinom bronha se po učestalosti kod muškaraca nalazi na prvom ili drugom, a kod žena na drugom ili trećem mestu, zavisno od zemlje u kojoj je vođen nacionalni registar za karcinom bronha. Prema podacima zdravstveno statističkog godišnjaka Republike Srbije, muškarci su u odnosu na maligne bolesti najčešće obolevali od karcinoma bronha, a potom debelog creva i prostate, dok je kod žena najučestalija maligna bolest bila karcinom dojke, potom karcinom debelog creva, a na trećem mestu karcinom bronha, što se uklapa sa svetskim podacima. Dok su razlike u incidenci karcinoma bronha između muškaraca i žena davno uočene, razlike u incidenci prema patohistološkom tipu tumora su još uvek predmet istraživanja. Prema epidemiološkim istraživanjima vođenim u poslednje tri decenije, incidenca adenokarcinoma pluća kod žena je i dalje u signifikantnom porastu, dok je incidenca skvamoznog karcinoma bronha za žene u padu, a oba patohistološka tipa imaju tendenciju pada incidence u muškaraca. Uzrok porasta incidence adenokarcinoma u žena objašnjava se promenom dizajna i načina spravljanja cigareta u savremeno doba. Prvo, novi filteri na takozvanim "light" cigaretama čine da se inhalira veći volumen dima i udisanje je dublje, što vodi porastu ekspozicije perifernih disajnih puteva karcinogenima duvanskog dima (što je mesto nastanka adenokarcinoma pluća). Drugo, cigarete sa ovakvim filterima su bogatije nitritima, povećavaju ekspoziciju N-nitrozaminima, koji su odgovorni za nastanak adenokarcinoma pluća, ali ne i za nastanak ostalih tipova karcinoma bronha. Ovo je jedan od mogućih uzroka razlika u epidemiološkim karakteristikama adenokarcinoma pluća i između muškaraca i žena (204,205). Unovoispitivanim epidemiološkim karakteristikama karcinoma bronha, prvo je uočena razlika u pušačkom statusu među polovima i prema tim podacima značajno je veći broj žena nepušača koje imaju karcinom bronha, takodje dominantno adenokarcinom, što upućuje na zaključak da postoje i polom uslovljene razlike u nastanku ove bolesti i da su za to verovatno odgovorni polni hormoni. Multicentrična studija koju je predvodio i *Wakelee HA* 2007. godine, pokazala je da je incidenca karcinoma bronha za žene nepušače mnogo veća, 14.4-20.8 na 100,000 stanovnika godišnje, u odnosu na incidencu kod muškaraca nepušača koja je iznosila 4.8-13.7. Ovakvi epidemiološki pokazatelji usmerili su istraživače u pravcu ispitivanja uticaja ženskih polnih hormona, estrogena i progesterona, na ulogu u

kancerogenezi karcinoma bronha. Studije su pokazale da su estrogenski receptori (ER), posebno ER beta (Er $\beta$ ) i progesteronski receptori (PR), ekspresovani u karcinomu bronha kod ljudi. Brojna istraživanja potvrdila su hipotezu da je estrogenski signalni put u karcinomu bronha sličan onom u karcinomu dojke, iako postoje i znatne razlike u značaju estrogena koji ima glavnu ulogu u nastanku karcinoma dojke, dok u karcinomu bronha estrogen ima veću ulogu u progresiji tumora i metastatskom širenju bolesti.

Literarni podaci ukazuju na to da estrogenski imaju uticaj u karcinogenezi karcinoma bronha genomskim i negenomskim signalnim putevima. Negenomski signalni put estrogena može da se odvija aktivacijom epidermalnog faktora rasta (epidermal growth factor receptor-EGFR), mitogen aktivisanom protein kinazom1 (MAPK1), ili membranski asociranim estrogenskim receptorima. Multivariabilne studije pokazale su da su nedostatak Er $\beta$  ili gubitak EGFR ekspresije nezavisni prognostički faktori povezani sa kraćim ukupnim preživljavanjem u NSCLC, a nađeno je i da su pacijenti kod kojih su oba ova tumor markera bila negativna imala statistički lošiju prognozu bolesti. U zaključcima se navodi da su ispitivanja oba receptora dobri prognostički markeri u selektovanih pacijenata (I stadijum NSCLC sa lošom prognozom) u izboru daljih terapijskih tretmana nakon operacije, a u cilju uticaja na duže preživljavanje (206).

Primarni cilj ove doktorske studije bio utvrđivanje ekspresije estrogen receptora beta - Er $\beta$  u tkivu adenokarcinoma pluća, praćenje terapijskog odgovora kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma pluća prema prisutnosti Er $\beta$  u tkivu tumora, preživljavanje pacijenata sa adenokarcinomom pluća prema prisutnosti ovog receptora u tkivu tumora i utvrđivanje receptor tumor zavisnih razlika u terapijskom odgovoru i preživljavanju prema polu.

U ovo istraživanje je bilo uključeno je ukupno 200 pacijenata kod kojih je u toku 2006. 2007. i 2008.g. patohistološki ili citološki postavljena dijagnoza adenokarcinoma pluća. Prisutnost ER $\beta$  ispitivana samo na patohistološkim uzorcima tkiva tumora za sve ispitanike (materijal uzet pri bronhoskopiji ili hirurški resekat tkiva tumora). Prisutnost, odnosno odsutnost ER $\beta$  (pozitivan ili negativan nalaz) dokazivan je imunohistohemijским pregledom tumorskog tkiva. Pacijenti su potom praćeni do kraja 2011. godine ili do smrtnog ishoda.

U sklopu definisanja uzorka od 200 pacijenata za doktorsku disertaciju, registrovan je prvo ukupan broj dijagnostikovanih karcinoma bronha sa teritorije Vojvodine za 2006.g. u cilju dobijanja osnovnih epidemioloških podataka. Ukupan broj novodijagnostikovanih pacijenata sa karcinomom bronha u Institutu za plućne bolesti Vojvodine u 2006.g. iznosio je 1054, od čega muškaraca 812 (77%), a žena 242 (23%). Odnos muškarci/žene je 2006.g. iznosila 3,3:1. Epidemiološki podaci koji su izneti u radu Eduarda V i autora objavljeni su u

Croatia Medical Journal-u 2011.g. Studija je izvedena u sklopu istraživanja SEEROG (The South Eastern Research Oncology Group) i obuhvatila je podatke iz 8 zemalja istočne Evrope među kojima je bila i Srbija, a odnosila se na epidemiološke podatke za vodeće maligne bolesti u periodu između 2002. do 2006.g. Incidenca karcinoma bronha bila je najviša u Mađarskoj 94,6 za muškarce, za žene je iznosila 24,9 (odnos 3,8:1) , za Srbiju je u studiji prikazana icidenca od 64,2 za muškarce i 18,4 za žene, (odnos 3,5:1) (19). Ovakvi podaci u potpunosti su se slagali sa osnovnim epidemiološkim podacima za 2006.g. za teritoriju Vojvodine kada smo istraživanje i započeli. Jovan Mihajlović i saradnici prikazali su epidemiološke podatke, odnosno incidencu mortaliteta svih malignih bolesti u Srbiji poredeći period od 10 godina. 1999.g. incidenca malignih bolesti na teritoriji Srbije iznosila je 26,121, a 2009.g. 36,308. Najveću incidencu je za muškarce imao karcinom bronha (55,5/100,000 - 1999.g. i 70,8/100,000 - 2009.g.). Za žene incidenca karcinoma bronha je bila na četvrtom mestu, iza karcinoma dojke, cervikalnog i kolorektalnog karcinoma i iznosila je 12,0/100,000 - 1999.g. i 19,4/100,000 - 2009. g.) Dakle za oba perioda na području Srbije odnos incidence bolesti (muškaraca prema ženama) je iznosio oko 4:1. Analizom mortaliteta prikazan je najznačajniji porast ove stope za karcinom bronha u žena i kolorektalni karcinom u muškaraca, 0.42/100,000 ( $P=0.036$ ) and 0.626/100,000 ( $P<0.001$ ) (207). U radu Vladimira Petrovića sa autorima data je standardizovana stopa incidence za oba pola u periodu od 1996-2005.g na teritoriji Vojvodine. Uočen je porast incidence za oba pola ali je on bio izrazitiji za ženski pol (2008). Ovakvim podacima pokazana je nešto manja polna razlika u odnosu na druge regione za taj period kao i u odnosu na podatke u našem radu gde je dobijena nešto veća učestalost karcinoma bronha u žena u 2006.g. (3,3:1).

U našoj studiji započetoj 2006.g. odnos patohistoloških tipova tumora prema polu (muškarci/žene) za sve novootkrivene karcinome bronha te godine, bio je: skvamozni karcinom (47%/30%), adenokarcinom (30%/43%), mikrocelularni karcinoma bronha imao je odnos (17%/19%), a ostali tipovi tumora (6%/19%). Prema drugim literarnim podacima odnos između patohistoloških tipova karcinoma bronha prema polnoj karkteristici bio je nešto drugačiji, odnosno muški pol je bio zastupljeniji sa adenokarcinomom u odnosu na muškarce sa teritorije Vojvodine, ali i su i žene sa tih podneblja takodje imale više zastupljen adenokarcinom u odnosu na žene sa teritorije Vojvodine. Dok je u Japanu odnos skvamoznog prema adenokarcinomu za muškarce išao u korist adenokarcinoma (54%/39%), za žene je taj odnos bio još viši (88%/9%), ukoliko izuzmemo druge tipove karcinoma bronha (209). U studiji koju su objavili američki autori na čelu sa Mary Wahbah-om 2007.g. adenokarcinom je kao i u Japanu bio najzastupljeniji tip karcinoma i za muškarce i za žene (36.8% i 46.5%), sledeo je skvamozni karcinom bronha (31.6% i 25.4%). Incidenca makrocelularnog karcinoma

je bila 18.0% i 9.9%, a incidenca mikrocelularnog karcinoma bila je 13.7% i 18.3% (210). Sveobuhvatno, stopa skvamoznog i mikrocleularnog karcinoma u svetu za muškarce je u padu, nasuprot lakom porastu i stagnaciji adenokarcinoma, dok je kod žena stopa sva tri navedena tipa karcinoma u porastu i to najviša u odnosu na adenokarcinom pluća (211, 212).

Prema ovakvim podacima razumljivo je da se adenokarcinom izdvojio kao najučestaliji tip karcinoma bronha sveukupno kao i da je njegova posebno visoka učestalost u ženskog pola kod kojih postoji mnogo veći broj nepušača među obolelima, bio uzrok daljih ispitivanja mogućih faktora u kancerogenezi, odnosno ispitivanje polnih - hormonalnih uticaja u nastanku, razvoju i terpijskom odgovoru ovog tipa tumora.

U dosadašnjim studijama koje su se bavile ispitivanjem estrogenih receptora (ER) i njihovom ekspresijom u karcinomu bronha, dokazana je relativno mala ekspresija ER $\alpha$  i skoro beznačajan uticaj ovog hormonskog receptora na ekspresiju karcinoma bronha. Nasuprot tome ove studije uglavnom su ispitivale značaj ER $\beta$  čija ekspresija je bila mnogo više prisutna u karcinomu bronha i kretala se od 9%-98% (213). Odnos pozitivnog prema negativnom nalazu ER $\beta$  u dosadašnjim studijama bio je dosta raznolik: *Greta Ali* i autori navode odnos (75%/25%); *Sri Navaratnam* (51%/49%); *Michele L. Cotel* (67%/33%); *Cheng-Tu Wu* (45%/56%); *Bigit Gulddammer Skov* (32%/68%); *Hieki Kawai* (51%/49%); *Ann. G. Shwartz* (46%/54%); *Naohiro Nose* (38%/62%); *Maria G. Raso* (42%/58%). U našoj studiji ukupno su prikupljeni i analizirani podaci ekspresije ER $\beta$  za 200 pacijenta (100 ženskog pola i 100 muškog pola). Ekspresija ER $\beta$  prikazana je kao pozitivan ili negativan nalaz. Sa pozitivnim nalazom beta estrogenog receptora u tkivu tumora bilo je 78 pacijenta (39,0%), a sa negativnim 122 (61,0%). Studije koje su pokazale visoku ekspresiju ER $\beta$  kao što je prikazano u studiji koju je vodila *Greta Ali* sa autorima (75% ER $\beta$  +, 25% ER $\beta$ -), odnose se na imunohistohemijse metode detekcije dve vrste beta estrogen receptora ER $\beta$  (ER $\beta$ 1 i ER $\beta$ 2), dakle i nukleusni i citoplazmatski ER $\beta$ , dok su se u našoj studiji kao i u navedenim studijama u kojima je postotak ekspresije ER $\beta$  bio niži, koristile imunohistohemijske analize (IHA) kojima su detektovani samo nukleusni ER $\beta$ 1 receptori (2014-2017). Razlike u prikaznim rezultatima ekspresije ER $\beta$  uslovljene su i korištenjem različitih klonova antitela u bojenjima IHA i heterogenim definisanjem pozitivnosti nalaza (različiti scoring sistemi). U studijama koje su koristile amino-terminalnu grupu antitela pokazana je niža ekspresija receptora, kao što su pokazali rezultati naše studije (218-220). Nasuprot tome studije u kojima je u IHA korištena karboksi terminalna grupa antitela, ekspresija receptora je bila znatno viša ( 221, 222). Iz svega navedenog može se zaključiti da još uvek ne postoji tačno definisanje, odnosno tačan scoring ekspresije beta estrogenog receptora u tkivu tumora pluća.

Posmatranjem ekspresije receptora pema polu u našem radu smo dokazali da su žene pokazale veću ekspresiju ER $\beta$  ali nije bilo statistički značajne razlike u prisutnosti ER $\beta$  u odnosu na pol pacijenata ( $p= 0,469$ ). Među pacijentima muškog pola pozitivan nalaz ER $\beta$  imalo je 36,0%, a među ženama 42,0%. Ovakvi rezultati su u skladu sa svim ostalim studijama koje su ispitivale polne razlike u ekspresiju ovog receptora. Jedina značajna razlika ekspresije receptora prema polu prikazana je u studiji Chen-Tu Wu-a sa saradnicima. U njihovoj studiji ukupna ekspresija ER $\beta$  za oba pola iznosila je 45.8%, ali statistički značajno viša u žena (u 54.3% od 127 ispitivanog tumorskog tkiva kod žena, prema 39.7% od 174 uzoraka tumorskog tkiva u muškaraca,  $P =0.012$ ). U istoj studiji broj muškaraca pušača iznosio je 73.2 prema 26.8 % nepušača ali je zato broj pušača u ženskoj populaciji iznosio svega 8.7%, a žena nepušača bilo je 91.3%, pri čemu je to najviše uočena razlika u broju pušača među polovima koja je objavljena u svetu, pa bi se time donekle mogla objasniti i beta estrogen receptorska razlika u ekspresiji prema polu u datom uzorku, odnosno da postoji dodatni uticaj na ekspresiju receptora izuzev pola (223).

U našoj studiji prosečna starost pacijenata je iznosila  $59,4\pm 9,5$  godine (opseg od 31 - 80 godina). Prosečna starost pacijenata muškog pola je bila  $60,2\pm 9,2$  godine (opseg od 33 - 80 godina), a pacijenata ženskog pola  $58,6\pm 9,29$  godine (opseg od 31 - 80 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol ( $p= 0,237$ ). Prosečna starost pacijenata koji su imali pozitivan nalaz beta receptora ER $\beta$  (+) iznosio je  $61,0\pm 9,62$  godine (opseg od 35 - 80 godina), a za negativan nalaz beta receptora ER $\beta$  (-) je iznosio  $58,4\pm 9,39$  godine (opseg od 31 - 80 godina). Nije dakle postojala statistički značajna razlika u odnosu na prosečnu starost i ekspresiju ER $\beta$ . Prosečna starost žena koje su imale ER $\beta$  (+) nalaz, bila je  $60,6\pm 10,3$  godine (opseg od 35 - 80 godina), za ER $\beta$  (-) nalaz je bila  $57,2\pm 9,40$  godine (opseg od 31 - 78 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na nalaz beta receptora, ženski pol i prosečnu starost pacijentkinja ( $p= 0,083$ ). Prosečna starost muškaraca koji su imali pozitivan nalaz ER $\beta$  bila je  $61,4\pm 8,94$  godine (opseg od 35 - 80 godina), a za negativan nalaz ER $\beta$  je bila  $59,6\pm 9,30$  godine (opseg od 33 - 80 godina) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na nalaz beta receptora, muški pol i prosečnu starost pacijenata ( $p= 0,346$ ). Slični podaci dobijeni su i u ostalim, brojnim studijama u kojima su pol i prosečna starost pacijenata bili jedni od ispitivanih demografskih karakteristika kao mogućih faktora različite ekspresije ER $\beta$ .

Značajan broj žena koje puše počinje da se uočava od 1940-te godine sa maksimumom 1970-te godine prošlog veka. Smatra se da u današnje doba oko 22% ženske populacije čine žene pušači. *Zanga* i *Wynder* su u svojoj studiji izneli da žene pušači imaju 1,2 do 1,7 puta veći rizik od muškaraca za nastanak karcinoma bronha. *Leno Thomas* i *L. Austin Doyle* su u

svojoj studiji izneli podatak da se u SAD čak oko 3000 smrtnih ishoda od karcinoma bronha u žena evidentira među ženama nepušačima. Naveli su i da žene nepušači imaju čak 2,4% veći rizik od nastanka karcinoma bronha ukoliko žive sa osobom koja puši (224). Pušenje čini rizik za nastanak svih patohistoloških tipova karcinoma bronha, ali je najčešće povezan sa skvamoznim karcinomom, potom sitnoćelijskim karcinomom bronha i na kraju adenokarcinomom pluća. Adenokarcinom je sa druge strane najčešći histološki tip karcinoma bronha oba pola ali je češći u žena, u nepušača i mlađih pacijenata, što upućuje da i drugi faktori imaju značajnu ulogu u nastanku ovog tipa tumora pluća. Takođe je poznato da su žene osetljivije na molekularne „aberracije“ izazvane duvanskim dimom u odnosu na muškarce. U žena pušača češće su mutacije TP53, K-ras, c-erbB-2 i EGFR u odnosu na muškarce koji puše. Poznato je da je ekspresija gastrin releasing (oslobažajućeg) peptidnog receptora – GRPR odgovorna za povećanu osetljivost žena na dejstvo duvanskog dima. Takođe, žene imaju 2 transkriptovana alela za GRPR gen, poredeći ih sa jednim u muškaraca. Jedna od studija pokazala je je ovaj gen ekspresovan u 55% žena nepušača i više od 75% žena pušača, a koje su pušile < 25 paklo-godišnje cigareta, a samo u 20% muškaraca pušača (225). Sve navedeno pokazuje da su uz pušenje kao riziko faktor za nastanak karcinoma bronha, odgovorni i drugi činioci koji u osnovi imaju razliku po polu, dakle najverovatnije su polni hormoni, estogen i progesteron odgovorni za različito ispoljavanje ove bolesti u muškaraca ili žena. Stoga smo u našem radu izdvojili pušenje kao poseban riziko faktor u nastanku adenokarcinoma pluća, pa i prema primećenim razlikama po polu ispitivali povezanost, odnosno uticaj pušenja na ekspresiju beta estrogen nukleusnog receptora u tkivu tumora.

Pušačka navika kod pacijenata u našem radu kategorisana je kao sadašnji pušač, bivši pušač i nikada nije pušio. Najviše je bilo sadašnjih pušača (60%), zatim pacijenata koji nikada nisu pušili (29%) i bivših pušača (11,0%). Pušačka navika se statistički značajno razlikuje ( $p < 0,001$ ) u odnosu na pol, jer je među pacijentima muškog pola bilo čak 75% pušača, a kod žena je taj procenat bio znatno manji i iznosio je 45%. Prosečna količina popušenih cigareta izraženih po packyear metodologiji iznosila je 37,6 u celoj grupi ispitanika. Kod muškaraca je prosek bio 41,4, a kod žena 31,8 i ta razlika je statistički značajna ( $p = 0,005$ ). Poredeći naše rezultate sa rezultatima drugih studija dobijeni su slični podaci koji ukazuju na povećanu osetljivost žena na dejstvo duvanskog dima. U studiji *Lubina* i *Blot-a* u kome je učestvovalo 7804 ispitivanih pacijenata i 15,207 u kontrolnoj grupi, nađeno je da je za porast incidence karcinoma bronha potreban manji broj godina pušenja i manji broj cigareta na dan u osoba ženskog pola. U studiji *McDuffie-a* sa autorima (927 slučajeva) nađeno je da su žene sa karcinomom bronha statistički značajno mlađeg životnog doba. *Browson* sa autorima daje



podatke da su žene 2,3 puta u većem riziku od oboljevanja od karcinoma bronha u odnosu na muškarce pri istom pušačkom statusu. *Zang* i *Wynder* u svojoj studiji navode da rizik od karcinoma bronha nije povezan sa razlikama u izloženosti duvanskom dimu ili pušačkom statusu već isključivo povećanom osetljivošću žena na kancerogene duvanskog dima. U literaturi nekoliko autora čak se navodi da je mogući uzrok polnih razlika u uticaju pušenja kao riziko faktora za karcinom bronha i tradicionalno neprihvatljiv socijalni status žena pušača i „neprijavlivanje“ tačnih podataka o pušačkom statusu od strane žena. Najnovije molekularno epidemiološke studije koje istražuju razlike u dejstvu duvanskog dima prema polu ponaosob, omogućavaju ustanovljavanje molekularnih mehanizama koji su osnov povećane osetljivosti na karcinom bronha na pojedinca (jedan od njih je i različita ekspresija pojedinih genetskih mutacija koje smo nabrojali – TP53, K-ras, c-erbB-2, EGFR, GRPR) (207).

Potom smo ispitivali povezanost pušenja i receptorskog statusa adenokarcinoma pluća. Dobijeni su sledeći rezultati. Najviše pacijenata sa pozitivnim beta estrogenim receptorom u tkivu tumora je bilo među onima koji nikada nisu pušili, zatim kod bivših pušača i najmanje kod pacijenata koji su aktivni pušači. Dobijena razlika je na granici statističke značajnosti ( $p=0,060$ ). Muškarci koji nikada nisu pušili su imali pozitivan beta receptor u 50,0%, kod aktivnih pušača pozitivan beta receptor je imalo 34,7% i najmanje kod bivših pušača 22,2%. Dobijena razlika nije statistički značajna ( $p=0,340$ ). Žene nepušači su imale pozitivan beta receptor u 52,4%, bivši pušači (46,2%) i najmanje žene koje su aktivni pušači (31,1%). Dobijena razlika takođe nije statistički značajna ( $p=0,126$ ) ali zbrajanjem u istu ispitivanu grupu nepušača i bivših pušača prema aktivnim pušačima dobija se statistička značajnost od ( $p=0,005$ ), odnosno žene pušači imaju nižu ekspresiju ER $\beta$ , odnosno više njih je ER $\beta$ -, što će upućuje na verovatanoću da je ekspresija ER $\beta$  pozitivan prognostički faktor u ženskoj populaciji pacijenata. Prosečna količina popušanih cigareta, izraženih po packyear metodologiji je kod pacijenata sa negativnim nalazom beta receptora ER $\beta$  (-) iznosila 35,9, a kod pacijenata koji su ER $\beta$  (+) 40,7 i razlika nije bila statistički značajna. Odvojeno po polu, 41,8 je bila prosečna količina popušanih cigareta kod muškaraca koji su ER $\beta$ (-), a 40,9 kod muškaraca sa ER $\beta$ (+) nalazom i razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,843$ ) dok je prosečna količina popušanih cigareta 40,5 packyear kod žena koje su ER $\beta$ (-), a 27,3 kod žena koje su ER $\beta$ (+) i razlika je bila statistički značajna ( $p=0,015$ ). Dakle za ženski pol dobijamo rezultat da žene obolele od adenokarcinoma pluća, a koje su nepušači imaju pojačanu ekspresiju ER $\beta$  u tkivu tumora dok kod muškaraca nismo dobili razliku u ekspresiji ER $\beta$  u zavisnosti od pušačke navike. U literaturnim podacima je navedeno da statistički značajno



veći broj nepušača sa adenokarcinomom pluća ima povećanu ekspresiju ER $\beta$ , pri čemu je ova receptorska ekspresija nepušača statistički značajno više ispoljena u ženskoj populaciji. U studiji *Chen-Tu-Wu*-a imamo 63% muškarca pušača sa adenokarcinomom pluća, a žena pušača svega 8%. U njihovom radu povećana ekspresija ER $\beta$  (+) se statistički značajno više javlja u nepušača (53,5%) isto kao i u našem radu, pri čemu je kod žena nepušača ekspresija ER $\beta$  u tumoru tkiva bila značajno viša (58,3%) u odnosu na žene koje su pušači kao i u odnosu na ER $\beta$ (+) muškarce nepušače (40,9%) (180). Samo u jednom radu, *Grete Ali* sa autorima, nije nađena statistički značajna povezanost sa pušačkim statusom. Nađena je samo disproporcija između pušačkog statusa i pola, odnosno žena nepušača sa adenokarcinomom pluća je bilo 32,4%, muškaraca svega 10,2%. Estrogen beta receptorski status bio je jednako ispoljen i u pušača i u nepušača i to za oba pola (208).

Kao i kod solidnih tumora, karcinom bronha je bolest starije populacije stanovništva, 30-50% svih pacijenata su stariji od 70 godina (209,210). Pored toga što su incidenca karcinoma bronha i stopa mortaliteta za starije pacijente u porastu, primena različitih terapijskih tretmana porastom godišta je u padu (211,212). Komorbiditet bi se mogao definisati kao prisustvo nekog drugog oboljenja pre i u momentu dijagnostike karcinoma, (drugo oboljenje zbog koga je prethodno pacijent ispitivan i lečen, ili je to oboljenje ustanovljeno laboratorijskim i drugim ispitivanjima u momentu dijagnostike karcinoma). Uprkos činjenici da je komorbiditet u starijih veoma čest, prognostički uticaj komorbiditeta u karcinomu bronha je još uvek kontraverzan. Sa ciljem da se odgovori na pitanje o uticaju komorbiditeta na prognozu pacijenata sa karcinomom bronha formirani su pojedinačni indeksi. Zajedničko za sve ove indekse komorbiditeta je da svrstava i boduje bolesti po njihovoj težini, tako da veći broj bodova, označava teži stepen-gradus komorbiditeta. Prisustvo komorbiditeta je dodatno uticao i na izbor terapijskog tretmana kod naših pacijenata, te smo ga uz ostale karakteristike u našem radu pratili za svakog pacijenta ponaosob. Ispitivanje komorbiditeta se vrši po organskim sistemima, a izdvojena su dva najčešća i najznačajnija - respiratorni i kardiovaskularni komorbiditet, pa je i izabrana skala (index) komorbiditeta u našem radu bio ACE-27 indeks (*Adult comorbidity evaluation- 27*). U radu *Jose Antonio Gullon Blanco*-a i autora ispitivano je 1069 pacijenata sa konkomitantnim bolestima pri čemu su najčešći komorbiditeti, kao i u našem radu, bile hronična opstruktivna bolest pluća i kardiovaskularne bolesti. Od ovih pacijenata, 72 su imala dva ili više komorbiditeta. Palijativna terapija (BSC- best supportive care) je primenjena u 27,2% pacijenata sa komorbiditetima prema 11,2% pacijenata koji nisu imali pridružene bolesti, a za pacijente sa dva i više komorbiditeta ova proporcija je iznosila 65% prema 38% pacijenata koji su imali manje od 70 godina ( $P =$

0.001). U navedenom radu preživljavanje se smanjivalo porastom godišta pacijenata, porastom broja komorbiditeta, prisustvom dijabetes melitusa, gubitkom telesne mase i primenom samo simptomatskog tretamna. Gledajući ponaosob samo je kombinovano prisustvo kardiovaskularnih bolesti i HOBP uticalo na smanjivanje preživljavanja u ispitivanih pacijenata ( $P = 0.006$ ) (213). U našem radu najčešće pridružene bolesti kod ispitivanih pacijenata su bile kardiovaskularne bolesti (43,5%), HOBP (23,5%), gastrointestinalne bolesti (13,5%) i diabetes melitus (10,5%). Nije postajala statistički značajna razlika u prisustvu pridruženih bolesti u odnosu na pol ispitanika. Prosečan broj pridruženih oboljenja (sistema) je u našem radu kod svih pacijenata je bio  $1,20 \pm 1,08$  (opseg od 0-4 sistema). Prosečan broj obolelih sistema kod pacijenata muškog pola je bio  $1,21 \pm 1,08$  (opseg od 0 - 4 sistema), a kod pacijenata ženskog pola  $1,19 \pm 1,08$  (opseg od 0 - 4 sistema) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol ( $p = 0,897$ ).

Iz strane literature nalazimo da su najčešći simptomi karcinoma bronha oni koji su prouzrokovani direktnim rastom tumora (Anderson i Gripi); kod centralnog rasta to su: kašalj (75%), dispnea (60%), bol u grudima koji je stalan i teško se lokalizuje (45-49%), hemoptizije (29-35%), temperatura kao poledica opstruktivnog pneumonitisa (15-20%). Kod perifernog rasta tumora nalazimo sledeće simptome: kašalj, dispneu, bol u grudima, najčešći je pleuralni bol kom se može jasno odrediti lokalizacija. Gubitak u telesnoj težini nalazi se čak u 68% obolelih. Iako je stopa preživljavanja karcinoma bronha povećana sa razvojem novih terapijskih modaliteta kao što je primena target terapije, dugo preživljavanje je retko u odmaklog stadijuma karcinoma bronha. Dispnea i kašalj su i dalje najčešći simptomi obolelih i kod NSCLC i kod SCLC (214). U poslednjih godina sve više pažnje se posvećuje detektovanju svih simptoma karcinoma bronha u pravcu njihovog savladavanja, time i poboljšanja kvaliteta života i donekle preživljavanja (215). U našem radu kao i u prethodno navedenim, najčešći simptomi kod ispitivanih pacijenata bili su kašalj (61,0%), otežano disanje (55,0%), bol u grudnom košu (32,0%) i gubitak telesne težine (22,5%). Osim kod simptoma otežanog gutanja ( $p = 0,041$ ) nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol ispitanika.

Od ostalih karakterisitka koje su u radu praćene, koje nisu imale uzročnu povezanost sa ekspresijom ER $\beta$  bili su performans status pacijenata - ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) skala funkcionalne sposobnosti pacijenata, hereditet i prosečan indeks telesne mase (ITM) pacijenata. Najčešći ECOG status kod ispitivanih pacijenata je bio ECOG 1 (74,0%), zatim ECOG 2 (20,5%) i ECOG 0 (5,0%). Žene su češće imale ECOG 2 nego muškarci (26,6%: 15,0%), ali ta razlika nije bila statistički značajna. Viši ECOG u radu nije

postojao jer takvi pacijenti nisu bili sposobni za bilo kakav vid invazivne dijagnostičke metode, samim tim ni dobijanja patohistoloških uzoraka za analizu receptorskog statusa, sa izuzetkom jedne ispitanice čiji je PH nalaz dobijen sa obdukcijanskog materijala. Pozitivan hereditet je imalo 14,0% ispitivanih pacijenata. U odnosu na pol i hereditet ispitanika, nije bilo statistički značajne razlike ( $p= 0,839$ ). U odnosu na nalaz beta receptora takođe nije bilo statistički značajne razlike prema hereditetu ( $p= 0,973$ ): beta receptor (-) sa 13,9% i beta receptor (+) sa 14,1%. Prosečan indeks telesne mase (ITM) kod svih pacijenata je bio  $24,1\pm 3,76$  (opseg od 16,0- 42,2 kg/m<sup>2</sup>). Prosečan ITM muškaraca je bio  $23,6\pm 3,11$  (opseg od 17,3-32,9), a kod pacijenata ženskog pola  $24,6\pm 4,27$  (opseg od 16,0-42,2), nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na pol ( $p= 0,062$ ). Grupisanjem pacijenata na osnovu ITM (pothranjen, normalan i gojazan) dobijeno je da su pacijentkinje statistički značajno češće bile gojazne ( $p= 0,032$ ). Prosečan ITM kod pacijenata sa negativnim beta receptorom je bio  $24,3\pm 4,11$  (opseg od 17,3-42,2), a kod pacijenata sa pozitivnim nalazom beta receptora  $23,8\pm 3,13$  (opseg od 16,0-34,2). Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu u odnosu na nalaz beta receptora i prosečan indeks telesne mase ( $p= 0,354$ ).

Interesantan faktor od koga smo očekivali potencijalni uticaj na ekspresiju ER u karcinomu bronha kod žena bio je fertilitet. Sa endokrinološkog aspekta ekspresija ER $\beta$  je mnogo više ispoljena u premenopauzalnih i perimenopauzalnih žena u odnosu na postmenopauzalne žene sa sa karcinomom dojke (216). U jednoj od novijih studija sa velikom multicentričnom institucijalizovanom bazom podataka, premenopauzalne žene su imale više ispoljen odmakao NSCLC i veći nivo resekcije u odnosu na postmenopauzalne pacijentkinje iako je preživljavanje u njih bilo duže u odnosu na postmenopauzalne žene. Međutim u istoj studiji nije ispitivan ER status tumora (216). Studija koju su vodili Ann G. Schwartz sa autorima navedeno je da u nastanku karcinoma bronha ulogu mogu imati estrogene egzogenog porekla, kao što je hormon replacement therapy (HRT)-hormon zamenjujuća terapija, kao i endogeni estrogene (191) U nekim drugim studijama nađeno je opet da je rana menopauza vezana za smanjeni rizik od nastanka adenokarcinoma pluća, ali i da HRT može biti uzrok i povećanom i smanjenom riziku (217) od nastanka karcinoma bronha u žena, zavisno od studije koja je objavila svoje rezultate. U studiji Gao YT-a i Blot-a sa autorima koja je rađena u Kini, prevalenca žena pušača je veoma niska i rizik od nastanka karcinoma bronha je bio povećan kod žena u kasnoj menopauzi. Interesantna je analiza Koushnik-a sa autorima u kojoj su poređeni efekti menopauze na karcinom bronha. U analizi su ipitivane 422 žene sa karcinomom bronha dok je kontrolnu grupu sačinjavalo 577 žena. Rezultati njihove analize pokazali su da mesečni ciklus i trudnoća nisu imali uticaj na

nastanak karcinoma bronha ali da su žene koje su imale « neprirodnu » menopauzu bile u većem riziku od nastanka karcinoma bronha, naročito ukoliko su imale ovariektomiju. U njihovoj analizi prikazana je i obrnuta povezanost nastanka karcinoma bronha i godišta nastanka menopauze pri čemu su žene u ranoj menopauzi (pre 45-te godine) imale veći rizik od nastanka karcinoma bronha (218).

Ovakvi rezultati navode nas na sa na zaključak da cirkulišući estrogeni imaju uticaj u nastanku karcinoma bronha u žena. Stabile i autori zaključuju da su estrogeni stimulatori nastanka NSCLC i ćelijske proliferacije tumora kao i da antiestrogeni inhibišu ovaj efekat (193). Oton i autori navode da postmenopauzalne žene imaju signifikantno bolje preživljavanje u odnosu na premenopauzalne žene. Abain i autori navode da žene preko 60-te godine imaju bolje preživljavanje u odnosu na muškarce i mlađe žene (219). U radu Jessice K. Paulus-a sa autorima, duplo slepa randomizovana studija sprovedena je među ženama sa pozitivnim ER u karcinomu dojke kako bi se testirala antiestrogenska terapija, odnosno da li je zamena leka tamoxifen sa exemestanom efektivnija u prevenciji progresije bolesti i preživljavanja. Iako nije bio primarni cilj studije, nađeno je da se primarni plućni karcinom ređe javlja u žena koje su koristile exemestan koji ima uticaj u potpunom blokiranju estrogena, blokirajući biosintezu hormona, dok je tamoxifen imao samo delimičan uticaj na blokiranje ER, a delimično deluje i kao njihov agonist. Uticaj korištenja HRT i nastanka karcinoma bronha bio je povezan sa pušenjem (220). Međutim u studiji Chen-Tu Wua sa autorima dobijeno je da nije bilo razlike u ekspresiji ER $\beta$  prema fertilnom statusu pacijentkinja sa NSCLC (180) što je bio rezultat i naše studije, tačnije procenat žena koje su bile u menopauzi iznosio je 85,6%. U odnosu na nalaz beta receptora u našoj studiji nije bilo statistički značajne razlike ( $p=0,798$ ) prema procentu žena u menopauzi ili fertilnih žena. Razlog ovakvom rezultatu je verovatna predominacija žena u menopauzi u našem radu, samim tim mali broj žena u fertilnom periodu kod kojih je mogla biti razmatrana statistička značajnost ekspresije ER $\beta$ .

Zanimalo nas je i da li je postojala različita ekspresija ER $\beta$  prema stadijumu bolesti u momentu postavljanja dijagnoze? U odnosu na stadijum bolesti najviše pacijenata u našem radu je bilo u stadijumu IV (31,5%), zatim IIIa (23,5%) i IIIb (19,5%). Postojala je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) u distribuciji pacijenata prema stadijumima u odnosu na pol. Stadijum IV je bio češći kod žena (37,0%) u odnosu na muškarce (26,0%), odnosno žene su češće imale odmakliji stadijum adenokarcinoma pluća. U odnosu na nalaz beta receptora međutim nije bilo statistički značajne razlike ( $p= 0,661$ ) u distribuciji pacijenata prema stadijumima. U radu Grete Ali sa autorima (208) najčešći stadijum bolesti za oba pola bio je

IIIA stadijum bolesti (ukupno 112 ispitanika), pri čemu identično kao u našem radu, nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji pacijenata prema stadijumu bolesti. U istom radu, kao u našem, nije postojala statistička razlika u distribuciji pacijenata prema stadijumu u odnosu na nalaz ER $\beta$ . Međutim u radu Navaratnam-a sa autorima izneti su rezultati dve studije u kojima je praćena ekspresija beta estrogen receptora prema stadijumima bolesti. U prvoj studiji koja je izvođena na Univerzitetu u Manitobi ekspresija ovog receptora praćena je u pacijenata sa NSCLC u ranim stadijumima bolesti I i II, a u drugoj studiji pod imenom NCIC-CTG BR.18 trajal, praćena je ekspresija receptora u pacijenata sa odmaklim stadijumima NSCLC. U prvoj studiji 51% pacijenata je imalo nalaz pozitivnog beta estrogen receptora, dok je u drugoj studiji taj procenat iznosio 46%. Potsećanja radi naša studija je imala 39% ER $\beta$ + pacijenata. U prvoj (Manitoba) studiji, trogodišnje preživljavanje je imalo 53% pacijenata, muškarci su imali signifikatno niže preživljavanje u odnosu na žene. ER $\beta$ + pacijenati su u istoj studiji takođe imali duže preživljavanje u odnosu na ER $\beta$ - pacijente. U drugoj studiji (NCIC-CTG BR.18 trajal) je preživljavanje bilo jednako nisko bez obzira ekspresiju beta estrogen receptora. Pored poređenja receptorskog statusa, glavna razlika ove dve studije bila je u stadijumima bolesti i primenjenim terapijskim tretmanima. Ova i slične studije pokazuju da se aktivnost određenih signalnih puteva, pod čijim uticajem su i različiti tumor receptorski statusi, menja menjanjem stadijuma bolesti, odnosno progresijom bolesti, odnosno pozitivan beta estrogen receptorski status je ispoljeniji u tumoru u početnim stadijumima bolesti (221, 222). Ovim se takođe može objasniti i manji procenat pozitivnog nalaza ER $\beta$  u našoj studiji jer su pacijenti u našoj studiji statistički značajno imali odmakliji stadijum bolesti.

Prema terapijskim tretmanima najzastupljeniji terapijski tretman u svih pacijenata, bez obzira na ekspresiju estrogen receptora beta, bila je primena hemioterapije. Samo hemioterapiju primilo je ukupno kod 92 pacijenta (46,0%), zatim kombinovanu hemio i radioterapiju njih 27 (13,5%). Od analiziranih 200 pacijenata njih 62 (31%) je bilo operisano. Radioterapiju je imalo 5 pacijenata (2,5%), a samo na simptomatskoj terapiji je bilo 15 pacijenata (7,5%). Ako znamo da je najviše pacijenata u našem radu bilo u stadijumu IV bolesti kada je specifična antitumorska terapija rezervisana za primenu samo hemioterapije, jasno je da je uz ostale stadijume bolesti ovo bio najzastupljeniji terapijski tretman. Po zastupljenosti stadijuma sledio je stadijum IIIa, potom IIIb. Stadijum III bolesti se razmatra danas kao stadijum IIIA kada je bolest lokoregionalna i udaljeni stadijum sa mikrometastazama IIIB. U terapijskom tretmanu cilj je da se tumor „eradicira“ na svim svojim lokalizacijama. Tretman radioterapijom i operacijom je usmeren ka direktnom otklanjanju

tumora, dok je hemioterapija usmerena ka otklanjanju mikroskopskih metastaza uočenih CT skenom ili PET skenom. Uloga hirurškog tretmana je da se postigne resekciona površina bez tumora (R0), da je poznat patološki stadijum svih pozicija limfnih žlezdi, kao i da se obezbedi kvalitetan život pacijenta nakon operacije koji bi pacijentu otklonio tegobe koje su bile podstaknute prisustvom maligne bolesti. Kombinovani – multimodalitetni pristup lečenju pacijenata sa karcinomom bronha u III stadijumu bolesti podrazumeva dakle hirurški tretman, hemioterapiju i/ili lokalnu radioterapiju nakon hirurške intervencije (adjuvantna, postoperativna hemioterapija) ili preoperativna hemioterapija sa ili bez radioterapije (neoadjuvantna ili indukciona terapija) (223). Tako je u našem radu najčešći terapijski model u odnosu na beta estrogen receptorski status, za obe grupe pacijenata bila samo hemioterapija; za ERβ(-) ovu terapiju imalo je 45,9% pacijenata, a u grupi ERβ(+) njih 46,2%. Udružena hemio i radio terapija je bila zastupljenija u grupi ERβ (+) pacijenata, njih 21,8% u odnosu na ERβ(-) pacijente - 8,2%. Operacija i udružena hemio i radio terapija su češće u grupi ERβ(-) pacijenata sa, njih 15,6% nego kod ERβ(+) pacijenata, njih 5,1%. Postojala je statistički značajna razlika u terapijskim modalitetima u odnosu na nalaz beta receptora (p= 0,004). Ovakva razlika nas upućuje da se ERβ(+) status može smatrati boljim prognostičkim faktorom u odnosu na negativan receptoski status tumora, jer su pacijenti u istom stadijumu bolesti i bez obzira na pol sa ERβ(+) receptorskim statusom imali manju potrebu za primenom sva tri modaliteta lečenja, za razliku od odmaklog stadijuma bolesti gde je u obe grupe pacijenata (pozitivan i negativan receptorski status) primenjivana samo hemioterapija bez statistički značajne razlike u broju pacijenata koji su primali taj vid terapije.

Kada smo posmatrali terapijski odgovor na primenjene terapijske režime prema različitom estrogen receptorskom statusu dobili smo da je kod pacijenata ERβ(-) statusa tumora najčešći terapijski odgovor bila progresija bolesti i delimična regresija. Manji procenat pacijenata bio je sa kompletnom regresijom i stabilnom bolesti. Nije bilo statistički značajne razlike (p= 0,449) u terapijskom odgovoru u odnosu na nalaz beta receptora kada su ove 4 vrste terapijskog odgovora posmatrane ponaosob ali je procentualni odnos grupe pacijenata sa progresijom i delimičnom regresijom prema kompletnoj regresiji i stabilnom bolesti bio statistički značajno različit, odnosno progresija i delimična regresija su bili zastupljeniji terapijski odgovori u grupi ERβ(-) pacijenata, što nas je ponovo uputilo da ERβ(+) receptorski status, predstavlja pozitivan prognostički faktor. Prema polu karakteristika terapijski odgovor pokazala je takođe statistički značajnu razliku, jer je dobijeno da je kod muškaraca progresija bolesti bila češća u grupi pacijenata sa pozitivnim nalazom beta receptora (44,4% : 40,6%) ali nije postojala statistički značajna razlika (p= 0,873), dok je kod žena, progresija bolesti bila



češća u grupi pacijenata sa negativnim nalazom beta receptora u odnosu na nalaz beta estrogen pozitivnog tumora (55,2% : 33,3%) i postojala je statistički značajna razlika ( $p=0,050$ ). Time možemo zaključiti da su ženski pol i ER $\beta$ (+) status pozitivan prognostički faktor za karcinom bronha. U studijama drugih autora postojala su slična zapažanja i rezultati. U studiji Marquez-a sa autorima (195) takođe je dobijeno da se u omaklim stadijumima NSCLC smanjuje broj terapijskih tretmana kod ER $\beta$ (+) pacijenata. U studiji Laure P. Stabile iz 2011.godine koja je ispitivala značaj estrogen receptora  $\beta$ -1 i progesterona u prognozi obolelih od adenokarcinoma pluća, deo studije je bio posvećen praćenju terapijskog odgovora u ispitivanih. Od 183 pacijenata nađeno je da je njih 77 (42%) bilo bez progresije bolesti u prvoj godini ispitivanja, prema 106 (58%) pacijenata sa progresijom bolesti. U navedenoj studiji, slično našoj, najveći broj pacijenata je imao IIIA/IIIB stadijum bolesti. U istoj studiji, kao i u našoj, dobijeno je da je progresija bolesti češća u pacijenata negativnim beta estrogenim receptorskim statusom i negativnim progesteron receptorskom statusu i to za oba pola (224).

U radu smo pored terapijskih tretmana i terapijskog odgovora pratili period do progresije bolesti u odnosu na receptorski status. Prosečno vreme do pojave progresije bolesti je bilo 12,1 meseci (opseg 0 - 83, medijana 4). Kod muškaraca je prosek iznosio 11,8, a kod žena 12,4 meseci i razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,551$ ). Kod ER $\beta$ (-) pacijenata prosek je iznosio 10,7, a kod ER $\beta$ (+) je ovaj period bio duži i iznosio je 14,3 meseca, međutim razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,174$ ). Kod ER $\beta$ (-) žena prosek do pojave progresije bolesti iznosio je 9,46, a kod ER $\beta$ (+) žena znatno duže - 16,5 meseci i razlika je bila statistički značajna ( $p=0,041$ ). Kod muškaraca nije postojala statistički značajna razlika u periodu do progresije bolesti u odnosu na receptorski status - 11,8 meseci za ER $\beta$ (-) i jednako 11,8 meseci za ER $\beta$ (+). U studiji Laure Stabile iz 2011.godine koju smo već napomenuli, pored rezultata koji su se odnosili na terapijski odgovor pacijenata sa adenokarcinomom pluća prema receptorskom statusu tumora, ispitivan je i period do progresije bolesti. U navedenoj studiji prosečno vreme do progresije bolesti iznosilo je 14,3 meseci, nije postojalo statistički značajne razlike u odnosu na pol. U odnosu na receptorski status duže vreme do progresije bolesti imali su ER $\beta$ -1 pozitivni pacijenti u oba pola ali bez statističke značajnosti. TTP- time to progression – vreme do progresije bolesti je za ER $\beta$ -1 pozitivne pacijente iznosilo 13,1 meseci, prema 12,5 za ER $\beta$ (-)1 negativne pacijente ( $p=0,317$ ). Statistički značajna razlika u TTP postojala je u odnosu na progesteronski receptorski status takođe za oba pola (224). Kao prilikom praćenja terapijskog odgovora na osnovu ovih istraživanja, a što je rezultat i našeg istraživanja ER $\beta$ (+) status označava duži period do progresije bolesti za pacijente sa

adenokarcinomom pluća i time može takođe biti označen kao pozitivan prediktivni faktor bolesti.

Sledio je deo našeg istraživanja sa analizom i rezultatima preživljavanja. Kumulativno petogodišnje preživljavanje svih pacijenata u našoj studiji (n= 200) je bilo  $10,6 \pm 2,2\%$ . Preživljanje na godinu dana je bilo  $43,5 \pm 3,5\%$ , a na dve godine  $20,0 \pm 2,8\%$ . Ovakvi rezultati se uklapaju u mnogobrojne studije koje se odnose na preživljavanje pacijenata sa NSCLC, odnosno adenokarcinom pluća. Svakako da je srednje preživljavanje zavisilo od studije do studije, zavisno od procentualne zastupljenosti određenih stadijuma bolesti kao i primenjenih terapijskih tretmana. U studiji Lucija Di Nunna 2005. g. (221) praćeno je 248 pacijenata sa NSCLC pri čemu su svi pacijenti bili operisani. Od svih patohistoloških tipova karcinoma bronha najviše je bio zastupljen adenokarcinom, a od stadijuma bolesti Ib stadijum (55% pacijenata), najmanje zastupljen je bio IIIB stadijum bolesti (11% pacijenata). Kako su svi pacijenti operisani razumljivo je da je i preživljavanje bilo duže u odnosu na našu i slične studije u kojima je broj pacijenata sa odmaklijim stadijumima bolesti bio procentualno zastupljeniji. U studiji Lucia sa autorima je dakle očekivano dobijeno duže ukupno preživljavanje prema preživljavanju u našoj studiji, odnosno (overall survival – OS) je iznosilo 68,5% u prvoj godini, u drugoj godini 25,2 %, a u petoj godini 15,5%. Studija Jose Antonia (227) sa saradnicima u kojoj je praćeno preživljavanje pacijenata sa adenokarcinom pluća prema polu, pokazuje međutim rezultate slične našim, odnosno jednogodišnje preživljavanje je iznosilo 11%, dvogodišnje 18,9%, a petogodišnje preživljavanje pacijenata skoro identično našem, 10,9% pacijenata.

Potom smo pratili dvogodišnje i petogodišnje preživljavanje pacijenata prema polu i receptorskom statusu. Dvogodišnje preživljavanje pacijenata muškog pola (n=100) je bilo  $18,0 \pm 3,8\%$ , a pacijenata ženskog pola (n=100) je bilo  $22,0 \pm 4,1\%$  (petogodišnje - muškaraca:  $7,9 \pm 2,9\%$ , žena:  $12,9 \pm 3,4\%$ ). Iako su žene imale duže preživljevanje, nije bilo statistički značajne razlike u kumulativnom preživljavanju pacijenata u odnosu na pol (Mantel-Cox analiza p= 0,802). U radu Kamile i autora (228) opisano je kraće preživljavanje muškaraca posmatrajući različite vremenske intervale, a takodje je opisano i da je kod muškaraca rizik od smrtnog ishoda u periodu od 5 godina takođe veći, (HR 1.14, 95% CI 1.11 to 1.17). Takođe je smrtnost kod muškaraca u odnosu na različite patohistološke tipove karcinoma veća u odnosu na žene sa izuzetkom skvamoznog karcinoma bronha. Takođe je opisana veća smrtnost kod muškaraca kod lokalizovanog tipa bolesti (HR 1.25, 95% CI 1.18 to 1.33). Sekine i autori ispitivali su pacijente u III stadijumu NSCLC koji su primali konkurentnu hemio i radioterapiju. Našli su da pol nije nezavistan prognostiki faktor kao i u našem radu (229).



Skorašnje ispitivanje švajcarskih istraživača koji su ispitivali razlike u ispoljavanju karcinoma bronha prema polu takođe je pokazalo da nema razlike u preživljavanju od karcinoma bronha po polu (230).

Dvogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata sa ER $\beta$ (-) statusom (n= 122) je bilo  $15,6 \pm 3,3\%$ , a pacijenata sa ER $\beta$ (+) statusom (n= 78) je bilo  $26,9 \pm 5,0\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta$ -):  $8,0 \pm 2,5\%$ , ( $\beta$ +):  $14,7 \pm 4,1\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju pacijenata u odnosu na nalaz beta receptora (Mantel-Cox:  $p= 0,074$ ). U poslednjih nekoliko godina rađene su bronje studije u kojima je praćeno preživljavanje pacijenata prema ovom tipu receptora u tumoru tkiva. U radu Hideki Kawai-a sa autorima 2005.g. ispitivani su estrogene receptori alfa i beta (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) kao prognostički faktori u NSCLC. Dobijeno je da je ER $\alpha$  bio pozitivan u 27% pacijenata, a ER $\beta$  u 49% njih. Ekspresija ER $\alpha$  je bila vezana za lošije ukupno preživljavanje dok je ekspresija ER $\beta$  bila vezana za bolje ukupno preživljavanje ( $p= 0.048$ ). Ista studija pokazala je da su pacijenti statusa ER $\alpha$  (+), ER $\beta$ (-) signifikantno lošije prognoze u odnosu na pacijente ER $\alpha$ (-), ER $\beta$ (+) statusa. Time je zaključak njihove studije bio da ER $\alpha$  nije nezavistan prognostički faktor u pacijenata sa NSCLC, a da ER $\beta$  to jeste, pri čemu je ovaj značaj u njihovom radu dokazan samo za pacijente u I stadijumu bolesti (188). U radu Ann G. Schwartz-a iz 2005.g. koji je obuhvatao ispitivanje 278 pacijenata, njih 108 je bilo sa ER $\beta$ (-) statusom, a 170 sa ER $\beta$ (+) statusom. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju prema receptorskom statusu (191). U radu Brigit Gulddammer Skov iz 2008.g. sa autorima takođe je ispitivano preživljavanje pacijenata sa NSCLC prema receptorskom statusu. U njihovom radu 84% pacijenata je bilo ER $\beta$ (+) statusa, a ER $\beta$ (-) statusa je bilo svega 16% pacijenata, sa jednakom distribucijom ovakvog odnosa i među polovima. Kao i u našem radu nije postojala statistički značajna razlika u preživljavanju prema receptorskom statusu (231). U radu Naohira Nose sa autorima iz 2009.g. rađeno je ispitivanje na ukupno 447 pacijenata sa adenokarcinomom pluća od kojih su svi pacijenti i operisani. Nije nađena statistički značajna razlika u preživljavanju prema beta estrogen receptorskom statusu ali je ona postojala kada su udruženo posmatrani pacijenti kod kojih je istovremeno sa ER $\beta$  praćen i EGFR status. Dobijeno je da su pacijenti ER $\beta$ (+) statusa i sa prisutnom EGFR mutacijom imali statistički značajno bolje preživljavanje u odnosu na ER $\beta$ (-) i EGFR(-) pacijente ( $p= 0.007$ ) (232). U radovima koji su sledili u toku 2009.g, 2010.g, 2011.g, i 2012.g. (Chen-Tu Wu-a, GuangFeng Zhang-a, Subhakara, Laure StabileMamoun Zounesa) su dobijeni rezultati kao identični našoj studiji, da nema statistički signifikantne razlike u preživljavanju prema estrogen beta receptorskom statusu u NSCLC (223, 233, 234, 226, 235).

Međutim ono što je bio osnov našeg daljeg ispitivanja kao i ispitivanja ostalih autora u svetu odnosilo se na analizu preživljavanja pacijenata sa adenokarcinomom pluća prema ekspresiji beta receptora u tkivu tumora pluća prema polu. U našem radu analizirali smo dakle kumulativno preživljavanje u odnosu na pol pacijenata i nalaz beta receptora (muškarci (-), muškarci (+), žene (-), žene (+)). Žene sa pozitivnim beta receptorom imale su statistički značajno veće preživljavanje nego ostale tri grupe (Breslow:  $p=0,037$ ; Mantel-Cox:  $p=0,112$ ). Dvogodišnje preživljavanje muškaraca sa  $\beta^-$  receptorom ( $n=64$ ) je bilo  $15,6 \pm 4,5\%$ , a sa  $\beta^+$  receptorom ( $n=36$ ) je bilo  $22,2 \pm 6,9\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta^-$ ):  $7,3 \pm 3,3\%$ , ( $\beta^+$ ):  $0,0 \pm 0,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju muškaraca u odnosu na nalaz beta receptora (Mantel-Cox:  $p=0,380$ ). Dvogodišnje preživljavanje žena sa  $\beta^-$  receptorom ( $n=58$ ) je bilo  $15,5 \pm 4,8\%$ , a sa  $\beta^+$  receptorom ( $n=42$ ) je bilo  $31,0 \pm 7,1\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta^-$ ):  $8,6 \pm 3,7\%$ , ( $\beta^+$ ):  $18,8 \pm 6,1\%$ ). Žene sa  $\beta^+$  receptorom imale su statistički značajno veće preživljavanje nego žene sa  $\beta^-$  receptorom (Mantel-Cox:  $p=0,024$ ). Početkom našeg ispitivanja, odnosno u periodu 2005. do 2008.g. objavljene studije su ukazivale na razlike u preživljavanju NSCLC prema polu, a u odnosu na beta estrogen receptorski status, pri čemu je nekoliko studija prikazalo da je  $ER\beta(+)$  status vezan za bolje preživljavanje u muškaraca. Jedna od takvih studija bila je studija iz 2005.g. autorke Ann G. Schwarts u kojoj je pokazano da žene sa  $ER\beta(+)$  statusom adenokarcinoma pluća imaju nesigifikantan porast mortaliteta u odnosu na žene sa  $ER\beta(-)$  statusom, dok su muškarci sa  $ER\beta(+)$  statusom imali sigifikantno smanjenu incidencu mortaliteta u odnosu na  $ER\beta(-)$  status muškaraca ( $p=0,007$ ) (191). U radu Brigit Guldhammer Skov sa autorima iz 2008 godine kao i u našem radu nije bilo razlike u preživljavanju prema beta estrogen receptorkom statusu kada su posmatrani svi pacijenti (104 pacijenata), ali diferenciranjem prema polu, žene sa  $ER\beta(-)$  statusom su imale nesigifikantno nižu stopu mortaliteta u odnosu na žene sa  $ER\beta(+)$  statusom ( $p=0,26$ ). Nasuprot tome muškarci sa  $ER\beta(-)$  statusom su imali statistički nižu stopu mortaliteta u odnosu na muškarce sa  $ER\beta(+)$  statusom ( $p=0,035$ ). U zaključku navedene studije estrogen beta receptor pozitivan status i muški pol su predstavljali pozitivan prognostički faktor (231). U radu Grete Ali sa autorima takođe je preživljavanje bilo sigifikantno bolje u muškaraca sa  $ER\beta(+)$  statusom ( $p=0,048$ ) (236). Iz svega navedenog prilikom započinjanja ove studije, jedna od hipoteza je bila da postoji razlika u ekspresiji beta estrogen receptora u adenokarcinomu pluća prema polu kao i da je  $ER\beta(+)$  status povezan sa dužim preživljavanjem za osobe muškog pola. Novijim istraživanjima koja su sledila u svetu međutim dokazuje se često suprotno. Tako u radu Naohiro Nose u kome je proučena povezanost uticaja  $ER\beta$  i EGFR nađeno da je  $ER\beta(+)$  status vezan za duže preživljavanje ali

kod EGFR pozitivnih pacijenata. Takođe je ER $\beta$ (+) status bio povezan sa dužim preživljavanjem kod pacijenata koji su u tumorskom tkivu imali i ER $\alpha$  (+) nalaz. Ovim su autori zaključili da je Er $\beta$  ima uticaj ne samo na ćelijsku proliferaciju kao izolovan receptor već svoj supresivni efekat na proliferaciju ima inhibicijom transkriptivne aktivnosti Er $\alpha$ . Kako je u njihovom radu ER $\alpha$  (+) nalaz bio zastupljeniji u ženskoj populaciji, duže preživljavanje je u celini bilo ispoljeno kod žena sa ER $\beta$ (+) statusom (237). U radu Chen-Tu Wu-a sa autorima takođe se navodi da je ER $\beta$ (+) status, ženski pol ali i nepušački status sa boljom diferencijacijom tumora povoljan prognostički faktor u NSCLC (223). Subhankar Chakraborty sa autorima navode dva manja trajala (faza II trajali) u kojima je ispitivano kombinovano dejstvo tamoxifena (antiestrogena) sa ifosfamidom, epirubicinom i cisplatinom u pacijenata sa relapsom NSCLC pri čemu je dobijeno duže preživljavanje sa 7.7 na 12 meseci korištenjem antiestrogena, kao što su dobili i da je period bez progresije bolesti korištenjem antiestrogena produžen sa 20 na 47% što opet upućuje na ukupno bolju prognozu pozitivnog ER $\beta$  statusa u obolelih pacijenata (234). Takođe su u pilot studiji Traynora i autora objavljeni podaci da je kombinovana primena fulvestranta i gefitiniba u 22 posmenopauzalne žene sa odmaklim NSCLC, a koje su imale ER $\beta$ (+) status tumora, dalo značajno bolje preživljavanje u odnosu na ER $\beta$ (-) žene. Preživljavanje za žene ER $\beta$ (+) statusa tumora iznosilo je 65.5 nedelja prema 21 nedelju za žene sa ER $\beta$ (-) nalazom tumora (203). Jedan od retkih novijih radova je bio rad Laure Stabile iz 2011.g. u ome su dobijeni podaci da su žene signifikantno dužeg preživljavanja i da imaju duži period do progresije bolesti od muškaraca ali da je beta estrogen receptorska ekspresija u tumoru vezana za duže preživljavanje u muškog pola (189). U novije vreme takav zaključak je bio redak u odnosu na zaključke i rezultate drugih autora. Momoun Younes sa autorima iz 2011.g. takođe je opisao bolje preživljavanje u žena sa pozitivnim beta estrogenim receptorom u tkivu tumora dukalnog karcinoma dojke ali i u paicijentkinja koje su primale antiestrogene kao što je tamoxifen i u žena sa adenokarcinomom bronha koje su takođe imale pozitivan ER $\beta$  u tkivu tumora pluća (235). Rad Sri Navraratnama sa autorima komparira dve studije, Manitoba studija u kojoj su pacijenti imali I i II stadijum NSCLC sa visokom ekspresijom ER $\beta$  i NCIC-CTG studiju u kojoj su pacijenti imali odmakliji stadijum bolesti (II i III) i u kojoj je ekspresija ER $\beta$  bila statistički manje procentualno zastupljena. Poređenjem ove dve studije značajno duže preživljavanje je bilo u prvoj studiji, što je sasvim razumljivo iz stanovišta različitih stadijuma bolesti u ove dve studije, ali je u drugoj studiji značajno duže preživljavanje postojalo za ER $\beta$  pozitivne žene. Ukupno sagledavajući iako nam je jedna od hipoteza postavljena u doktorskoj disertaciji bila da je preživljavanje muškaraca sa ER $\beta$ (+) statusom tumora duže, krajnji rezultat naše studije je bio obrnut, tačnije

žene sa ERβ(+) statusom tumora su imale bolje preživljavanje što je zaključak i svih novijih studija koje su se bavile ovom vrstom ispitivanja, a što je u ispred navedenim studijama prikazano.

Sagledavajući preživljavanje prema pušačkom statusu dobili smo da nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju pacijenata u odnosu na pušačku naviku (Mantel-Cox analiza  $p=0,360$ ). Dvogodišnje kumulativno preživljavanje u mesecima pacijenata koji su pušači je bilo  $19,2 \pm 3,6\%$ , bivših pušača je  $31,8 \pm 9,9\%$ , a nepušača  $17,2 \pm 5,0\%$  (petogodišnje preživljavanje pušača je bilo  $9,3 \pm 2,8\%$ , bivših pušača  $18,2 \pm 8,2\%$  i nepušača  $10,1 \pm 4,0\%$ ). Dvogodišnje kumulativno preživljavanje muškaraca koji su bili pušači je bilo  $20,0 \pm 4,6\%$ , bivših pušača je bilo  $11,1 \pm 10,5\%$ , a nepušača  $12,5 \pm 8,3\%$ . Petogodišnje preživljavanje pušača je iznosilo  $8,5 \pm 2,8\%$  meseci, bivših pušača  $11,1 \pm 10,5\%$ , nepušača nije bilo među živima nakon 5 godina. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju muškaraca u odnosu na pušačku naviku. Dvogodišnje kumulativno preživljavanje žena koje su bile pušači je bilo  $17,8 \pm 5,7\%$  meseci, bivših pušača  $46,2 \pm 13,8\%$ , a nepušača  $19,0 \pm 6,1\%$  (petogodišnje preživljavanje  $10,7 \pm 4,7\%$ /  $23,1 \pm 11,7\%$ /  $11,9 \pm 5,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju žena u odnosu na pušačku naviku. Ovakvi rezultati dobijeni su i u radovima koje smo ispred opisali sa izuzetkom studije Mahesh S Archana sa autorima koji su posmatrali tridesetomesečno preživljavanje pacijenata sa karcinom bronha, kada su između ostalih karateristika koji utiču na preživljavanje pratili i pušački status. Njihovi rezultati su pokazali da je 30-omesečno preživljavanje pacijenata sa karcinom bronha bilo prisutno u 32% pušača prema 49% nepušača (237). Interesantno je međutim, a i dokazano u brojnim radovima da je značajan faktor koji utiče na duže preživljavanje prestanak pušenja. U radu istraživača sa Univerziteta iz Birminghama koji je objavljen 2013.g. sumirani su rezultati deset studija koji su merili efekte prestanka pušenja nakon postavljanja dijagnoze karcinoma bronha. Oni su pronašli da nastavak pušenja nakon postavljanja dijagnoze karcinoma bronha u ranim stadijumima bolesti povećava rizik od smrti kao i relapsa bolesti. Petogodišnje preživljavanje pacijenata koji su prestali sa navikom pušenja je 63-70% prema 29-33% pacijenata koji su nastavili sa pušenjem. Dužina petogodišnjeg preživljavanja se prema napomenutim autorima udvostručava kod pacijenata koji su prestali sa pušenjem.

Preživljavanje praćeno prema stadijumima bolesti pokazalo je da niko od 5 pacijenata sa stadijumom Ia nije umro u periodu praćenja, a svih 5 pacijenata sa stadijumom IIa su umrla zaključno sa 28 mesecom. Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa stadijumom Ib je bilo  $47,0 \pm 10,6\%$ , sa stadijumom IIb je iznosilo  $11,1 \pm 7,4\%$ , sa IIIa  $8,5 \pm 4,1\%$ , sa IIIb je bilo  $0,0 \pm 0,0\%$  (svi umrli od 34 meseca) i sa stadijumom IV je iznosilo  $6,3 \pm 3,1\%$ . Sasvim

razumljivo postojala je statistički značajna razlika (Mantel-Cox analiza  $p < 0,001$ ) u preživljavanju pacijenata u odnosu na stadijum bolesti.

Preživljavanje u odnosu na receptorski status i stadijum bolesti je u našem radu pokazalo da je dvogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata u Ia ili Ib stadijumu sa  $\beta$ -receptorskim statusom tumora bilo  $66,7 \pm 11,1\%$ , a pacijenata sa  $\beta+$  receptorskim statusom  $90,0 \pm 9,5\%$  (petogodišnje preživljavanje ( $\beta-$ ):  $41,8 \pm 11,9\%$ , ( $\beta+$ ):  $80,0 \pm 12,6\%$ ). Postojala je granično statistički značajna razlika (Mantel-Cox:  $p = 0,088$ ) u kumulativnom preživljavanju pacijenata sa stadijumom bolesti Ia ili Ib u odnosu na nalaz beta receptora, odnosno pacijenti u ovom stadijumu sa  $\beta+$  estrogen receptorskim statusom imaju duže preživljavanje. Potom je izolovano posmatran IIIa stadijum bolesti pri čemu smo dobili da je dvogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata u IIIa stadijumu sa  $\beta$ -estrogen receptorskim statusom bilo  $8,0 \pm 5,4\%$ , a pacijenata sa  $\beta+$  receptorskim statusom  $18,2 \pm 8,2\%$  i nije dobijena statistički značajna razlika (Mantel-Cox:  $p = 0,419$ ) u preživljavanju pacijenata sa stadijumom bolesti IIIa u odnosu na nalaz beta estrogenog receptora. Potom je praćeno preživljavanje pacijenata sa IIIb i IV stadijumima bolesti prema receptorskom statusu, kada smo dobili da je jednogodišnje kumulativno preživljavanje pacijenata u ovim stadijumima sa  $\beta$ -receptorskim statusom bilo  $19,4 \pm 5,0\%$ , a pacijenata sa  $\beta+$  receptorskim statusom  $25,0 \pm 6,8\%$ . Postoji statistički značajna razlika (Mantel-Cox:  $p = 0,013$ ) u preživljavanju pacijenata sa stadijumom bolesti IIIb ili IV u odnosu na nalaz beta receptora, odnosno  $\beta+$  estrogen receptorski status je u ovih pacijenata takođe povezan sa dužim preživljavanjem. Slični rezultati dobijeni su u studiji Sri Navaratnama (182) koje smo prikazali u ranijim navodima, a u kojoj je prikazana analiza i poređenje dve studije, Manitoba studije u kojoj su pacijenti bili u I i II stadijumu NSCLC sa visokom ekspresijom ER $\beta$  i NCIC-CTG studije u kojoj su pacijenti imali odmakliji stadijum bolesti (II i III) i u kojoj je ekspresija ER $\beta$  bila statistički manje procentualno zastupljena. U drugoj studiji iako je ukupno preživljavanje pacijenata bilo kraće značajno duže preživljavanje postojalo za ER $\beta$  pozitivne pacijentkinje. U radu Laure Stabile sa autorima procentualno je bio najzastupljeniji IIIA/IIIB stadijum sa takođe prikazanim boljim preživljavanjem sa ER $\beta$  pozitivnim statusom tumora udruženim sa pozitivnim progesteronskim statusom tumora u odmaklom stadijumu NSCLC (189).

Na samom kraju studije pratili smo i period do progresije bolesti za sve pacijente prema polu i prema receptorskom statusu. Bez pojave progresije bolesti posle 2 godine praćenja kod muškaraca je bilo  $16,0 \pm 3,7\%$ , a kod žena je bilo  $17,0 \pm 3,7\%$  (a na 5 godina odnos muškarci, žene bio je  $4,0 \pm 2,0\% : 6,0 \pm 2,4\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u periodu do pojave progresije bolesti u odnosu na pol pacijenata (Mantel-Cox:  $p = 0,894$ ). U

odnosu na receptorski status dobili smo da je bez pojave progresije bolesti na 2 godine kod pacijenata sa  $\beta^-$  receptorskim statusom bilo je  $12,3 \pm 3,0\%$  pacijenata, a kod pacijenata sa  $\beta^+$  receptorskim statusom njih  $21,8 \pm 4,6\%$  ( $p= 0,156$ ) (na 5 godina  $4,9 \pm 2,0\% : 5,1 \pm 2,5\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na u pojavu progresije bolesti prema nalazu estrogen beta receptora u tkivu tumora (Mantel-Cox:  $p= 0,300$ ). U odnosu na pol i receptorski status međutim dobili smo da je bez pojave progresije bolesti u periodu od 2 godine kod muškaraca sa  $\beta^-$  receptorskim statusom bilo njih  $14,1 \pm 4,3\%$ , a kod muškaraca sa  $\beta^+$  receptorskim statusom ( $n= 36$ ) je bilo njih  $19,4 \pm 6,6\%$  (na 5 godina  $4,7 \pm 2,6\% : 0,0 \pm 0,0\%$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi progresije bolesti u odnosu na nalaz estrogen beta receptora kod muškog pola (Mantel-Cox,  $p= 0,797$ ). Međutim kod žena sa  $\beta^-$  receptorskim statusom u periodu od dve godine bez progresije bolesti je bilo njih  $12,1 \pm 4,3\%$ , a kod žena sa  $\beta^+$  receptorskim statusom njih  $23,8 \pm 6,8\%$  (na 5 godina  $5,2 \pm 2,9\% : 7,1 \pm 4,0\%$ ). Postojala je statistički značajna razlika u pojavi progresije bolesti u odnosu na nalaz estrogen beta receptora kod žena (Mantel-Cox,  $p= 0,049$ ), odnosno žene sa pozitivnim estrogen beta receptorskim statusom imale su statistički duži period do progresije bolesti. Slični rezultati dobijeni su u već pominjanoj studiji Laure Stabile sa autorima u kojoj su žene osim ukupno dužeg preživljavanju u odnosu na muškarce imale i duži period do progresije bolesti (time to progression-TTP) ( $p= 0,009$ , medijana 2,66godina). Takođe je prikazan duži TTP za estrogen pozitivan receptorski status kod žena kao i kada je u njih bio pozitivan progesteron receptorski status ( $p= 0,039$ ; HR=1.05; 95% CI=1.00, 1.10) (189).

Estrogeni receptori postoje u svojoj inaktivnoj formi u okviru multiproteinskog kompleksa koji sadrži i takozvane heat shock proteine, a u odsustvu liganda. Vezujući se za ligand počinje proces koji dovodi do promena u samom receptoru, što sve rezultuje disocijaciji heat shock proteina i rearanžmanu sa histon modifikujućom aktivnosti. Kada se ovako aktivirani estrogeni receptori povežu sa estrogen receptor odgovarajućim elementima u delovima promoterskih regiona target gena, pojavljuje se transkriptivna regulacija u ligand zavisnim delovima receptora i započinje njihova aktivnost (238). Ovako transkriptovana aktivnost u nukleusu dovodi i do aktivnosti estrogena na površini ćelije za minut nakon administracije  $17\beta$ -estradiola. Ovakva negenomska ekspresija estrogenih receptora uključuje brzu aktivnost mnogih signalnih molekula kao što su IGF-I i receptori epidermalnog faktora rasta (EGFR), MAPK, Akt, protein kinaza C, oslobađanje kalcijuma i nitrik oksida (239). Videli smo da veliki broj studija kao i naša studija dokazuju da estrogeni receptori (ER) imaju značajnu ulogu u karcinomu bronha. Estrogeni su promoteri rasta ćelija NSCLC, antiestrogeni time mogu biti inhibitori ovog rasta (240, 241), što svakako sugerira da ER signalni putevi



moгу biti potencijalna meta u terapiji i prevenciji karcinoma bronha. Uvođenje anti-estrogene terapije u karcinomu bronha započinje u poslednjoj deceniji. Prvobitne studije su bile prekliničke. Takve studija je Marquez- Garbanova sa autorima u kojoj je fulvestrant kao antiestrogen pokazao signifikantnu redukciju tumorskog volumena na NCI-H23 ćelijama NSCLC koje su bile ubrizgane ovariektomisanim miševima. Signifikantno, erlotinib kada je davan samostalno nije imao efekta na in vivo rast NCI-H23 ćelijama. Svakako je kombinovana primena fulvestranta sa erlotinibom bila efikasnija od upotrebe samo fulvestranta kao antiestrogena. Slične studije kao prekliničke rađene su sa drugim EGFR inhibitorom- gefitinibom, kao i umesto antiestrogena sa inhibitorom aromataze – exemestanom. Sledile su potom kliničke studije upotrebe antiestrogena u terapiji karcinoma bronha. Takva je bila studija Subhankar Chakraborty-ja sa autorima u kojoj je ispitivano dejstvo tamoxifena kao antiestrogena sa ifosfamidom, epirubicinom i cisplatinom i to u pacijenata sa relapsom NSCLC. Terapijski odgovor je povećan sa 20 na 47%, a period bez bolesti ( progression free survival- PFS) i ukupno preživljavanje (overall survival – OS) su takođe povećani ( PFS sa 4.9 na 6 meseci i OS sa 7.7 na 12 meseci) (234). Takođe je objavljena pilot studija u kojoj je korištena kombinacija fulvestranta kao antiestrogena i gefitiniba kao TKI inhibitora u 22 postmenopauzalne žene sa proširenim NSCLC pri čemu je dobijen rezultat da je kod estrogen  $\beta$ + žena OS iznosio 65.5 nedelja prema samo 21 nedelju za žene koje su imale estrogen  $\beta$ -receptorski status (242).

Najnovije studije upućuju nas u to da estrogen receptorski signalni put, naročito signalni put ER  $\beta$ , ima ukršteno dejstvo sa signalnim putem receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR). Matsuo i autori u svojoj multicentričnoj studiji dokazuju da ženski pol i duži fertilni period žena predstavljaju riziko faktor za NSCLC sa EGFR pozitivnom mutacijom, a koja je postojala u čak 39,7% adenokarcinoma od 435 pacijenata sa NSCLC prema 2.175 ispitanika u kontrolnoj grupi (243). Fulvestrant je odobren kao lek za postmenopauzalne žene, ER pozitivnog metastatskog karcinoma dojke. Ovaj lek još uvek nije odobren za upotrebu u karcinomu bronha ali se prema svemu navedenom u našem radu kao i u svim navedenim studijama nameće zaključak da bi njegova upotreba dala značajan benefit u pacijenata sa ER  $\beta$  pozitivnim karcinomom bronha kako u žena tako i u muškaraca. Posebno su poslednji radovi dali ohrabrujuće rezultate koji bi omogućili upotrebu kombinovane hormonske i biološke terapije (antiestrogeni i TKI) u pacijenta kod kojih su ekspredovana oba receptora (ER i EGFR), a sve kao deo multimodalitetnog lečenja adenokarcinoma pluća, odnosno NSCLC. Kako se iz ove doktorske disertacije dobija zaključak da je prisustvo pozitivnog  $\beta$  estrogen receptora u tkivu adenokarcinomu bronha pozitivan prognostički faktor, a poznato je da je

prisustvo mutacije receptora epidermalnog faktora rasta takođe pozitivan prognostički faktor u odmaklog adenokarcinoma pluća, nameće se ideja koja nas upućuje na dalja istraživanja koje smo samo donekle sproveli u ovoj doktorskoj disertaciji, a koje će biti usmerena na udruženo ispitivanje ekspresije i terapijskog značaja ER  $\beta$  i EGFR u adenokarcinomu pluća.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Negativan nalaz beta estrogen receptora u adenokarcinomu pluća je češći u odnosu na pozitivan beta estrogen receptorski status, bez razlike prema polu, starosti, hereditetu, stadijumu bolesti, komorbiditetu i fertilitetu kod žena.
2. Procenat žena pušača sa adenokarcinomom pluća je statistički značajno manji u odnosu na muškarce. Pušački staž i količina popušenih cigareta izraženih po packyear metodologiji je kod žena sa adenokarcinomom pluća takođe statistički značajno manja u odnosu na muškarce.
3. Beta estrogen pozitivan receptorski status u tkivu adenokarcinoma pluća češći je u nepušača za oba pola. Kod žena nepušača je statistički značajno češći.
4. Žene koje su imale estrogen pozitivan receptorski status statistički značajno češće manje su pušile izraženio po packyear metodologiji.
5. Bolji terapijski odgovor i duži period do progresije bolesti postoji kod žena sa pozitivnim beta estrogenim receptorskim statusom. Kod muškaraca receptorski status nema uticaja na terapijski odgovor i period do progresije bolesti.
6. Žene sa pozitivnim beta estrogenim receptorskim statusom imale su statistički značajno bolje preživljavanje nego žene i muškarci sa negativnim beta estrogenim receptorskim statusom, odnosno muškarci sa pozitivnim receptorskim statusom.
7. Kod pacijenata sa pozitivnim beta estrogen receptorskim statusom petogodišnje preživljavanje u IA i IB stadijumu bolesti je statistički značajno bolje.
8. Kod pacijenata sa pozitivnim beta estrogen receptorskim statusom jednogodišnje preživljavanje u IIIb i IV stadijumu bolesti je statistički značajno bolje.
9. Period do progresije bolesti je duži za žene sa estrogen beta pozitivnim receptorskim statusom u odnosu na žene sa estrogen beta negativnim receptorskim statusom i muškarce bez obzira na receptorski status.
10. Beta estrogen receptor je nezavisni prognostčki faktor za pacijente sa adenokarcinomom pluća zajedno sa stadijumom bolesti i vrstom primenjene terapije.

## 7. PRILOZI

Prilog 1. Šesta revizija Internacionalni sistem za stejdžing karcinoma bronha

Okultni karcinom	TX	N0	M0
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum IA	T1	N0	M0
Stadijum IB	T2	N0	M0
Stadijum IIA	T1	N1	M0
Stadijum IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadijum IIIA	T3	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
Stadijum IIIB	T bilo koji	N3	M0
	T4	N bilo koji	M0
Stadijum IV	T bilo koji	N bilo koji	M1

Prilog 2. Sedma revizija TNM klasifikacije karcinoma bronha. Goldstraw P. IASLC Staging Manual in Thoracic Oncology. IASLC. Denver, Colorado, USA, 2009.

Okultni karcinom	Tx	N0	M0
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum IA	T1a - T1b	N0	M0
Stadijum IB	T2a	N0	M0
Stadijum IIA	T1a - T1b - T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stadijum IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadijum IIIA	T1 - T2 - T3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0 - N1	M0
Stadijum IIIB	T4	N2	M0
	Bilo koji T	N3	M0
Stadijum IV	Bilo koji T	bilo koji N	M1a ili M1b

Prilog 3. ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) skala

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982; 5: 649-55.

Funkcionalna sposobnost	
0	Potpuno aktivan, sposoban da obavlja sve aktivnosti kao i pre bolesti, bez ograničenja
1	Ograničen u napornim fizičkim poslovima ali pokretan i sposoban da obavlja lakše ili sedeće poslove, na primer kućne ili kancelarijske poslove
2	Pokretan i u stanju da brine za sebe ali nesposoban da obavlja bilo koji posao. Više od 50% dnevnog vremena je van kreveta
3	U stanju da se brine o sebi vrlo ograničeno, vezan za krevet ili stolicu 50% i više dnevnog vremena
4	Potpuno onesposobljen, ne može ništa da brine o sebi, potpuno vezan za krevet ili stolicu
5	Mrtav

Prilog 4. Tabela ACE-27 index skala komorbiditeta - Adult Comorbidity Evaluation-27

Komorbiditet	Gradus. 3 Teški poremećaj	Gradus.2 Srednji poremećaj	Gradus.1 Laki poremećaj
<b>Kardiovaskularni sistem</b>			
Infarkt miokarda	*nedavni (< ili = 6 mesec)	* > 6 meseci star	*Registrovan na EKG, starost neodređena
Angina pectoris/ koronarna bolest	*Nestabilna angina	*Hronična angina na napor *Nedavni (do 6 meseci) Koronar. Art. bajpas (CABG) ili Perkutana Transluminalna Koronarna angioplastika (PTCA) *nedavni (6m) koronarni stent	*Asimptomatska koronarna bolest verifikovana EKG, Ergometrijom ili kateterizacijom *Angina pectoris bez potrebe za hospitalizaciju *CABG ili PTCA >6 meseci *Koronarni stent >6 meseci
Zastojna srčana slabost (Congestive heart Failure-CHF)	*nedavna hospitalizacija (6m) *ejekciona frakcija <20%	*Hospitalizacija >6meseci *CHF+Dispnea koja ograničava aktivnost	* CHF+Dispnea koja je reagovala na tretman *Dispnea na napor *Paroksizmalna noćna dispnea
Aritmije	*Nedavna ventrikularna aritmija (do 6 meseci)	*Ventrikularna aritmija >6 meseci *Hronična atrijalna fibrilacija ili flater *Pejsmejker	*Sick sinus sindrom

*Prilog 5. Skala terapijskog odgovora*

	Tumor merljiv	Tumor nemerljiv
Kompletna remisija (CR)	kompletan nestanak svih patoloških promena u trajanju od najmanje 4 nedelje	kompletan nestanak svih patoloških promena u trajanju od najmanje 4 nedelje
Parcijalna remisija (PR)	50 posto smanjenja jednodimenzionalnog dijametra tumora bez druge lezije u trajanju od najmanje 4 nedelje	procenjeno smanjenje tumora za najmanje 50% u trajanju od najmanje 4 nedelje
Bez promene (NC)	ne može se ustanoviti 50% smanjenja niti 25% porasta promene	bez signifikatnih promena u trajanju od najmanje 4 nedelje
Progresija bolesti (PD)	25% porasta veličine promene ili pojava nove lezije	25% porasta veličine promene ili pojava nove lezije

## 8. LITERATURA:

1. Franks LM. What is cancer? In: Franks LM, Teich NM (Edt.). Introduction to Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press. 1991;1-30.
2. Sterward J and Stanley K. Lung cancer: a world wide health problem. Lung cancer, 1988;8:11-12.
3. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008, Eur. J. Cancer 46 (2010) 765-81.
4. UK CR. CancerStats – Cancer Statistics for the UK, 2011, <http://info.Cancerresearchuk.org/cancerstats/>.
5. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics 2010, CA Cancer J. Clin. 60 (2010) 277-300.
6. Cetin K, Ettinger DS, Hei YJ, O'Malley CD. Survival by histologic subtype in stage IV nonsmall cell lung cancer based on data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program. Clin Epidemiol. 2011;3:139-48.
7. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society; 2012. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf> Accessed on 15 August 2012.
8. Kamangar F, Dores MG, Anderson FW. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World Journal of Clinical Oncology, 2006; 24 (14): 2137-50.
9. Choi M, Craft B, Geraci SA. Surveillance and monitoring of adult cancer survivors. Am J Med. 2011; 124(7):598-601.
10. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin. 2011; 61(4):212-36.
11. Schwartz AG, Geoffrey MP, Lonardo VMF, Pass H, Schwartz J, Brooks S. Nuclear estrogen receptor – beta in lung cancer: expression and survival differences by sex. Clin. Canc. Res 2005; 11: 7280-87.
12. Hershberger PA, Vasquez AC, Kanterewicz B, Land S, Siegfried JM, Nichols M. Regulation of endogenous gene expression in human non- small cell lung cancer by estrogen receptor ligands. Cancer Res 2005;65:1598-605.
13. Dabbs DJ, Landerneau RJ, Liu Y. et al. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. Ann Thorac Surg 2002; 73: 403-406.
14. Schwartz AG, Geoffrey MP, LonardoVMF, Pass H, Schwartz J, Brooks S. Nuclear estrogen receptor - beta in lung cancer: expression and survival differences by sex. Clin Canc Res 2005;11:7280-7287.

15. Stephen Hammes R. and Ellis Levin R. Extranuclear Steroid Receptors: Nature and Actions *Endocrine Reviews* 28(7):726–741 The Endocrine Society doi: 10.1210/er.2007-0022.
16. Ferley J, Shin HR, Braz F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed on 10 August 2012.
17. Cancerresearchuk.org. London; Cancer Research UK; Lung cancer statistics (updated 19 September 2011, last accessed 12 August 2012). Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/lung-cancer-world/>.
18. American Cancer Society. Cancer facts & Figures 2010. Atlanta: American Cancer Society; 2010.
19. Eduard V, Marek ZW, Tadeusz P, Gyorgy B, Peter B, Jindrich F, Vladimir T, nenad B, Adina C, and SEERG. *Croat. Med J.* 2011 Augut; 52(4): 478-87.
20. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62: 10-29.
21. Samet JM, Alberg AJ, Ford JG. Epidemiology of lung cancer and mesotelioma. *Eur Respir Mon* 2009;44:349-91.
22. Cancerresearchuk.org. London; Cancer Research UK; Lung cancer statistics (updated 13 April 2012, last accessed 10 August 2012). Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/lung/incidence/>
23. Kamangar F, Dores MG, Anderson FW. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World *Journal of Clinical Oncology*, 2006; 24 (14): 2137-50.
24. Choi M, Craft B, Geraci SA. Surveillance and monitoring of adult cancer survivors. *Am J Med.* 2011; 124(7):598-601.
25. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Annals of Oncology*, 2012;23:1044–1052.
26. Wynder EL. (1950) Tobacco smoking as a possible etiological factor in brochogenic carcinoma. A study of six hundered and eighty-four proved cases. *JAMA* 143: 329-46.
27. Lubin JH. et al. Cigarette smoking and cancer risk: modeling total exposure and intensity. *Am J Epidemiol*, 2007. 166(4): 479-89.
28. Wang JB, Jiang Y, Wei WQ, Yang GH, Qiao YL, Boffetta P. Estimation of cancer incidence and mortality attributable to smoking in China. *Cancer Causes Control.* 2010; 21(6):959-65.
29. Hoffmann D, Hoffmann I, Ed Bayoumy K. (2001). He less harmful cigarette:a contraversal issue a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 14: 767-90.
30. Bjartveit K, Tverdal A. [Health consequences of smoking 1–4 cigarettes per day.](#) *Tob Control* 2005;14(5):315-20.
31. Pope CA, Burnett RT, Turner MC. et al. [Lung cancer and cardiovascular disease mortality associated with ambient air pollution and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationships.](#) *Environ Health Persp* 2011;119(11):1616-21.

32. Jemal A, Travis WD, Tarone RE. et al. Lung cancer rates convergence in young men and women in the United States: analysis by birth cohort and histologic type. *Int J Cancer* 2003;105:101–07.
33. Hecht SS. (2009) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1194-210.
34. Darby S, Hill D, Auvinen A. et al. [Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies](#). *BMJ* 2005;330(7485):223.
35. Villeneuve PJ, Parent MÉ, Sahni V, Johnson KC. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Occupational exposure to diesel and gasoline emissions and lung cancer in Canadian men. *Environ Res.* 2011;111(5):727-35.
36. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Hvidberg M, Jensen SS, Ketznel M, Sørensen M. et al. Air pollution from traffic and cancer incidence: a Danish cohort study. *Environ Health.* 2011; 19;10:67.
37. Ameille J, Brochard P, Letourneux M, Paris C, Pairon JC. Asbestos-related cancer risk in patients with asbestosis or pleural plaques. *Rev Mal Respir.* 2011; 28(6):11-7.
38. Dwyer T, Blizzard L, Shugg D. et al. Higher lung cancer rates in young woman than young man. *Cancer Causes Control* 2004; 5, 351-8.
39. Jun-ichi Nitador, Manami Inoue, Motoki Iwasaki, et al. Association Between Lung Cancer Incidence and Family History of Lung Cancer. *Chest Journal.* 2006;130(4):83-9.
40. Cassidy A, Myles JP, Duffy SW, Liloglou T, Field JK. Family history and risk of lung cancer: age-at-diagnosis in cases and first-degree relatives. *Br J Cancer.* 2006; 95(9):1288-90.
41. Yuan JM, Ross RK, Chu XD. et al. (2001) Prediagnostic levels of serum beta-cryptoxanthin and retinol predict smoking-related lung cancer risk in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 767-73.
42. Linseisen J, Rohrmann S, Bueno-de-Mesquita B, Büchner FL, Boshuizen HC, Agudo A. Consumption of meat and fish and risk of lung cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(6):909-18.
43. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19: 2474-88.
44. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:733–44.
45. Peterson LA. Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines. *J Nucleic Acids* 5;2010 (2010).
46. Chang CH, Hsiao CF, Chang GC. et al. Interactive effect of cigarette smoking with human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) polymorphisms on the risk of lung cancer: a case–control study in Taiwan. *Am J Epidemiol* 2009; 170:695–702.
47. Bierut LJ. Convergence of genetic findings for nicotine dependence and smoking related diseases with chromosome 15q24-25. *Trends in Pharmacol Sci* 2010;31:46–51.
48. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL. et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 2007;25:472–8.

49. Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M. et al. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest* 2004; 125:27–37.
50. Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, Ko E, Kim Y, Kim S, Shim YM, Park J. A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. *Cancer*. 2011; 117(17):4080–91.
51. Wei HB, Lu XS, Shang LH, Xu G, Hu J, Che DH, Liu F, Wu Y, Zhang GM, Yu Y. Metaanalysis of ERCC1 C118T/C8092A and MDR1C3435T Polymorphism Predicts Outcome of Platinum-based Chemotherapies in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Arch Med Res*. 2011 Aug 6.
52. Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Tejero R, Muñoz C, Diaz T, Marrades R. et al. A Dual Role for KRT81: A miR-SNP Associated with Recurrence in Non-Small-Cell Lung Cancer and a Novel Marker of Squamous Cell Lung Carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(7):e22509.
53. Xun WW, Brennan P, Tjønneland A, Vogel U, Overvad K, Kaaks R. Single-nucleotide polymorphisms (5p15.33, 15q25.1, 6p22.1, 6q27 and 7p15.3) and lung cancer survival in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Mutagenesis*. 2011 Jul 12.
54. Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, Fyfe MN, Campan M, Siegmund KD, Kerr KM, LairdOffringa IA. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2011;6(6):e21443.
55. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B. et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet*. 2011; 43(8):768–75.
56. Ekim M, Caner V, BüyükpınarbaşıN, Tepeli E, Elmas L, Bağcı G. Determination of O-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation in non-small cell lung cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(5):357–60.
57. Tang SC, Wu MF, Wong RH, Liu YF, Tang LC, Lai CH, Hsu CP, Ko JL. Epigenetic mechanisms for silencing glutathione S-transferase m2 expression by hypermethylated specificity protein 1 binding in lung cancer. *Cancer*. 2011;117(14):3209–21.
58. Gualberto A, Dolled-Filhart M, Gustavson M, Christiansen J, Wang YF, Hixon ML. et al. Molecular analysis of non-small cell lung cancer identifies subsets with different sensitivity to insulin-like growth factor I receptor inhibition. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(18):4654–65.
59. Blanco R, Iwakawa R, Tang M. et al. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 2009; 30:1199–206.
60. Lee JY, Lee YM, Chang GC, Yu SL, Hsieh WY, Chen JJ. et al. Curcumin Induces EGFR Degradation in Lung Adenocarcinoma and Modulates p38 Activation in Intestine: The Versatile Adjuvant for Gefitinib Therapy. *PLoS One*. 2011;6(8):e23756.
61. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimacchi K. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of human lung. *Cancer res* 1990;5:7077.



62. Witsuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivatsava S, Minna JD, Gazdar AF (1997) Molecular damage in bronchial epithelium of current and former smokers. *J Nat Cancer Inst* 89:1366–73.
63. Brennan J, O Connor T, Makuch RW, Simmons AM, Russell E, Linnorla RI, Phelps RM, Gazdar AF, Ihde DC, Johnson BE. (1991) myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res* 51:1708–12.
64. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19: 2474–88.
65. Sharma SV, Bell DW, Settleman J. et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169–81.
66. Tanizaki J, Okamoto I, Sakai K, Nakagawa K. Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification. *Br J Cancer*. 2011 Aug 16. doi: 10.1038/bjc.2011.322.
67. Mitsudomi T. Erlotinib, gefitinib, or chemotherapy for EGFR mutation-positive lung cancer? *Lancet Oncol*. 2011;12(8):710–1.
68. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):795–805.
69. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A. et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373:1525–31.
70. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ Non-Small Cell Lung Cancer. V.3.2011. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/nscl](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nscl).
71. Rosell R, Moran T, Queralt C. et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958–67.
72. McDermott U, Sharma SV, Dowell L. et al. Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:19936–41.
73. Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M. et al. Biomarker analyses from the phase III placebo-controlled SATURN study of maintenance erlotinib following first-line chemotherapy for advanced NSCLC. *J Clin Oncol* 2009; 27(15suppl).
74. Khosravi-Far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13:67-89.
75. Margolis B, Skolnik EY. Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:1288-99.
76. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM. et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:127-55.
77. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 2009; 283:125-34.
78. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1367–80.

79. Mack PC, Holland WS, Redman M. et al. KRAS mutation analysis in cetuximab treated advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC): SWOG experience with S0342 and S0536. *J Clin Oncol* 2009;27:8002.
80. Khambata-Ford S, Harbison C, Woytowicz D. et al. K-Ras mutation (mut), EGFR-related, and exploratory markers as response predictors of cetuximab in first-line advanced NSCLC: retrospective analyses of the BMS099 trial. *J Clin Oncol* 2009;27:8021.
81. Mao C, Qiu LX, Liao RY. et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010; 69:272-8.
82. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC. et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23:5900-9.
83. Garassino MC, Borgonovo K, Rossi A. et al. Biological and clinical features in predicting efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* 2009; 29:2691-701.
84. Shaw AT, Costa DB, Iafrate AJ. et al. Clinical activity of the oral ALK and MET inhibitor PF-02341066 in non-small lung cancer (NSCLC) with EML4-ALK translocations. *J Thorac Oncol* 2009;4:S305 [abstract A6.4].
85. Wong DW, Leung EL, So KK. et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009;115:1723-33.
86. Cipriani NA, Abidoye OO, Vokes E. et al. MET as a target for treatment of chest tumors. *Lung Cancer* 2009; 63:169-79.
87. Jeffers M, Rong S, Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signalling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* 1996; 74:505-13.
88. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M. et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992; 119:629-41.
89. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E. et al. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:915-25.
90. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316:1039-43.
91. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ. et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011; 6:459-65.
92. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN. et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 2007; 448:807-10.
93. Jassem J, Langer CJ, Karp DD. et al. Randomized, open label, phase III trial of figitumumab in combinations with paclitaxel and carboplatin versus paclitaxel and carboplatin in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2010.

94. Belfiore A, Frasca F, Pandini G. et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 2009; 30:586-623.
95. Glubb DM, Cerri E, Giese A, Zhang W, Mirza O, Thompson EE. Novel Functional Germline Variants in the VEGF Receptor 2 Gene and Their Effect on Gene Expression and Microvessel Density in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5257–67.
96. Yang F, Tang X, Riquelme E, Behrens C, Nilsson MB, Giri U. et al. Increased VEGFR-2 Gene Copy Is Associated with Chemoresistance and Shorter Survival in Patients with Non-Small-Cell Lung Carcinoma Who Receive Adjuvant Chemotherapy. *Cancer Res.* 2011;71(16):5512-21.
97. Glubb DM, Cerri E, Giese A, Zhang W, Mirza O, Thompson EE. Novel Functional Germline Variants in the VEGF Receptor 2 Gene and Their Effect on Gene Expression and Microvessel Density in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5257-67.
98. Navani N, Spiro SG. Symptoms and signs of lung cancer. *Eur Respir Mon.* 2009;44:71–88.
99. Al Jahdali H. Evaluation of the patient with lung cancer. *Ann Thorac Med* 2008;3:74-8.
100. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. American College of Chest Physicians. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007; 132 :149S-160S.
101. Wilding JD. (2002) Neuropeptids and appetite control. *Diabet Med* 19(8):619- 27.
102. Richardson GE, Johnson BE. (1992) Paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Curr Opinion Oncol* 4(2): 323-33.
103. Latov N, Chaudhry V, Koski CL. et al.(2001) Use of intravenous gamma globulins in neuroimmunologic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 108 (4 Suppl ):S126-32.
104. Silvestri G, Gould M, Margolis M, Tanoue L, McCrory D, Toloza E, Detterbec F. Noninvasive Staging of Non-small Cell Lung Cancer: ACCP Evidenced-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest*2007; 132:178S-201S.
105. Schoepf U J. Multidetector-Row CT of the Thorax. 2006 Springer p:133-236.
106. [Jaklitsch MT](#), [Jacobson FL](#), [Austin JH](#), [Field JK](#), [Jett JR](#), [Keshavjee S](#). et al. The American Association for Thoracic Surgery guidelines for lung cancer screening using low-dose computed tomography scans for lung cancer survivors and other high-risk groups. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144:33–8.
107. Bach P, Mirkin NJ, Oliver KT, Azzoli GC, Berry AD, Brawley WO. et al. Benefits and Harms of CT Screening for Lung Cancer. *JAMA* 2012; 307(22): 2418-29.
108. Melek H, Gunluoglu MZ, Demir A, Akin H, Olcmen A, Dincer SI. Role of positron emission tomography in mediastinal lymphatic staging of non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;33(2):294–9.
109. Gómez-Caro A, Garcia S, Reguart N. et al. Incidence of occult mediastinal node involvement in cN0 non-small-cell lung cancer patients after negative uptake of positron emission tomography/computer tomography scan. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:1168–74.

110. Kernstine K, Stanford W, Mullen B. et al. PET, CT, and MRI with Combidex for mediastinal staging in non-small cell lung carcinoma. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:1022-8.
111. Ensminger SA, Prakash USB. Is bronchoscopic lung biopsy helpful in the management of patients with diffuse lung disease? *Eur Respir J* 2006;28:1081-4.
112. Ernst A, Feller-Kopman D, Becker HD, Mehta A. Central Airway Obstruction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004; 169:1278-97.
113. Häussinger K, Becker HD, Stanzel F, Kreuzer A, Schmidt B, Strausz J. et al. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white Light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a European Randomized controlled multicenter trial. *Thorax* 2005; 60: 496-503.
114. Shibuya K, Hoshino H , Chiyo M, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y. et al. High magnification bronchovideoscopy combined with narrowband imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk for lung cancer. *Thorax* 2003; 58: 989-95.
115. Kurimoto N, Miyazawa T, Okimasa S. et al. Endobronchial ultrasonography using a guide sheath increases the ability to diagnose peripheral pulmonary lesions endoscopically. *Chest* 2004; 126: 959-65.
116. Herth FJF, Eberhardt R, Vilmann P, Krasnik M, Ernst A. Real-time endobronchial ultrasound guide transbronchial needle aspiration for sampling mediastinal lymph nodes. *Torax*, Septembar 2006; 61(9): 795-8.
117. Takamochi K. et al. Clinical Predictors of N2 Disease in Non-small Cell Lung Cancer. *CHEST* 2000; 117:1577–1582. Detterbeck F, Jantz M, Wallace M, Vansteenkiste J, Silvestri G. Invasive Mediastinal Staging of Lung Cancer: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007; 132:202S–220S.
118. Cho JH, Kim J, Kim K. et al. A Comparative Analysis of Video-Assisted Mediastinoscopy and Conventional Mediastinoscopy. *Ann Thorac Surg* 2011;92:1007-11.
119. Lababede O, Meziane M. and Rice T. Seventh Edition of the Cancer Staging Manual and Stage Grouping of Lung Cancer-Quick Reference Chart and Diagrams. *Chest* 2011; 139(1):183-9.
120. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M. et al. The New IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thoracic Oncol.* 2011;6(2):244–85.
121. Downey R, Cheng D, Kernstine K. et al. Video-Assisted Thoracic Surgery for Lung Cancer Resection: A Consensus Statement of the International Society of Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (ISMICS) 2007. *Innovations.* 2007;6:293-302.
122. Donington J, Blasberg J. Management od Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer in High-Risk Patients. *Thorac Surg Clin* 2012;22:55-65.
123. Rivera C, Jougon J, Dahan M. et al. Are postoperative consequences of neoadjuvant chemotherapy for non-small lung cancer more severe in elderly patients? *Lung Cancer* 2012; 76: 216-21.
124. NCCN. Clinical practice guidelines in oncology. Non-small cell lung cancer v.3. 2012. [www.nccn.org](http://www.nccn.org).

125. Arrigada R, Bergman B, Dunant A. et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med* 2004;350:351–60.
126. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, González-Larriba JL. et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006;7:719–27.
127. Crino L, Weder W, Meerbeek J. et al. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann Oncol* 2010;21:103–15.
128. Huber RM, Flentje M, Schmidt M, Pöllinger B, Gosse H. et al. Simultaneous Chemoradiotherapy Compared With Radiotherapy Alone After Induction Chemotherapy in Inoperable Stage IIIa or IIIB Non-Small-Cell Lung Cancer: Study CTRT99/97 by the Bronchial Carcinoma Therapy Group, *J Clin Oncol.* 2006;24:4397-404.
129. D'Addario G, Fruh M. et al., Metastatic Non-small-cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann oncol* 2010;21:116-9.
130. Ciuleanu T, Brodowicz T. et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study, *The Lancet*, 374, ( 9699,):432–1440.
131. Camidge DR. et al. Progression-free survival (PFS) from a phase I study of crizotinib (PF-02341066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC), *J Clin Oncol* 2011;29: (suppl; abstr 2501).
132. Pirker R. et al. FLEX: A randomized, multicenter, phase III study of cetuximab in combination with cisplatin/vinorelbine (CV) versus CV alone in the first-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 3).
133. Riely GJ. et al. Prospective FDG-PET and CT assessment of discontinuation of erlotinib (E) or gefitinib (G) in patients with EGFR TKI sensitive non-small cell lung cancer (NSCLC) who subsequently progress radiographically on E or G ("acquired resistance") followed by re-initiation of E or G and the subsequent addition of everolimus (RAD001). *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 7065.M. Sørensen1, M. Pijls-Johannesma2& E. Felip3.
134. Neal JW. Lung Cancer Highlights from ASCO 2012: Anti-PD-1 Antibody in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, *Global Resource for Advancing Cancer Education*.
135. LUX-Lung 3: A randomized, open-label, phase III study of afatinib versus pemetrexed and cisplatin as first-line treatment for patients with advanced adenocarcinoma of the lung harboring EGFR-activating mutations. *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr LBA7500).
136. On behalf of the ESMO Guidelines Working Group\*Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice, Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up



137. Trodella L, Granone P, Valente S. et al. Adjuvant radiotherapy in non-small cell lung cancer with pathological stage I: definitive results of a phase II randomized trial. *Radiother Oncol* 2002;62:119.
138. Perin B. *Nemikrocelularni karcinom bronha*. Novi Sad, Medicinski fakultet, 1999.
139. Armstrong JG, Burman C, Fontenla D. et al. Three-dimensional conformal radiation therapy may improve the therapeutic ratio of high dose radiation therapy for lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:685-6892.
140. William T. Sause. *The Role of Radiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer*. *CHEST* 1999; 116:504S–508S.
141. Belani CP. Multimodality management of regionally advanced non–small-cell lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20: 302–14.
142. Jeremić B. (ed.). *Advances in radiation Oncology in Lung Cancer, Medical Radiology, Radiation Oncology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
143. Decker RH, Wilson LD. Postoperative radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2008;20(3):184-7.
144. Potters L, Kavanagh B, Galvin Jm. et al. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) and American College of Radiology (ACR) practice guideline for the performance of stereotactic body radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;76:326-32.
145. Salazar OM, Sandhu TS, Lattin PB. et al. Once –weekly, high dose stereotactic body radiotherapy for lung cancer: 6-year analysis of 60 early-stage, 42 locally advanced, and 7 metastatic lung cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:707-15
146. Kohler BA, Ward E, McCarthz BJ, Schymura MJ, Ries LAG, Eheman C, Jemal A, Anderson RN, Ajani UA, Edwards BK. Anual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011;103:1–23.
147. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SI, Keegan T, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK. et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J. Clin. Ocol.* 2007, 25, 472-8.
148. Stabile LP, Gaither Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and show biological responses to estrogen. *Cancer Res.* 2002;62:2141–50.
149. Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, Zhang W, Grandis JR, Siegfried JM. Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects. *Cancer Res.* 2005, 65, 1459–70.
150. Siegfried JM, Hershberger PA, Stabile LP. Estrogen receptor signaling in lung cancer. *Semin Oncol* 2009;36:524–31.
151. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson J. Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 4258–65.

152. Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S. Human estrogen receptor  $\beta$  binds DNA in a manner similar to and demerizes with estrogen receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 25832–8.
153. Morani A, Barros R, Imamov O, Hultenby K, Arner A, Warner M, Gustafsson J. Lung dysfunction causes systemic hypoxia in estrogen receptor  $\beta$  knockout (ER $\beta^{-/-}$ ) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103, 7165–9.
154. Patrone C, Cassel TN, Pattersson K, Piao YS, Cheng G, Ciana P, Maggi A, Warner M, Gustafsson J, Nord M. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor  $\beta$ . *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23, 8542–52.
155. Beattie CW, Hansen NW, Thomas P. Steroid receptors in human lung cancer. *Cancer Res.* 1985, 45, 4206–14.
156. Su JM, Hsu HK, Chang H, Lin S-L, Chang HC, Huang MS, and Tseng HH. (1996) Expression of estrogen and progesterone receptors in nonsmall-cell lung cancer: Immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 16;3803–6.
157. Ollayos LTCW, Riordan GP, and Rushin CDRJM. (1994) Estrogen receptor detection in paraffin sections of adenocarcinoma of the colon, pancreas, and lung. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118;630–2.
158. Cagle PT, Mody DR, and Schwartz MR. (1990) Estrogen and progesterone receptors in bronchogenic carcinoma. *Cancer Res* 50;6632–5.
159. Beattie CW, Hansen NW, and Thomas PA. (1985) Steroid receptors in human lung cancer. *Cancer Res* 45;4206–12.
160. Canver CC, Memoli VA, Vanderveer PL, Dingivan CA, and Mentzer RM. (1994) Sex hormone receptors in non small cell lung cancer in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108,153–7.
161. Nose N, Sugio K, Oyama T, Nozoe T, Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Yasumoto K. Association between estrogen receptor- $\beta$  expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27, 411–7.
162. Raso M, Behrens C, Herynk MH, Liu S, Prudkin L, Ozburn NC, Woods DM. Tang X, Mehran RJ, Moran C. et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 5359–68.
163. Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C, Brouchet L, Milia J, Nicaise Y, Laurent J, Delisle M, Favre G, Didier A. et al. Characteristics of lung cancer in women: Importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer* 2011;76:280–5.
164. Toh C, Ahmad B, Soong R, Chuah K, Tan S, Hee S, Leong S, Tan E, Lim W. Correlation between epidermal growth factor receptor mutations and expression of female hormone receptors in East-Asian lung adenocarcinomas. *J. Thorac. Oncol.* 2010;5:17–22.
165. Wu C, Chang Y, Shih J, Lee Y. The significance of estrogen receptor  $\beta$  in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005, 130, 979–86.
166. Schwartz AG, Prysak GM, Murphy V, Lonardo F, Pass H, Schwartz J, Brooks S. Nuclear estrogen receptor  $\beta$  in lung cancer: Expression and survival differences by sex. *Clin Cancer Res* 2005, 11, 7280–7.

167. Nose N, Uramoto H, Iwata T, Hanagiri T, Yasumoto K. Expression of estrogen receptor beta predicts a clinical response and longer progression-free survival after treatment with EGFR-TKI for adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011;71:350–5.
168. Navaratnam S, Skliris G, Qing G, Banerji S, Badiani K, Tu D, Bradbury P, Leigh NB, Shepherd FA, Nowatzki J. et al. Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer. *Horm. Cancer* 2012;3:93–100.
169. Hammoud Z; Tan B. Badve S, Bigsby RM. Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 2008;15:475–483.
170. Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, Garber J, Russo IH. 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J.* 2006;20:1622–34.
171. Dubey S, Siegfried JM, Traynor AM. Non-small-cell lung cancer and breast carcinoma: Chemotherapy and beyond. *Lancet Oncol.* 2006;7:416–24.
172. Chlebowski RT. Menopausal hormone therapy, hormone receptor status, and lung cancer in women. *Semin. Oncol.* 2009;36:566–71.
173. Marino M, Galluzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* 2006;7:497–508.
174. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Non genomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr. Rev.* 1998;19:3–17.
175. Pietras RJ, Marquez DC, Chen H, Tsai E, Weinberg O, Fishbein M. Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells. *Steroids* 2005;70:372–81.
176. Hershberger PA, Vasquez AC, Kanterewicz B, Land S, Siegfried JM, Nichols M. Regulation of endogenous gene expression in human non-small cell lung cancer cells by estrogen receptor ligands. *Cancer Res.* 2005;65:1598–605.
177. Zhang GF, Liu X, Farkas AM, Parwani AV, Lathrop L, Lenzner D, Land SR, Srinivas H. Estrogen receptor  $\beta$  functions through non genomic mechanisms in lung cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 2009;23:146–56.
178. Zhang GF, Yanamala N, Lathrop KL, Zhang L, Klein-Seetharaman J, Srinivas H. Ligand-independent antiapoptotic function of estrogen receptor- $\beta$  in lung cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 2010;24:1737–47.
179. Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C, Brouchet L, Milia J, Nicaise Y, Laurent J, Delisle M, Favre G, Didier A. et al. Characteristics of lung cancer in women: Importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer* 2011;76:280–5.
180. Wu C, Chang Y, Shih J, Lee Y. The significance of estrogen receptor  $\beta$ in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130: 979–86.
181. Nose N, Uramoto H, Iwata T, Hanagiri T, Yasumoto K. Expression of estrogen receptor beta predicts a clinical response and longer progression-free survival after treatment with EGFR-TKI for adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011;71:350–5.



182. Navaratnam S, Skliris G, Qing G, Banerji S, Badiani K, TuD, Bradbury P, Leigh NB, Shepherd FA, Nowatzki J. et al. Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer. *Horm. Cancer* 2012;3:93–100.
183. Mauro LV, Dalurzo M, Carlini MJ, Smith D, Nunez M, Simian M, Lastiri J, Vasallo B, Joffe E, Pallotta MG. et al. Estrogen receptor  $\beta$  and epidermal growth factor receptor as early-stage prognostic biomarkers of non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 2010;24:1331–8.
184. Abe K, Miki Y, Ono K, Mori M, Kakinuma H, Kou Y, Kudo N, Koguchi M, Niikawa H, Suzuki S. et al. Highly concordant coexpression of aromatase and estrogen receptor  $\beta$  in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2010;41:190–198.
185. Raso M, Behrens C, Herynk MH, Liu S, Prudkin L, Ozburn NC, Woods DM, Tang X, Mehran RJ, Moran C. et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:5359–68.
186. Toh C, Ahmad B, Soong R, Chuah K, Tan S, Hee S, Leong S, Tan E, Lim W. Correlation between epidermal growth factor receptor mutations and expression of female hormone receptors in East-Asian lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2010;5:17–22.
187. Rades D, Setter C, Dahl O, Schild SE, Noack, F. The prognostic impact of tumor cell expression on estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor and androgen receptor in patients irradiated for non small cell lung cancer. *Cancer* 2012;118: 157–63.
188. Kawai H, Ishi A, Washiya K, Konno T, Kon H, Yamaya C, Ono I, Ogawa J. Combined overexpression of EGFR and estrogen receptor  $\alpha$  correlates with a poor outcome in lung cancer. *Anticancer Res.* 2005;25:4693–8.
189. Stabile LP, Dacic S, Land SR, Lenzner DE, Dhir R. Acquafondata M, Landreneau RJ, Grandis JR, Siegfried JM. Combined analysis of estrogen receptor  $\beta$ -1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2011;17:154–64.
190. Mah V, Marquez D, Alavi M, Maresh EL, Zhang L, Yoon N, Horvath S, Bagryanova L, Fishbein MC, Chia D. et al. Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011;74:318–25.
191. Schwartz AG, Prysak GM, Murphy V, Lonardo F, Pass H, Schwartz J, Brooks S. Nuclear estrogen receptor  $\beta$  in lung cancer: Expression and survival differences by sex. *Clin Cancer Res* 2005;11:7280–7.
192. Skov BG, Fischer BM, Pappot H. Oestrogen receptor $\beta$  over expression in males with non-small cell lung cancer is associated with better survival. *Lung Cancer* 2008;59:88–94.
193. Stabile LP, Gaither Davis AL, Gubish CT Hopkins, TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and show biological responses to estrogen. *Cancer Res.* 2002;62:2141–50.

194. Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, Zhang W, Grandis JR, Siegfried JM. Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects. *Cancer Res.* 2005;65:1459–70.
195. Marquez-Garban DC, Chen H, Goodglick L, Fishbein M, Pietras RJ. Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer. *Steroid Enzymes Cancer* 2009;1155:194–205.
196. Siegfried JM, Gubish CT, Rothstein ME, Henry C, Stabile LP. Combining the multitargeted tyrosine kinase inhibitor vandetanib with the antiestrogen fulvestrant enhances its antitumor effect in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:485–95.
197. Xu R, Shen H, Guo R, Sun J, Gao W, Shu Y. Combine therapy of gefitinib and fulvestrant enhances antitumor effects on NSCLC cell lines with acquired resistance to gefitinib. *Biomed Pharmacother* 2012, doi:10.1016/j.biopha.2012.1002.1004.
198. Shen H, Yuan Y, Sun J, Gao W, Shu Y. Combined tamoxifen and gefitinib in non-small cell lung cancer shows antiproliferative effects. *Biomed Pharmacother.* 2010;64:88–92.
199. Lara PN, Gandar DR, Longmate J, Gumerlock PH, Lau DH, Edelman MJ, Gandour-Edwards R, Mack PC, Israel V, Raschko J. et al. Activity of high-dose toremifene plus cisplatin in platinum-treated non-small cell lung cancer: A phase II California Cancer Consortium Trial *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48: 22–8.
200. Chen Y, Perng RP, Yang KY, Lin WC, Wu HW, Tsai CM, Whang-Peng J. Phase II study of tamoxifen, ifosfamide, epirubicin and cisplatin combination chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer failing previous chemotherapy. *Lung Cancer* 2000;29:139–46.
201. Slatore CG, Chien JW, Au, DH, Satia JA, White E. Lung cancer and hormone replacement therapy: Association in the Vitamins and Lifestyle Study *J Clin Oncol.* 2010;28:1540–6.
202. Bouchardy C, Benhamou S, Schaffar R, Verkooijen H.M, Fioretta G, Schubert H, Vinh-Hung V, Soria J, Vlastos G, Rapiti E. Lung cancer mortality risk among breast cancer patients treated with anti-estrogens. *Cancer* 2011;117:1288–95.
203. Traynor AM, Schiller JH, Stabile LP, Kolesar JM, Eickhoff JC, Dacic S, Hoang T, Dubey S, Marcotte SM, Siegfried JM. Pilot study of gefitinib and fulvestrant in the treatment of post-menopausal women with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;64:51–9.
204. Burns DM, Anderson CM, Gray N. Do changes in cigarette design influence the rise in adenocarcinoma of the lung? *Cancer Causes and Control.* 2011;22(1):13–22.
205. Yuan JM, Koh WP, Murphy SE, Fan Y, Wang R, Carmella SG. et al. Urinary levels of tobacco-specific nitrosamine metabolites in relation to lung cancer development in two prospective cohorts of cigarette smokers. *Cancer research.* 2009;69(7):2990–5.
206. Mauro LV, Carlini DMJ, Smith D. et al. Estrogen receptor  $\beta$  and epidermal growth factor as early-stage prognostic biomarkers of non-small lung cancer. *Oncology Reports* 2010;24 (5):1331–8.

207. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Živković S, and Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999–2009. *BMC Cancer* 2013, 13:18.
208. Petrović V, Miladinov–Mikov M, Dugandžija T. Topographical analyses of lung cancer incidence and mortality in Vojvodina. *Arch Oncol* 2010;18:72–4.
209. Sakurai H, Asamura H, Goya T, Eguchi K. et al. Survival Differences by Gender for Resected Non-small Cell Lung Cancer *J Thorac Oncol* 2010;5:1594–601.
210. Wahbah M, Boroumand N, Castro C, El-Zeky F, Eltorkey M. Changing trends in the distribution of histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2007;11:89-96.
211. Jemal A, Travis WD, Tarone RE, Travis L, Devesa SS. Lung cancer rates convergence in young men and women in the United States: analysis by birth cohort and histologic type. *Int J Cancer* 2003;105:101–7.
212. Parkin DM, Vizcaino AP, Bray F, Devesa SS. International lung cancer patterns by histological type. *Lung Cancer*, in press.
213. Christina SB, Keith DE. Estrogen signaling in Lung Cancer: An Oportunity for Novel Therapy. *Cancers* 2012;4:969–88.
214. Schwartz AG, Prysak GM, Murphy V. et al. Nuclear estrogen receptor $\beta$  in lung cancer: expression and survival differences by sex. *Clin Cancer Res* 2005;11:7280–7.
215. Kawai H, Ishii A, Washiya K. et al. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  are prognostic factors in 5367 *Clin Cancer Res* 2009;15(17) September 1, 2009 [www.aacrjournals.org](http://www.aacrjournals.org).
216. Skov BG, Fischer BM, Pappot H. Oestrogen receptor $\beta$  over expression in males with nonsmall cell lung cancer is associated with better survival. *Lung Cancer* 2008;59:88–94.
217. Wu CT, Chang YL, Shih JY, Lee YC. The significance of estrogen receptor $\beta$  in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:979–86.
218. Chakraborty S, Kishor AG, Marr A, and Surinder KB. Lung cancer in women: role of estrogens. *Expert Rev Respir Med* 2010 August;4(4):509–18
219. Dabbs DJ, Landreneau RJ, Liu Y, Raab SS, Maley RH, Tung MY, Silverman JF. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. *Ann. Thorac. Surg.* 2002;73:403–6.
220. Omoto Y, Kobayashi Y, Nishida K, Tsuchiya E, Eguchi H, Nakagawa K, Ishikawa Y, Yamori T, Iwase H, Fujii Y. et al. Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor  $\beta$  in human lung cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;285:340–7.
221. DiNunno L, Larsson LG, Rinehart JJ, Beissner RS. Estrogen and progesterone receptors in non-small cell lung cancer in 248 consecutive patient who underwent surgical resection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000;124:1467–70.
222. Gomez-Fernandez C, Mejias A, Walker G, Nadji M. Immunohistochemical expression of estrogen receptor in adenocarcinomas of the lung: The antibody factor. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2010;18:137–41.

223. Chen-Tu W, Yih-Leong C, Jin-Yuan S, and Yung-Chie L. The significance of estrogen receptor in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:979-86.
224. Leno T, Austin LD, and Edelman MJ. Emerging Differences in Epidemiology, Biology and Therapy. *Lung Cancer in Women*. *Chest* 2005;128:370-81.
225. Shiver SP, Bourdeau HA, Gubish CT. et al. Sexspecific expression of gastrin-releasing peptide receptor: Relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:24-33.
226. Stabile LP, Dacic S, Land SR, Lenzner DE, Dhir R, Acquafondata M, Landreneau RJ, Grandis JR, Siegfried JM. Combined analysis of estrogen receptor  $\beta$ -1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clin. Cancer Res.* 2011;17:154-64.
227. Gullon Blanco JA. et al. Age, comorbidity, treatment decision and prognosis in lung cancer. *Age Ageing* (2008);37(6):715-8.
228. Camilla MT, Sagerup MS, Johannesen TB, Helland A, Brustugun OT. Sex-specific trends in lung cancer incidence and survival: a population study of 400118 cases. *Thorax* 2010;15:151-60.
229. Sekine I, Sumi M, Ito Y. et al. Gender difference in treatment outcomes in patients with stage III non-small cell lung cancer receiving concurrent chemoradiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2009;39:707-12.
230. Cerny D, Cerny T, Ess S. et al. Lung cancer in the Canton of St. Gallen, Eastern Switzerland: sex-associated differences in smoking habits, disease presentation and survival. *Onkologie.* 2009;32:569-73.
231. Guldhammer Skov B, Fischer BM, Pappot H. Oestrogen receptor  $\beta$  over expression in males with non-small cell lung cancer is associated with better survival. *Lung cancer* (2008);59:88-94.
232. Naohiro N, Kenji S, Tsunehiro O, Tadahiro M, Hidetaka U, Teruo I, Takamitsu O, and Kosei Y. Association Between Estrogen Receptor- $\beta$  Expression and Epidermal Growth Factor Mutation in the Postoperative Prognosis of Adenocarcinoma of the Lung. *Journal of Clinical Oncology* (2009)27;3:411-7.
233. GangFeng Z, Xuwan L, Adam MF, Anil V, Parwani KL, Lathrop DL, Stephanie RL, and Harish S. Estrogen Receptor  $\beta$  Functions through Nongenomic Mechanisms in Lung Cancer Cells *Mol Endocrinol*, 2009;23(2):146-56.
234. Subhankar C, Apar KG, Alissa M, and Surinder KB. Lung cancer in woman: role of estrogens. *Respir Med.* 2010;4(4):509-18.
235. Mamoun Y, Naoko H. Estrogen Receptor  $\beta$ . *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:63-6.
236. Ali G, Donati V, Loggini B, Servadio A, DellOmodarme M, Prati MC, Camacci T, Lucchi M, Melfi F, Mussi A, Fontanini G. Different estrogen receptor  $\beta$  expression in distinct histologic subtypes of lung carcinoma. *Human Pathology* (2008);39:1465-73.
237. Mahesh PA, Archana S, Jayaraj BS, Patil S, Chaya SK, Shashidhar HP, Sunitha BS, and Prabhakar AK. Factors affecting 30-month survival in lung cancer patients. *Indian J Med Res* 136, October 2012:614-21.

238. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol Interv*. 2003;3:281–92.
239. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:22278–88.
240. Hershberger PA, Vasquez AC, Kanterewicz B, Land S, Siegfried JM, Nichols M. Regulation of endogenous gene expression in human NSCLC cells by estrogen receptor ligands. *Cancer Res* 2005;(65):1598–605.
241. Pietras RJ, Marquez DC, Chen HW, Tsai E, Weinberg O, Fishbein M. Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non small cell lung cancer cells. *Steroids* 2005;(70):372–81.
242. Collins IM, Nicholson SA, O Byrne KJ. A lung cancer responding to hormonal therapy. *J. Thorac. Oncol* 2010;5(5):749–50.
243. Matsuo K, Ito H, Yatabe Y. Risk factors differ for non-small-cell-lung cancers with and without EGFR mutation. Assessment of smoking and sex by case control study in Japanese. *Cancer Sci* 2007;98:96–101.