



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET NOVI SAD
KLINIČKA MEDICINA

**UČESTALOST I TIPOVI MUTACIJA
RECEPTORA EPIDERMALNOG
FAKTORA RASTA U INVAZIVNIM
ADENOKARCINOMIMA PLUĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Živka Eri

Kandidat: Dragana Tegeltija

Novi Sad, 2016. godine

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

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 | Dragana Tegeltija |
| Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN | Prof.dr Živka Eri |
| Naslov rada: NR | Učestalost i tipovi mutacija receptora epidermalnog faktora rasta u invazivnim adenokarcinomima pluća |
| Jezik publikacije: JP | Srpski / latinica |
| Jezik izvoda: JI | Srpski / engleski |
| Zemlja publikovanja: ZP | Republika Srbija |
| Uže geografsko područje: UGP | Vojvodina |
| Godina: GO | 2016. |
| Izdavač: IZ | autorski reprint |
| Mesto i adresa: MA | Novi Sad, Hajduk Veljkova 3 |

| | |
|--|--|
| Fizički opis rada: FO | 8 poglavlja, 126 stranica, 39 slika, 9 grafikona, 31 tabela, 276 referenci |
| Naučna oblast: NO | Medicina |
| Naučna disciplina: ND | Patologija, Molekularna biologija |
| Predmetna odrednica, ključne reči: PO | adenokarcinom; neoplazme pluća; receptor epidermalnog faktora rasta; transkriptivni faktori; mutacija; lančana reakcija polimeraze; dijagnoza; biopsija; bronhoskopija; dnk citometrija |
| UDK | 616.24-006.6-091.8/-092 |
| Čuva se: ČU | U biblioteci Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad |
| Važna napomena: VN | |
| Izvod: IZ | <p>Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) pripada porodici receptora protein-tirozin kinaze čija je aktivacija povezana sa proliferacijom malignih, invazijom, inhibicijom apoptoze, tumorskom angiogenezom i metastatskim širenjem stoga ima važnu ulogu u karcinogenezi i tumorskoj progresiji. Aktivirane mutacije se odvijaju oko katalitičkog tirozin kinaza domena. Biopsijski, citološki i hirurški uzorci se koriste u detekciji EGFR mutacija u momentu postavljanja dijagnoze adenokarcinoma ili karcinoma sa komponentom adenokarcinoma, najpouzdanije lančanom reakcijom polimeraze. Činjenica da primena ciljane molekularne terapije tirozin kinaza inhibitorima kod obolelih sa EGFR mutiranim adenokarcinomom pluća poboljšava prognozu bolesti, postoji rezistencija kod pojedinih tipova EGFR mutacija i povezanost histopatološkim i imunohistohemijskim karakteristikama tumora, da je bronhološki uzorak često jedini uzorak u kome je potrebno odrediti i molekularni profil tumora osnovni cilj ove disertacije bio je da se odredi učestalost i tip EGFR mutacija i povezanost sa karakteristikama adenokarcinoma. Da bi se taj cilj realizovao postavljeni su sekundarni ciljevi odnosno da se: izvrši histopatološka reklasifikacija adenokarcinoma pluća na osnovu kriterijuma koje je postavila internacionalna asocijacija za proučavanje karcinoma</p> |

pluća, američko torakalno društvo i evropsko respiratorno društvo; odredi ekspresija TTF-1 u adenokarcinomu pluća i povezanost sa EGFR mutacionim statusom; odredi učestalost, tip i povezanost EGFR mutacija sa predominantnim tipom adenokarcinoma i utvrdi da li bronhoskopska biopsija može da bude reprezentativni uzorak za određivanje EGFR mutacionog statusa. Histopatološka građa adenokarcinoma pluća u hirurškim uzorcima je heterogenija u odnosu na biopsijske uzorke i ta razlika je statistički značajna ($p < 0,001$). Acinarno predominantni tip je najzastupljeniji u hirurškim i biopsijskim uzorcima bez statistički značajne razlike u raspodeli predominantnih tipova u njima ($p = 0,65883$). Predominantni tip u primarnom tumoru određuje predominantni tip u limfogenim metastazama. EGFR mutacije tipa insercija na egzonu 21 i L858R mutacija na egzonu 20 su detektovane kod tri od 60 (5%) bolesnika u pet od 120 uzoraka (tri hirurška i dva biopsijska uzorka), češće kod žena, starijih od 60 godina, pušača i u solidno predominantnom tipu. Ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji izolovane DNK između EGFR mutiranih i *wt* EGFR adenokarcinoma u biopsijskim ($p = 0,132$) i hirurškim uzorcima ($p = 0,641$). Procenat invalidnih rezultata prilikom određivanja EGFR mutacionog statusa u je veći u biopsijskim uzorcima u odnosu na hirurške uzorke. Postoji statistički značajna razlika između broja TTF-1 pozitivnih i TTF-1 negativnih adenokarcinoma ($p < 0,001$), ali ne i u raspodeli ovih bolesnika prema polovima ($p = 0,1231$), prosečnoj starosti, pušačkim navikama ($p = 0,6488$) i prosečnoj veličini tumora ($p = 0,21$). Postoji pozitivna korelacija između TTF-1 pozitivne ekspresije i EGFR mutacionog statusa stoga TTF-1 pozitivna ekspresija može da bude prediktor pozitivnog EGFR mutacionog statusa. Bronhoskopska biopsija je reprezentativni uzorak za određivanje EGFR mutacionog statusa zato što: većina dijagnostičkih biopsijskih uzoraka ima više od 100 očuvanih tumorskih ćelija, nema razlike u raspodeli predominantnih tipova u odnosu na hirurške uzorke,

| | |
|---|---|
| | EGFR mutacije se detektuju u uzorcima sa manje od 100 tumorskih ćelija i manje od 20% volumenske gustine tumorskog tkiva, razlika između koncentracije izolovane DNK u EGFR mutiranim i <i>wt</i> EGFR adenokarcinomima u biopsijskim i hirurškim uzorcima nije statistički značajna ($p=0,132$ i $p=0,641$). |
| Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP | 29.05.2014. |
| Datum odbrane: DO | |
| Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO | predsednik: član: član: |

University of Novi Sad
ACIMSI
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, Medical faculty |
| Author: AU | Dragana Tegeltija |
| Mentor: MN | Prof. dr Živka Eri |
| Title: TI | Frequency and types of mutations of epidermal growth factor receptors in invasive lung adenocarcinomas |
| Language of text: LT | Serbian (latin) |
| Language of abstract: LA | eng. / srp. |
| Country of publication: CP | Serbia |
| Locality of publication: LP | Vojvodina |
| Publication year: PY | 2016. |
| Publisher: PU | Author reprint |
| Publication place: PP | Novi Sad, Hajduk Veljkova 3 |

| | |
|-----------------------------|---|
| Physical description: PD | Ph.D Thesis contents: chapters: 8; pages: 126; pictures 39; graphs: 9; tables: 31; literature 276 |
| Scientific field SF | Medicine |
| Scientific discipline SD | Pathology, Molecular biology |
| Subject, Key words SKW | Adenocarcinoma; Lung Neoplasms; Receptor, Epidermal Growth Factor; Transcription Factors; Mutation; Polymerase Chain Reaction; Diagnosis; Biopsy; Bronchoscopy; Image Cytometry |
| UC | 616.24-006.6-091.8/-092 |
| Holding data: HD | Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3 |
| Note: N | |
| Abstract: AB | Epidermal growth factor receptor (EGFR) belongs to the family of protein-tyrosin kinase family, whose activation is associated with the proliferation of malignant cells, invasion, inhibition of apoptosis, tumor angiogenesis and metastatic spread and thus plays an important role in carcinogenesis and tumor progression. Activated mutations take place around the catalytic tyrosine kinase domain. Biopsy, cytological and surgical specimens are used for the detection of EGFR mutations at the time of diagnosis of adenocarcinoma or carcinoma with an adenocarcinoma component, most reliably using a polymerase chain reaction. The fact that the application of molecular tyrosin kinase inhibitor therapy to patients with EGFR mutated lung adenocarcinoma improves the prognosis of the disease, there is resistance in certain types of EGFR mutations and connection with histopathological and immunohistochemical characteristics of tumor, that the bronchoscopic |

Abstract:
AB

specimen is often the only specimen in which it is necessary to determine the molecular profile of the tumor, the primary objective of this thesis is to determine the frequency and type of EGFR mutations and their connection with the characteristics of adenocarcinoma. In order to realize this objective, the following secondary objectives have been set: to execute histopathological reclassification of lung adenocarcinoma based on the criteria set by the International Association for the Study of Lung Cancer, the American Thoracic Society and European Respiratory Society; determine the expression of TTF-1 in lung adenocarcinoma and connection with EGFR mutation status; determine the frequency, type and connection of EGFR mutations with predominant type of adenocarcinoma and confirm whether bronchoscopic biopsy may be a representative specimen for the determination of EGFR mutation status. Histopathological material of lung adenocarcinoma in surgical specimens is more heterogeneous in relation to biopsy specimens and such difference is statistically significant ($p < 0,001$). Acinar predominant type is the most common in surgical and biopsy specimens with no statistically significant differences in the distribution of predominant type among them ($p = 0,65883$). The predominant type in the primary tumor determines the predominant type in lymphatic metastases. EGFR mutations in the type of insertions on exon 21 and L858R mutations on exon 20 have been detected in three out of 60 (5%) of patients in five out of 120 specimens (three surgical and two biopsy samples), more often in women older than 60, smokers and in a solid predominant type. There are no statistically significant differences in the concentration of isolated DNA between EGFR mutated and *wt* EGFR adenocarcinoma in biopsy ($p = 0,132$) and surgical specimens ($p = 0,641$). The percentage of

| | |
|--|---|
| Abstract: AB | <p>invalid results in determining the EGFR mutation status is higher in biopsy specimens compared to the surgical specimens. There is a statistically significant difference between the number of TTF-1 positive and TTF-1 negative adenocarcinoma ($p < 0,001$), but not in the distribution of these patients according to gender ($p = 0,1231$), average age, smoking habits ($p = 0,6488$) and average tumor size ($p = 0,21$). There is a positive correlation between TTF-1 positive expression and EGFR mutation status and therefore TTF-1 positive expression can be a predictor of positive EGFR mutation status. Bronchoscopic biopsy is a representative sample for the determination of EGFR mutation status because: most diagnostic biopsy specimens have more than 100 preserved tumor cells, there is no difference in the distribution of predominant types in relation to surgical specimens, EGFR mutations are detected in samples with less than 100 tumor cells and less than 20% of volume density of tumor tissue, the difference between the concentration of isolated DNA in EGFR mutated and <i>wt</i> EGFR adenocarcinoma in biopsy and surgical specimens is not statistically significant ($p = 0,132$ and $p = 0,641$).</p> |
| Accepted on Scientific Board on: AS | 29.05.2014. |
| Defended: DE | |
| Thesis Defend Board: DB | president: member: member: |

SADRŽAJ

| | | |
|------------|---|----|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 1.1. | EPIDEMIOLOGIJA | 1 |
| 1.2. | PREVENCIJA NASTANKA KARCINOMA PLUĆA | 3 |
| 1.2.1. | Primarna prevencija..... | 3 |
| 1.2.2. | Sekundarna prevencija..... | 3 |
| 1.3. | FAKTORI RIZIKA U NASTANKU KARCINOMA PLUĆA | 3 |
| 1.3.1. | Pušenje..... | 3 |
| 1.3.2. | Ishrana i dodaci ishrani..... | 4 |
| 1.3.3. | Alkohol..... | 5 |
| 1.3.4. | Fizička aktivnost..... | 5 |
| 1.3.5. | Aerozagadenje | 5 |
| 1.3.6. | Azbest..... | 5 |
| 1.3.7. | Radon..... | 6 |
| 1.3.8. | Druge bolesti | 6 |
| 1.3.9. | Familijarni faktori..... | 6 |
| 1.4. | KLINIČKE MANIFESTACIJE I SIMPTOMI KARCINOMA PLUĆA | 7 |
| 1.4.1. | Intratorakalne manifestacije | 7 |
| 1.4.2. | Ekstratorakalne manifestacije..... | 7 |
| 1.4.3. | Paraneoplastični sindrom..... | 7 |
| 1.5. | TNM KLASIFIKACIJA I STADIJUM KARCINOMA PLUĆA..... | 7 |
| 1.6. | ADENOKARCINOM PLUĆA | 9 |
| 1.6.1. | Makroskopski izgled adenokarcinoma pluća | 10 |
| 1.6.2. | IATSL/ATS/ERS klasifikacija preinvazivnih lezija i adenokarcinoma pluća u hirurškim uzorcima..... | 10 |
| 1.6.2.1 | Preinvazivne lezije..... | 13 |
| 1.6.2.1.1. | Atipična adenomatozna hiperplazija..... | 13 |
| 1.6.2.1.2. | Adenokarcinom in situ..... | 14 |
| 1.6.2.2. | Minimalno invazivni adenokarcinom..... | 14 |
| 1.6.2.3. | Invazivni adenokarcinom | 16 |
| 1.6.2.3.1. | Lepidično predominantni tip..... | 16 |
| 1.6.2.3.2. | Acinarno predominantni tip..... | 17 |
| 1.6.2.3.3. | Papilarno predominantni tip..... | 18 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 1.6.2.3.4. | Mikropapilarno predominantni tip | 18 |
| 1.6.2.3.5. | Solidno predominantni tip..... | 19 |
| 1.6.2.4 | Varijante invazivnog adenokarcinoma | 20 |
| 1.6.2.4.1. | Invazivni mucinozni adenokarcinom | 20 |
| 1.6.2.4.2. | Koloidni adenokarcinom..... | 21 |
| 1.6.2.4.3. | Fetalni adenokarcinom..... | 22 |
| 1.6.2.4.4. | Adenokarcinom sa crevnom (enteričnom) diferencijacijom..... | 22 |
| 1.6.2.5 | Prognostički značaj IASLC/ATS/ERS klasifikacije invazivnog adenokarcinoma pluća | 23 |
| 1.7. | MORFOLOŠKA DIJAGNOSTIKA ADENOKARCINOMA PLUĆA | 24 |
| 1.7.1. | Citološka dijagnoza adenokarcinoma..... | 24 |
| 1.7.2. | Imunohistohemijska dijagnoza adenokarcinoma..... | 26 |
| 1.7.2.1 | TTF-1..... | 26 |
| 1.7.2.2 | Drugi imunohistohemijski markeri..... | 26 |
| 1.8. | KARCINOGENEZA..... | 27 |
| 1.8.1. | Proto-onkogeni | 29 |
| 1.8.1.1. | Epidermalni faktor rasta | 29 |
| 1.8.1.1.1. | Receptor epidermalnog faktora rasta | 29 |
| 1.8.1.1.2. | EGFR mutacije | 31 |
| 1.8.1.1.3. | Tipovi EGFR mutacija..... | 32 |
| 1.8.1.1.4. | Povezanost EGFR mutacija sa tipovima adenokarcinoma..... | 34 |
| 1.8.1.1.5. | Selekcionni kriterijumi za EGFR molekularno testiranje | 35 |
| 1.8.1.1.6. | Vreme izvođenja EGFR testiranja | 35 |
| 1.8.1.1.7. | Uzorci za EGFR testiranje | 36 |
| 1.8.1.1.8. | Metode određivanja EGFR mutacija | 36 |
| 1.8.1.1.8.1. | Fluorescentna in situ hibridizacija | 36 |
| 1.8.1.1.8.2. | Hromogena in situ hibridizacija..... | 37 |
| 1.8.1.1.8.3. | Imunohistohemijska metoda | 37 |
| 1.8.1.1.8.4. | Lančana reakcija polimeraze..... | 38 |
| 1.8.1.1.9. | Tirozin kinaza inhibitori | 42 |
| 1.8.1.1.10. | Rezistencija na primenu TKIs..... | 43 |
| 1.8.1.2. | K-RAS | 44 |
| 1.8.1.3. | C-MYC | 44 |
| 1.8.2. | Tumor supresorski geni | 44 |
| 1.8.2.1. | Retinoblastoma tumor supresor gen | 44 |
| 1.8.2.2. | Gen p53 | 45 |
| 1.8.2.3. | Tumorska angiogeneza..... | 45 |
| 1.8.3. | Geni koji upravljaju apoptozom | 45 |
| 1.8.3.1. | Bcl-2 proto-onkogeni..... | 46 |

| | | |
|----------|--|----|
| 1.8.4. | Geni koji popravljaju DNK | 46 |
| 2. | CILJEVI..... | 47 |
| 3. | HIPOTEZA RADA..... | 48 |
| 4. | MATERIJAL I METODE | 49 |
| 1.7. | ISPITANICI, DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKE PROCEDURE I KARAKTERISTIKE PRIMARNOG TUMORA..... | 49 |
| 4.2. | TKIVNI UZORCI DOBIJENI HIRURŠKOM RESEKCIJOM..... | 50 |
| 4.2.1. | Patohistološka evaluacija..... | 50 |
| 4.2.2. | Imunohistohemijska analiza ekspresije TTF-1..... | 51 |
| 4.2.3. | Patohistološka evaluacija metastatski izmenjenih limfnih čvorova | 52 |
| 4.3. | TKIVNI UZORCI DOBIJENI BIOPSIJOM | 53 |
| 4.3.1. | Patohistološka evaluacija..... | 53 |
| 4.3.2. | Morfometrijska analiza biopsijskih uzoraka..... | 55 |
| 4.4. | MOLEKULARNA ANALIZA | 56 |
| 4.4.1. | Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tumorskog tkiva | 56 |
| 4.4.2. | Određivanje koncentracije izolovane genomske DNK..... | 59 |
| 4.4.3. | Detekcija EGFR mutacija..... | 60 |
| 4.4.4. | Razblaživanje uzoraka..... | 60 |
| 4.4.5. | Priprema radnog rastvora Master Miksa (MMX-1, MMX-2 i MMX-3)..... | 61 |
| 4.4.6. | Pipetiranje na mikrotitar ploču | 61 |
| 4.4.7. | Interpretacija rezultata | 62 |
| 4.5. | STATISTIČKA OBRADA (ANALIZA) PODATAKA..... | 63 |
| 5. | REZULTATI..... | 65 |
| 5.1. | ISPITANICI, DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKE PROCEDURE I KARAKTERISTIKE PRIMARNOG TUMORA..... | 65 |
| 5.1.1. | Pol..... | 65 |
| 5.1.2. | Starost..... | 65 |
| 5.1.3. | Pušačke navike | 66 |
| 5.1.4. | Dijagnostičke procedure..... | 67 |
| 5.1.5. | Terapijske procedure | 67 |
| 5.1.6. | Makroskopske karakteristike tumora..... | 68 |
| 5.1.7. | Patološki stadijum bolesti..... | 69 |
| 5.2. | TKIVNI UZORCI DOBIJENI HIRURŠKOM RESEKCIJOM..... | 70 |
| 5.2.1. | Kompleksnost histološke građe adenokarcinoma..... | 70 |
| 5.2.2. | Predominantni histološki tip..... | 70 |
| 5.2.2.1. | Povezanost predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama bolesnika..... | 71 |
| 5.2.2.2. | Povezanost predominantnog tipa sa karakteristikama primarnog tumora | 72 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.2.3. | Sekundarni histološki tip | 74 |
| 5.2.4. | Prognostičke grupe | 75 |
| 5.2.5. | Imunohistochemijska evaluacija | 75 |
| 5.2.6. | Limfogene metastaze | 77 |
| 5.2.6.1. | Odnos između predominantnog tipa u primarnom tumoru i predominantnog tipa u limfogenim metastazama | 77 |
| 5.2.6.2. | Odnos između sekundarnog tipa u primarnom tumoru i predominantnog tipa u limfogenim metastazama | 78 |
| 5.2.6.3. | Odnos između sekundarnog tipa u limfogenim metastazama sa histološkom građom primarnog tumora | 78 |
| 5.3. | TKIVNI UZORCI DOBIJENI BIOPSIJOM..... | 78 |
| 5.3.1. | Histološka evaluacija biopsijskih uzoraka..... | 79 |
| 5.3.2. | Morfometrijska analiza biopsijskih uzoraka..... | 81 |
| 5.4. | PODUDARNOST IZMEĐU HISTOLOŠKIH KARAKTERISTIKA TUMORA U BIOPSIJSKIM UZORCIMA I UZORCIMA DOBIJENIM HIRURŠKOM RESEKCIJOM | 82 |
| 5.4.1. | Podudarnost histološke građe | 82 |
| 5.4.2. | Podudarnost između dominantnih tipova | 83 |
| 5.4.3. | Podudarnost između sekundarnih tipova | 84 |
| 5.5. | MOLEKULARNA ANALIZA | 84 |
| 5.5.1. | Izolacija DNK..... | 84 |
| 5.5.2. | EGFR mutacioni status..... | 85 |
| 6. | DISKUSIJA | 89 |
| 7. | ZAKLJUČCI..... | 112 |
| 8. | LITERATURA | 114 |
| 9. | LISTA SKRAĆENICA..... | 125 |

1. UVOD

1.1. EPIDEMIOLOGIJA

Početak XX veka karcinom pluća je bio retko oboljenje, ali poslednjih decenija poprima razmere epidemije i danas predstavlja veliki socijalno-ekonomski i zdravstveni problem (1). U svetu je u 2012. god. registrovano 1,6 miliona novoobolelih i 1,8 miliona umrlih od karcinoma pluća koji stoga predstavlja vodeći uzrok obolevanja i umiranja od malignih bolesti (2). Najčešće obolevaju stariji od 60 godina (3,4). Trenutno muškarci obolevaju češće od žena, ali zbog aktuelnih trendova u pušenju, predviđanja su da će karcinom pluća podjednako biti zastupljen kod oba pola do 2030. godine (5). Više od polovine obolelih u momentu dijagnostikovanja karcinoma pluća ima proširenu bolest. Uprkos činjenici da je postignut evidentan napredak u dijagnostikovanju i lečenju stopa mortaliteta je i dalje visoka, a petogodišnje preživljavanje ispod 20% (6,7,8,9).

U SAD je zabeleženo 224 100 novoobolelih i 159 260 umrlih od karcinoma pluća u 2014. godini. Iako je u ovoj zemlji zabeležen pad prevalencije pušenja kod oba pola karcinom pluća se prema učestalosti kod muškaraca nalazi iza karcinoma prostate, kod žena iza karcinoma dojke i vodeći je uzrok mortaliteta od malignih bolesti kod oba pola (10,11).

Karcinom pluća je u Evropi posle karcinoma prostate najčešće maligno oboljenje muškaraca, kod žena se nalazi iza karcinoma dojke i kolorektuma. Prema sumiranim podacima studije 40 registara zemalja evropskog kontinenta u 2012. god. incidenca karcinoma pluća kod muškaraca je najveća u zemljama centralne i istočne Evrope: Mađarskoj (109/100 000), Makedoniji (102/100 000) i Poljskoj (90/100 000), a najniža u zemljama na severu kontinenta: Finskoj (45/100 000) i Švedskoj (29/100 000). Kod žena je incidenca najviša na severu u Danskoj (55/100 000) i Holandiji (44/100 000), a najniža na istoku u Ukrajini i Belorusiji (9/100 000) i Ruskoj federaciji (10/100 000) (12,13). Iako je zabeležen pad mortaliteta od 6% u odnosu na 2009. god. 25% smrti muškaraca je posledica karcinoma pluća koji je i dalje vodeći uzrok mortaliteta od karcinoma u 2013. godini (14). Mortalitet žena zbog karcinoma pluća u 2013. god. beleži rast od 7% u odnosu na 2009. god. i sa udelom od 14% se nalazi iza karcinoma dojke i kolorektuma sa tendencijom da u 2015. god. postane vodeći uzrok mortaliteta i u ženskoj populaciji (12,14,15). Pored razlika u polnoj distribuciji mortaliteta postoje i geografske razlike na tlu Evrope. Stopa mortaliteta kod muškaraca je

najviša u Poljskoj (175,3/ 100 000), kod žena u Ujedinjenom kraljevstvu i Poljskoj (između 95/100 000 i 100/ 100 000) (14,15).

U Srbiji godišnje prosečno oko 25 000 osoba oboli od malignih bolesti. Od karcinoma pluća oboleva sve veći broj muškaraca i žena s tim da se odnos broja obolelih muškaraca u odnosu na žene promenio sa 9:1 (1985. god.) na 3:1 (2012. god.). U 2012. godini je od karcinoma pluća obolelo 3 117 muškaraca te je karcinom pluća sa udelom od 22,5% u odnosu na sve maligne bolesti bio vodeći uzrok obolevanja kod muškaraca ispred karcinoma prostate (12,6%) i karcinoma kolorektuma (12,4%). Muškarci su najviše obolevali u prvoj polovini sedme decenije. Standardizovana stopa incidence karcinoma pluća kod muškaraca je iznosila 65,0/100 000 (u rasponu od 34,3/100 000 u Borskom okrugu do 91,8/100 000 na teritoriji grada Beograda). Od 12 358 žena obolelih od malignih bolesti u istom periodu karcinom pluća je sa udelom od 7,8% četvrti uzrok obolevanja posle karcinoma dojke (25,8%), karcinoma kolorektuma (8,5%) i karcinoma grlića materice (8,0%). Žene su najviše obolevale u šestoj deceniji. Standardizovana stopa incidence karcinoma pluća kod žena je iznosila 18,2/100 000 (u rasponu od 9,8/100 000 Pčinjskom do 27,1/100 000 u Podunavskom okrugu). Broj umrlih od karcinoma pluća u Srbiji je u porastu kod oba pola. Imajući u vidu da se odnos umrlih muškaraca i žena promenio sa 5:1 (1990. god.), 3:1 (1995. god.) na 2,68:1 (2012. god.) zabeležen je veći trend umiranja od karcinoma pluća kod žena (18,19). Oko 15 000 osoba godišnje umre od malignih bolesti u Srbiji. U 2012. god. je od karcinoma pluća umrlo 2 588 muškaraca i sa udelom od 29,8% karcinom pluća je vodeći uzrok mortaliteta kod muškaraca. Prosečna standardizovana stopa mortaliteta kod muškaraca je iznosila 51,6/100 000 (u rasponu od 31,2/100 000 u Borskom okrugu do 60,9/100 000 u Podunavskom okrugu). Iste godine od karcinoma pluća su umrle i 963 žene, a karcinom pluća je sa udelom od 14,7% drugi vodeći uzrok umiranja žena od malignih bolesti iz karcinoma dojke (18%). Prosečna standardizovana stopa mortaliteta kod žena je iznosila 17,1/100 000 (u rasponu od 7,5/100 000 u Topličkom okrugu do 23,9/100 000 na teritoriji grada Beograda). Muškarci i žene su najviše umirali u osmoj deceniji (16).

U Vojvodini su incidenca i mortalitet od karcinoma pluća kod muškaraca veći u odnosu na većinu zemalja Evropske unije, dok su kod žena slični s tim da je evidentna njihova različita geografska distribucija. Prema podacima Registra malignih i benignih tumora pluća u Vojvodini je registrovano ukupno 16 994 malignih tumora pluća, 13 022 (76,63%) kod muškaraca i 3972 (23,37%) kod žena u periodu od 2002. god. do 2012. god. i zabeležen porast stope incidence kod muškaraca sa 74,09/100 000 na 82,02/100 000 i kod žena sa

15,57/100 000 na 27,00/100 000. Prema istim podacima karcinom pluća je sa udelom od 32,6% od ukupnog broja registrovanih malignih bolesti vodeći uzrok umiranja kod muškaraca i drugi najčešći uzrok smrtnih ishoda kod žena (14,6%) iza karcinoma dojke (18,3%). Stopa mortaliteta kod muškaraca, u istom registracionom periodu, je porasla sa 64,30/100 000 na 72,20/100 000, kod žena sa 12,72/100 000 na 21,72/100 000 (17,18).

1.2. PREVENCIJA NASTANKA KARCINOMA PLUĆA

1.2.1. Primarna prevencija

Duvanski dim je rizik broj jedan u nastanku karcinoma pluća stoga je ključ strategije primarne prevencije kontrola pušenja i prihvatanje zdravih stilova života, a ostvaruje se kroz zdravstveno-promotivne kampanje, edukaciju stanovništva o štetnom uticaju duvanskog dima putem štampanih medija i sve popularnijih društvenih mreža (*Facebook, Twitter*) (19,20,21).

Zakonske odredbe o zabrani pušenja na javnim mestima, poreske akcize na duvanske proizvode i podizanje njihove cene uz dobro dizajnirane programe o štetnoj ulozi duvanskog dima doprinose smanjivanju prevalence pušenja, posledično incidence i mortaliteta od karcinoma pluća, a samim tim i ekonomski troškovi povezani sa lečenjem karcinoma pluća postaju manji (10,22,23).

1.2.2. Sekundarna prevencija

Skrining karcinoma pluća se ubraja u sekundarnu prevenciju čiji je cilj da se u rizičnoj populaciji bez simptoma bolesti oboljenje otkrije u ranoj fazi razvoja kada su šanse za izlečenje veće (24).

Skrining programi bazirani na citološkoj analizi sputuma i radiografiji grudnog koša ne smanjuju morbiditet i mortalitet od karcinoma pluća (25). Međutim, upotreba niskodozne kompjuterske tomografije (CT) grudnog koša u visokorizičnoj populaciji aktivnih i bivših pušača starosti od 55 do 74 godina, koji puše više od 30 pakovanja cigareta godišnje smanjuje stopu morbiditeta i mortaliteta za 20%. Bez obzira na ostvaren benefit CT skrining programa neophodne su nove studije koje bi analizirale i potencijalni štetni uticaj ovih programa (26).

1.3. FAKTORI RIZIKA U NASTANKU KARCINOMA PLUĆA

1.3.1. Pušenje

Veza između pušenja duvana i karcinoma pluća prvi put je potvrđena u prvoj polovini XX veka (27). Od tog vremena, brojni statistički, klinički i eksperimentalni podaci pokazuju da

pušači oba pola imaju povećan rizik za nastanak karcinoma pluća. U respiratornom epitelu kod pušača dolazi do gubitka cilijarnih ćelija, hiperplazije bazalnih ćelija, skvamozne metaplazije i ćelijske atipije (28,29,30).

Duvanski dim sadrži brojne kancerogene materije, indukuje komplikovane genetske promene od kojih su mutacije p53 gena najčešće (10% svih pušača), ali su nađene i kod više od ½ pušača obolelih od karcinoma pluća (29,30). Hromozom 15q25.1 je sastavljen od nikotinskih receptora (CHRNA5 i CHRNA3) koji su povezani sa pušenjem i nikotinskom zavisnosti (31,32,33). Duvanski alkaloidi i nikotin se vezuju i aktiviraju ove receptore, dolazi do ćelijske proliferacije i migracije, tumorske invazije i inhibicije apoptoze (34,35,36,37,38,39).

Sve više je pušača među mladima, više od polovine (54,7%) školske dece starosti između 13 i 15 godina je probalo cigarete, njih trećina prvi put pre navršene 10-e godine, a 16,3% su trenutni pušači (40,41). Veću prevalencu pušenja u mlađoj populaciji beleži i *Christophi*, 37% učenika i 23% učenica visokoškolskih ustanova su pušači, od kojih oko polovina puši svaki dan (42). Najviše pušača je staro između 35 i 44 godine, ima loš socijalno-ekonomski status, živi u urbanim sredinama i ima srednje obrazovanje. Za razliku od pušača u Finskoj, Francuskoj i Velikoj Britaniji pušači u Srbiji tri puta više puše na poslu nego kod kuće s tim da muškarci puše duže, intenzivnije i više u odnosu na žene (27,43,44).

Količina popušanih cigareta, dužina pušenja, tip cigareta i sporo odvikavanje od pušenja doprinose rastu stope mortaliteta od karcinoma pluća koja je tri puta veća kod pušača. Životni vek pušača je kraći za oko 15 godina, a benefit godina života kod bivših pušača je od šest do 10 godina i zavisi od dobi u kojoj su prestali da puše (24,45,46,47). Smatra se da je 440 000 preranih smrti i gubitak od oko 157 miliona dolara na godišnjem nivou posledica pušenja u SAD krajem devedesetih godina prošlog veka (45).

1.3.2. Ishrana i dodaci ishrani

Ishrana i dodaci ishrani utiču na DNK metilaciju, reparaciju, ćelijsku invaziju, angiogenezu i sposobnost metastaziranja (48,49,50). Prehrambene navike se razlikuju kod pušača i nepušača. Pušači unose više masti i zasićenih masnih kiselina, manje voća i povrća (51,52). Ishrana bogata: α -karotenom, β -karotenom, folatima, likopenom i vitaminima (C, B2, B6, B12 i E) smanjuje rizik za nastanak karcinoma pluća kod aktivnih i bivših pušača za 20% do 40% (53,54,55,56,57).

1.3.3. Alkohol

Za razliku od brojnih studija koje proučavaju ulogu duvanskog dima u nastanku karcinoma pluća uloga alkohola nije dovoljno ispitana (30). Zajednička analiza sedam studija pokazuje da je rizik za nastanak karcinoma pluća povećan kod osoba koje konzumiraju najmanje 30g alkohola dnevno (58). Slične rezultate pokazuje i analiza 235 studija sa 117 471 ispitanika gde je zabeležena doza alkohola koja povećava rizik za nastanak karcinoma pluća i drugih malignih oboljenja 25g na dan (dva pića dnevno) što je najverovatnije povezano i sa unosom manje količine namirnica koje su bogate biljnim vlaknima i antioksidantnim materijama (59).

1.3.4. Fizička aktivnost

Fizička aktivnost u slobodno vreme se odlikuje kratkoročnom i intenzivnom potrošnjom energije, razlikuje se od radne fizičke aktivnosti u kojoj se energija troši duži period, ali je stopa potrošnje energije niža (60). Prva objavljena meta analiza o uticaju fizičke aktivnosti u slobodno vreme na rizik od nastanka karcinoma pluća se zasniva na podacima iz dve baze (MEDLINE i EMBASE). Podaci iz ove analize pokazuju da je rizik za nastanak karcinoma pluća kod osoba koje u slobodno vreme često, teško i energično vežbaju manji za 25% do 38% (61). Najbolji efekti fizičke aktivnosti se postižu između 54 i 62 godine života i kod pušača koji puše manje od 44 kutije cigareta godišnje (62).

1.3.5. Aerozagađenje

Vazduh zagađuju čestice: kiselina, organskih hemikalija, metala, soli, prašine i zemljišta. Iako je veza između kvaliteta vazduha i nastanka raznih oboljenja u humanoju populaciji poznata od antičkog doba, svest o zdravstvenim efektima aerozagađenja probuđena je tek u XX veku (63,64). Ubrzan ekonomski razvoj i urbanizacija su praćeni većim aerozagađenjem i povećanjem broja malignih oboljenja posebno karcinoma pluća (65,66,67).

1.3.6. Azbest

Azbest se primenjuje u industriji tekstila, papira, crepa, toplotne izolacije, cementnih ploča i cevi. Ubraja se među najvažnije profesionalne kancerogene, ali je rizik za nastanak karcinoma pluća povećan i kod stanovnika koji žive u okolini rudnika azbesta. Azbest deluje samostalno, indukuje fibrozu pluća, povećava učestalost p53 mutacija, može da bude pokretač genotoksičnih efekata duvanskog dima i doprinosi nastanku karcinoma pluća (65,68,69).

1.3.7. Radon

Radon je inertni plin, nastaje radioaktivnim raspadom urana 238. Nakon raspada emituje alfa čestice koje se spajaju sa aerosolima, dospevaju do sluznice respiratornih organa gde ispoljavaju kancerogeno delovanje (70,71). Rizik za nastanak karcinoma pluća je povećan kod rudara pušača zaposlenih u rudnicima sa lošom ventilacijom, ali i ukoliko je ekspozicija radonom u stambenim prostorima niža od 200 bq/m³ (72, 73, 74,75).

1.3.8. Druge bolesti

Kod različitih oboljenja postoji povišen rizik za nastanak karcinoma pluća. Osim veze sa intersticijalnom pneumonijom, koja je prvi put publikovana u Španiji 1957. godine, postoji niz drugih oboljenja respiratornog sistema kod kojih je rizik za nastanak karcinoma pluća povišen (76,77). Retrospektivna analiza 17 studija iz Evrope i Severne Amerike (1984.god.-2011.god.) pokazuje povišen relativni rizik za nastanak karcinoma pluća kod obolelih od: emfizema pluća (2,44), hroničnog bronhitisa (1,47), pneumonija (1,57) i tuberkuloze (1,48) (78). Praćenjem 4,8 miliona osoba u godinama rizika za nastanak karcinoma pluća utvrđena je povećana incidenca i stopa mortaliteta kod obolelih od autoimunih oboljenja: diskoidni lupus eritematosus (4,71 i 4,80), polimiozitis (4,20 i 4,17), dermatomiozitis (2,47 i 2,69), reumatska groznica (2,07 i 2,07) i sistemska skleroza (2,19 i 1,98) (79). Lee je u meta analizi iz 2013. godine pokazao da *diabetes mellitus*, bez obzira na tip, povećava rizik od nastanka karcinoma pluća (1,11), prvenstveno kod žena (80). Klein je objavio da je incidence HPV u karcinomu pluća 24,5% u svetu i 17% u Evropi, ali je rizik povećan i kod HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) pozitivnih i obolelih od AIDS-a (*Acquired Immune Deficiency Syndrom*) (81,82).

Karcinom pluća nije uvek prvo maligno oboljenje. Kod obolelih od Hočkinove bolesti (*Morbus Hodgkin*) dijagnostikuje se kao drugo maligno oboljenje u 25,4% slučajeva prosečno nakon 19,4 godina, kao treće maligno oboljenje kod 26,8% obolelih prosečno nakon 4,3 godine od druge dijagnostikovane maligne bolesti (83).

1.3.9. Familijarni faktori

Smatra se da je karcinom pluća genetski uslovljen ukoliko je bolest dijagnostikovana kod većeg broja srodnika obolelih u mlađoj životnoj dobi i onih s promenama lokusa 6q23–25p i varijacije T790M u receptoru epidermalnog faktora rasta EGFR (84,85,86). Razumevanje uloge pozitivne porodične istorije, kao bitnog faktora povišenog rizika u nastanku karcinoma

pluća, trebalo bi da ima značajnu ulogu u kliničkom savetovanju i skriningu odgovarajuće populacije (84).

1.4. KLINIČKE MANIFESTACIJE I SIMPTOMI KARCINOMA PLUĆA

1.4.1. Intratorakalne manifestacije

Intratorakalne manifestacije nastale zbog karcinomom pluća su: perzistentni kašalj praćen mukopurulentnom ekspiracijom (67%; 88%) dispnea (51%; 62%), iskašljavanje krvi (14%; 27%) i bol u grudnom košu (41%; 28%) (87,88). Drugi simptomi su ređi. Sindrom gornje šuplje vene se javlja kod manje od 10% obolelih, najčešće u sitnoćelijskom karcinomu (45%), udružen je sa medijastinalnom i cervikalnom limfadenopatijom, praćen glavoboljom i poremećenim vidom. Intenzivan, lokalizovan i perzistentan bol u grudnom košu ukazuje na postojanje direktne invazije pleure ili zida grudnog koša (2,16%). Bol u ramenu i ruci (*Pancoast-ov* sindrom), ipsilateralni Hornerov sindrom i promuklost često nisu prepoznati kao simptomi karcinoma pluća dok su maligni pleuralni izliv (14%) i perikardni izliv (2%) posledice širenja karcinoma pluća, pogoršavaju dispneu i dovode do letalnog ishoda (89,90).

1.4.2. Ekstratorakalne manifestacije

Gubitak apetita i telesne težine, groznica, generalizovana slabost, glavobolja, mučnina, povraćanje, žarišni neurološki simptomi, konfuzija i psihički poremećaji su posledica metastatske bolesti. Metastaze su najčešće u kostima, nadbubrežnim žlezdama, jetri, mozgu, supraklavikularnim i prednjim cervikalnim limfnim čvorovima (87,88,89,90).

1.4.3. Paraneoplastični sindrom

Paraneoplastični sindrom (PNS) je grupa simptoma koji su posledica produkcije biološki aktivnih supstanci od strane tumora ili odgovora organizma na nastala tumorska antitela. Mada se može javiti sa karcinomima različite lokalizacije, najčešće je udružen sa karcinomom pluća, češće sa sitnoćelijskim karcinomom i nesitnoćelijskim karcinomom sa neuroendokrinom diferencijacijom, ali i kao prvi simptom ili znak recidiva nakon sprovedene terapije (91,92).

1.5. TNM KLASIFIKACIJA I STADIJUM KARCINOMA PLUĆA

Histološka klasifikacija karcinoma pluća ima akademski i praktični značaj, određuje biološko ponašanje, terapijski odgovor i prognozu bolesti. Tradicionalna histološka klasifikacija,

predložena od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO), proširena je genetskim i kliničkim informacijama 2004. godine (93).

Anatomska proširenost karcinoma pluća je određena na osnovu kriterijuma TNM klasifikacije koja je od 50-ih godina XX veka pretrpjela brojne izmene. Poslednja revizija iz 2009. godine se primenjuje od 2010. godine. Slovo T predstavlja status primarnog tumora, slova i brojevi koji se dodaju pokazuju veličinu tumora i stepen njegove proširenosti, odnosno da li tumor zahvata pleuru ili okolne vitalne organe (Tabela 1.). Slovo N pokazuje da li se maligna bolest proširila u limfne čvorove (intrapulmonalni, segmentalni, hilarni, interlobarni, medijastinalni i supraklavikularni limfni čvorovi) (Tabela 2.). Slovo M ukazuje na prisustvo ili odsustvo metastaza u kontralateralnom plućnom krilu ili udaljenim organima i tumači se kao proširena maligna bolest (Tabela 3.). Stadijum maligne bolesti je određen parametrima TNM klasifikacije. Podela stadijuma bolesti na četiri osnovna (od I do IV), od kojih su stadijumi I, II i III podeljeni u podgrupe a i b, ima terapijski i prognostički značaj (94,95) (Tabela 4.).

Tabela 1. Status primarnog tumora.

| Tis | Karcinom in situ |
|-----|--|
| T1 | Tumor ≤ 3 cm okružen plućima ili visceralnom pleurom, i bez bronhoskopske evidencije o invaziji proksimalno od lobarnog bronha |
| T1a | Tumor ≤ 2 cm u najvećem dijametri |
| T1b | Tumor > 2 cm i ≤ 3 cm u najvećem dijametri |
| T2 | Tumor > 3 cm u najvećem dijametri ili tumor sa bilo kojom od sledećih karakteristika: zahvata glavni bronh ≥ 2 cm distalno od karine, zahvata visceralnu pleuru, udružen sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji zahvataju hilarnu regiju, ali ne zahvataju celo pluće |
| T2a | Tumor > 3 cm i ≤ 5 cm |
| T2b | Tumor > 5 cm i ≤ 7 cm |
| T3 | Tumor > 7 cm u najvećem dijametri ili tumor sa bilo kojom od sledećih karakteristika: direktno zahvata: grudni zid, dijafragmu, frenični nerv, medijastinalnu pleuru, parijetalni perikard, glavni bronh na manje od 2 cm od karine bez njenog zahvatanja, atelektaza ili pneumonitis celog pluća, odvojeni tumorski nodusi u istom režnju |
| T4 | Tumor bilo koje veličine koji zahvata: medijastinum, srce, velike krvne sudove, traheju, povratni nerv, jednjak, kičmene pršljenove, karinu ili sa odvojenim tumorskim nodusima u drugom ipsilateralnom režnju. |

Tabela 2. Regionalni limfni čvorovi- N status.

| | |
|----|--|
| N0 | Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima |
| N1 | Metastaze bilo u ipsilateralnim peribronhijalnim ili hilarnim limfnim čvorovima, bilo i u jednim i u drugim, uključujući i direktno zahvatanje |
| N2 | Metastaze u ipsilateralnim medijastinalnim i/ili subkarinalnom limfnom čvoru |
| N3 | Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim, kontralateralnim hilarnim; u ipsilateralnim i/ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima |

Tabela 3. Udaljene metastaze- M status.

| | |
|-----|--|
| M0 | Bez udaljenih metastaza |
| M1 | Udaljene metastaze |
| M1a | Odvojeni tumorski nodus (i) u kontralateralnom režnju; tumor sa pleuralnim nodusima ili maligni pleuralni i/ili perikardni izliv |
| M1b | Udaljene metastaze |

Tabela 4. Stadijum bolesti.

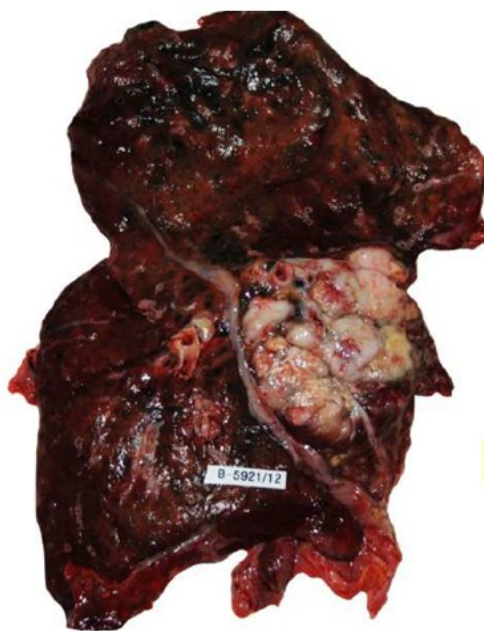
| T/M | | N0 | N1 | N2 | N3 |
|--------|-----|------|------|------|------|
| T1 | T1a | IA | IIA | IIIA | IIIB |
| | T1b | IA | IIA | IIIA | IIIB |
| T2 | T2a | IB | IIA | IIIA | IIIB |
| | T2b | IIA | IIB | IIIA | IIIB |
| T3 | | IIB | IIIA | IIIA | IIIB |
| T4 | | IIIA | IIIA | IIIB | IIIB |
| M1a, b | | IV | IV | IV | IV |

1.6. ADENOKARCINOM PLUĆA

Prema definiciji SZO adenokarcinom je maligni tumor epitelnog porekla sa glandularnom diferencijacijom, produkcijom mucina ili ekspresijom pneumocitnih imunohistohemijskih markera. Histološki pokazuje jedan ili više arhitektonskih aranžmana: bronhioloalveolarni (lepidični), acinarni, papilarni, mikropapilarni ili solidni (93).

1.6.1. Makroskopski izgled adenokarcinoma pluća

Adenokarcinom pluća najčešće raste kao periferni čvor zvezdastih ili lobuliranih ivica sa centralnom ožiljačnom fibrozom prošaranom antrakotičnim pigmentom. Visceralna pleura iznad tumora često je zadebljana i uvučena u obliku slova V (Slika 1.). U većim tumorima se mogu naći područja nekroze i krvarenja te tumor poprima izgled “tumorske kaverne”. Ređe tumor raste kao endobronhijalni plak ili polip obložen intaktnom sluznicom, “pseudomezotelijalno” zadebljanje, intramuralno ili difuzno-mrežasto (retikularno odnosno limfangitično) (93).



Slika 1. Makroskopski izgled adenokarcinoma pluća.

1.6.2. IATSL/ATS/ERS klasifikacija preinvazivnih lezija i adenokarcinoma pluća u hirurškim uzorcima

Mondiale de la Santé organizacija je 1967. god. podržala ideju o neophodnoj standardizaciji tumorske nomenklature u svakom organu, pre svega s ciljem da disciplinuje patologe koji su za istu leziju koristili različite nazive. Iz navedenih razloga je nastala prva plava knjiga SZO zasnovana na histološkoj klasifikaciji neoplazmi u svakom organu (96,97).

Imajući u vidu da različiti histomorfološki parametri uočeni u pojedinim tipovima adenokarcinoma pluća pružaju dodatne prognostičke informacije *Noguchi* je 1995. god. predložio da se mali periferni adenokarcinomi pluća klasifikuju na osnovu histološkog izgleda

u šest grupa koje bi pre svega imale prognostički značaj (104,105). Međutim, do 2011. godine najčešće je primenjivana klasifikacija je SZO iz 2004. godine (93,100) (Tabela 5.).

Tabela 5. Klasifikacija adenokarcinoma pluća SZO iz 2004. godine.

| |
|---|
| Adenokarcinom |
| Mešoviti tip adenokarcinoma |
| Acinarni adenokarcinom |
| Papilarni adenokarcinom |
| Bronhioloalveolarni karcinom nemucinozni, mucinozni, mešoviti nemucinozni i mucinozni ili neodređen. |
| Solidni adenokarcinom sa produkcijom sluzi |
| Varijante adenokarcinoma: |
| Embrionalni (fetalni) |
| Mucinozni (koloidni) |
| Karcinom izgleda prstena pečatnjaka |
| Svetloćelijski adenokarcinom |

Nova dostignuća iz medicinske onkologije, radiologije i molekularne biologije nametnula su potrebu za novom klasifikacijom adenokarcinoma pluća i multidisciplinarnom pristupu ovoj bolesti. Stoga je internacionalni tim sastavljen od svetskih eksperata: patologa, pulmologa-onkologa, radiologa, biologa i torakalnih hirurga u okviru Internacionalne asocijacije za proučavanje karcinoma pluća (*International Association for the Study of Lung Cancer-IASLC*), američkog torakalnog društva (*American Thoracic Society-ATS*) i evropskog respiratornog društva (*European Respiratory Society-ERS*) predložio novu klasifikaciju adenokarcinoma pluća u sitnim biopsijama i citološkim uzorcima (Tabela 6.), klasifikaciju preinvazivnih lezija i adenokarcinoma u hirurški reseciranim uzorcima (Tabela 7.), koja ima za cilj da omogući uniformnu terminologiju i dijagnostičke kriterijume, komparaciju među svetskim studijama (100). Ova klasifikacija ima prednosti u personalizovanom pristupu

pacijentima, boljoj selekciji pacijenata za molekularna testiranja i pokazuje bolju prognostičku vrednost u odnosu na ranije klasifikacije (101,102,103).

Tabela 6. IASLC/ATS/ERS terminologija adenokarcinoma pluća u sitnim biopsijama i/ili citološkim uzorcima.

| IATSL/ATS/ERS terminologija |
|---|
| Adenokarcinom |
| Lepidični |
| Acinarni |
| Papilarni |
| Mikropapilarni |
| Solidni |
| Drugi |
| Nemikrocelularni karcinom verovatno adenokarcinom |
| Nemikrocelularni karcinom sa morfologijom skvamoznog karcinoma i adenokarcinoma |
| Nemikrocelularni karcinom, ne može se dalje klasifikovati |

Tabela 7. IASLC/ATS/ERS klasifikacija adenokarcinoma i preinvazivnih lezija u hirurški reseciranim uzorcima.

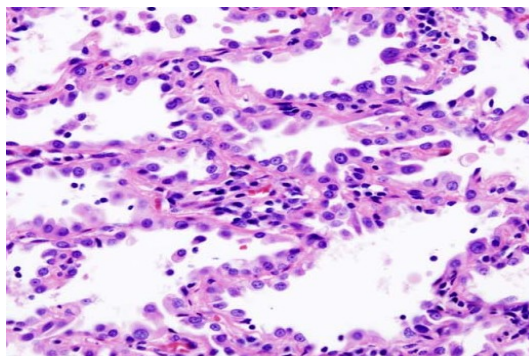
| Preinvazivne lezije |
|------------------------------------|
| Atipična adenomatozna hiperplazija |
| Adenokarcinom in situ |
| Nemucinozni |
| Mucinozni |
| Mešani |
| Minimalno invazivni adenokarcinom |
| Nemucinozni |
| Mucinozni |
| Mešani |

| |
|-------------------------------------|
| Tabela 7 nastavak |
| Invazivni adenokarcinom |
| Lepidično predominantni |
| Acinarno predominantni |
| Papilarno predominant |
| Mikropapilarno predominantni |
| Solidno predominantni |
| Varijante invazivnog adenokarcinoma |
| Invazivni mucinozni |
| Koloidni |
| Fetalni |
| Crevni |

1.6.2.1. Preinvazivne lezije

1.6.2.1.1. Atipična adenomatozna hiperplazija

Atipična adenomatozna hiperplazija (AAH) je preinvazivna lezija, predstavlja lokalizovanu proliferaciju blago do umereno atipičnih pneumocita II i *Clara* ćelija duž alveolarnih septi i respiratornih bronhiola sa vidljivim prostorima između ćelija (Slika 2.). *Clara* ćelije su cilindrične, ispupčene eozinofilne citoplazme put alveolarnih prostora. Pneumociti tipa II su kubičnog ili kupolastog oblika, fino vakuolizovane, svetle ili penušave citoplazme. Mogu se naći intranuklearne eozinofilne inkluzije, mitoze i bijedarni oblici (93,100,104).

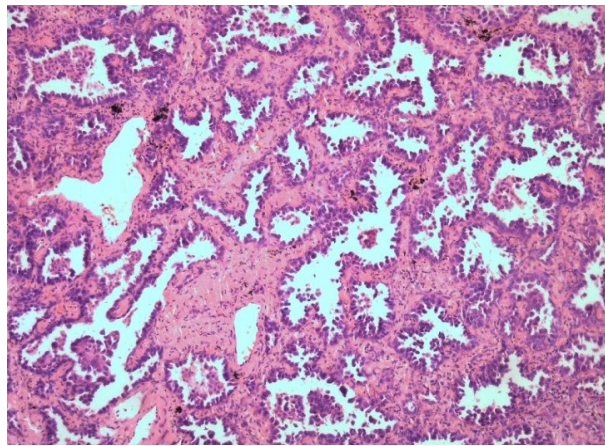


Slika 2 Atipična adenomatozna hiperplazija, H&E,200x

Makroskopski ima izgled nejasno ograničenog tamno-žutog nodusa veličine ≤ 5 mm. Najčešće se nalazi na periferiji *in situ* ili invazivnog adenokarcinoma. AAH se nalazi kod 2%-4% obdukovanih bez karcinoma pluća i kod 35% lobektomija zbog adenokarcinoma (93,100,104).

1.6.2.1.2. Adenokarcinom *in situ*

Adenokarcinom *in situ* (AIS) je redak tip tumora veličine ≤ 3 cm, dijagnostikuje se samo u hirurški reseciranim uzorcima. Ranije je bio poznat kao bronhioloalveolarni karcinom (BAK) i predstavlja proliferaciju blago atipičnih ćelija duž normalnih ili sklerotično izmenjenih alveolarnih septi pokazujući čist lepidični tip rasta. Papile, mikropapile, intraalveolarne grupe ćelija tumora, invazija strome, pleure i vaskularnih prostora nije prisutna (Slika 3.).



Slika 3. Nemucinozni tip AIS, H&E,200x

Poznata su dva tipa AIS: nemucinozni i mucinozni tip. Nemucinozni tip raste u vidu čvora, ćelije tumora su TTF-1 pozitivni pneumociti tipa II i/ili Clara ćelije. Mucinozni AIS ima pneumonični tip rasta, alveolarne septe su obložene visokim cilindričnim TTF-1 negativnim i CK20 pozitivnim ćelijama bazalno smeštenih jedara i obilnog intracitoplazmatskog mucina te podsećaju na peharaste ćelije (93,100,105).

1.6.2.2. Minimalno invazivni adenokarcinom

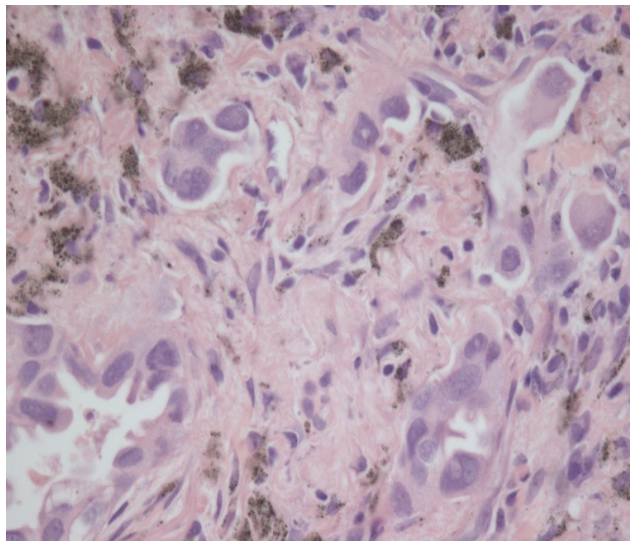
Minimalno invazivni adeno-karcinom (MIA) je redak, veličine ≤ 3 cm, dijagnostikuje se samo u hirurški reseciranim uzorcima. Raste u vidu solitarnog perifernog čvora sa centralnom fibrozom i antrakotičnom pigmentacijom ne tako retko i sa pupčastim uvlačenjem visceralne pleure (Slika 4.).



Slika 4. Makroskopski izgled MIA.

Histološki ima predominantno lepidični tip rasta i invaziju ≤ 5 mm. Ukoliko je prisutno više fokusa invazije oni se ne sabiraju. Na invaziju ukazuje:

- 1) prisustvo drugih histoloških tipova (acinarni, papilarni, mikropapilarni i/ili solidni),
- 2) jasna infiltracija miofibroblastne strome ćelijama tumora (Slika 5.).



Slika 5. Invazija strome grupama tumorskih ćelija u MIA, H&E,400x.

MIA isključuje tumore sa invazijom limfnih i krvnih sudova ili pleure kao i tumore sa jasnom tumorskom nekrozom (93,100,105).

S obzirom na produkciju sluzi MIA je podjeljen na nemucinozni i mucinozni tip. Kod nemucinoznog MIA utvrđena je pozitivna ekspresija pneumocitnih markera (TTF-1 i napsin A). Nasuprot navedenom kod mucinoznog MIA imunoreaktivnost je slična imunoreaktivnosti

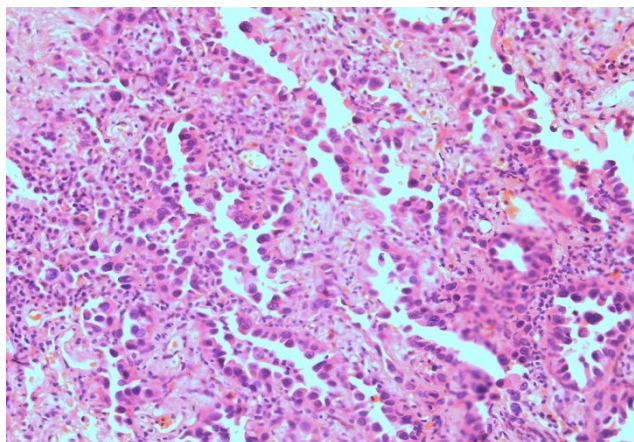
invazivnog mucinoznog adenokarcinoma u kome pneumocitni markeri imaju tendenciju da budu negativni, dok su CK20 i HNF4A pozitivni (106).

1.6.2.3. Invazivni adenokarcinom

Prema IASLC/ATS/ERS klasifikaciji mešoviti tip invazivnog adenokarcinoma, koji se nalazi kod 80% do 95% operisanih tumora podeljen je na: lepidično, acinarno, papilarno, mikropapilarno i solidno predominantni tip i varijante: invazivni mucinozni, koloidni, fetalni i crevni tip. Podela na predominantni tip je izvršena na osnovu semikvantitativne procene svakog histološkog tipa koji je zastupljen u $\geq 5\%$ celokupnog tumora (100,107,108). Predominantni tip je procentualno najzastupljeniji tip u tumoru i najčešće se nalazi u metastazama (109). Međutim, solidni i mikropapilarni tip se bez obzira na procentualnu zastupljenost u primarnom tumoru često nalaze u metastazama (110). Histološka građa adenokarcinoma u momentu recidiva bolesti može da bude izmenjena (103, 111). Ovakav pristup obezbeđuje bolju korelaciju između histoloških tipova, molekularnih i kliničkih karakteristika i predstavlja snažan prognostički faktor preživljavanja što nije slučaj sa tradicionalnom klasifikacijom iz 2004. godine (93,100).

1.6.2.3.1. Lepidično predominantni tip

Lepidično predominantni tip invazivnog adenokarcinoma predstavlja proliferaciju pneumocita tipa II ili *Clara* ćelija duž alveolarnih septi sa najmanje jednim fokusom invazije koji je veći od 5 mm, prisustvom drugog histološkog tipa (acinarni, papilarni, mikropapilarni i/ili solidni) ili miofibroblastne strome koja je infiltrirana ćelijama tumora (Slika 6.). Za razliku od MIA u lepidično predominantnom tipu je prisutna: nekroza, invazija pleure, limfnih i vaskularnih prostora (100).



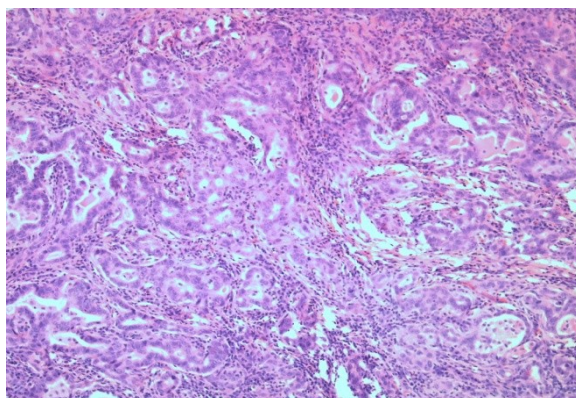
Slika 6. Lepidično predominantni tip, H&E,200x.

U pojedinim slučajevima za procenu invazije koristi se bojenje elastike po *Verhoff Van Gieson* (VVG). *Sakurai* sa saradnicima je primetio intaktna elastična vlakna u područjima lepidičnog rasta i poremećena elastična vlakna u područjima stromalne invazije (112).

Lepidično predominantni tip je redak predominantni obrazac, zastupljen u manje od 20% operisanih bolesnika (87). Najčešće raste u vidu periferno lokalizovanog čvora, prosečno je manji od 35 mm. Recidivi bolesti, metastaze u regionalnim limfnim čvorovima i invazija visceralne pleure su retki (103,105, 113). Kod bolesnika sa lepidično predominantnim tipom adenokarcinoma srednje vreme preživljavanja je 72,5 meseci, a petogodišnje preživljavanje oko 100% (114,115).

1.6.2.3.2. Acinarno predominantni tip

Acinarno predominantni tip je sagrađen od: adenoidno, tubularno, acinarno i kribriformno aranžiranih tumorskih ćelija. Unutar adenoidnih lumena i citoplazme tumorskih ćelija može da se nađe mucin. Ukoliko lumeni nisu jasno definisani jedra tumorskih ćelija su periferno postavljena put bazalne membrane dok je citoplazma centralno lokalizovana put lumena (Slika 7.) (100).



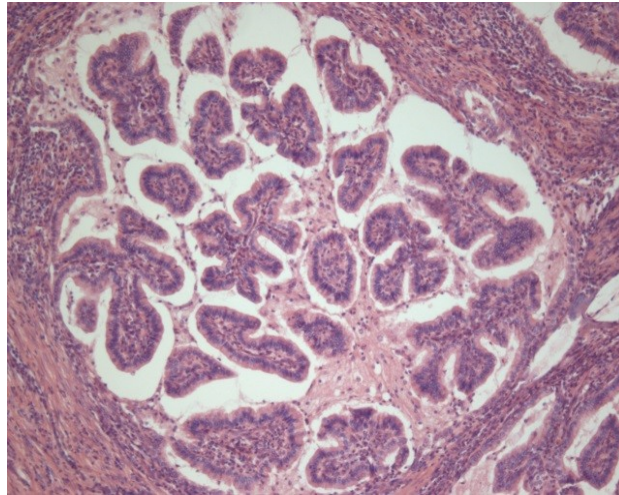
Slika 7. Acinarno predominantni tip, H&E,100x.

Na invaziju strome u acinarno predominantnom tipu ukazuje: disrupcija elastične pozadine sa prekinutim i zgužvanim elastičnim vlaknima, dezmodoplastična stroma i nasumice razbacane žlezde. Poremećena alveolarna arhitektonika i/ili miofibroblastna stroma pomažu u diferenciranu acinarnog tipa od AIS (116).

Acinarno predominantni tip je zastupljeniji u studijama sa većim brojem ispitanika, veličine je oko 4 cm (113,117,118,119). Kod bolesnika sa acinarno predominantnim tipom srednje vreme preživljavanja je 71 meseci, a petogodišnje preživljavanje 82,1% (114,120).

1.6.2.3.3. Papilarno predominantni tip

Papilarno predominantni tip je sagrađen od prstolikih vezivno-vaskularnih proliferata obloženih tumorskim ćelijama (Slika 8.). Diferencijalno dijagnostički problem predstavljaju tangencijalni rezovi alveolarnih pregrada u AIS. Ukoliko tumor pokazuje lepidični tip rasta, ali su alveolarni prostori ispunjeni papilama tumor se klasifikuje kao papilarni tip (100). U rešavanju diferencijalno dijagnostičke dileme između lepidičnog i papilarnog tipa koristi se VVG bojenje (112).

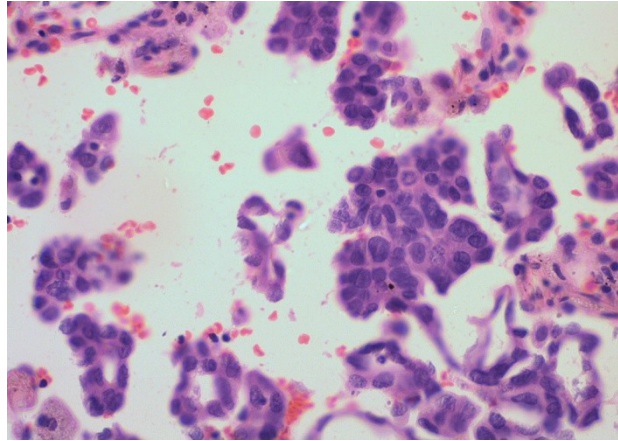


Slika 8. Papilarno predominantni tip, H&E 200x.

Frekvencija papilarno predominantnog tipa u publikovanim radovima je varijabilna (u rasponu od 10,1% do 17,2%) kao i prosečna veličina (u rasponu od 4,84 cm do 7 cm) (87,113,117). *Campos-Parra* navodi da se kod bolesnika sa proširenom bolesti papilarno predominantni tip ponaša slično agresivnijim tipovima kao što su mikropapilarno i solidno predominantni tip (87). Srednje vreme preživljavanje bolesnika sa papilarno predominantnim tipom adenokarcinoma je 42,2 meseci, a petogodišnje preživljavanje 84,5% (114,120).

1.6.2.3.4. Mikropapilarno predominantni tip

Mikropapilarno predominantni tip grade minimalno atipične male kubične ćelije koje u vidu čuperaka ili žlezdanih struktura plutaju u alveolarnim prostorima, mogu da se nađu i psamomska tela (Slika 9.) (100).



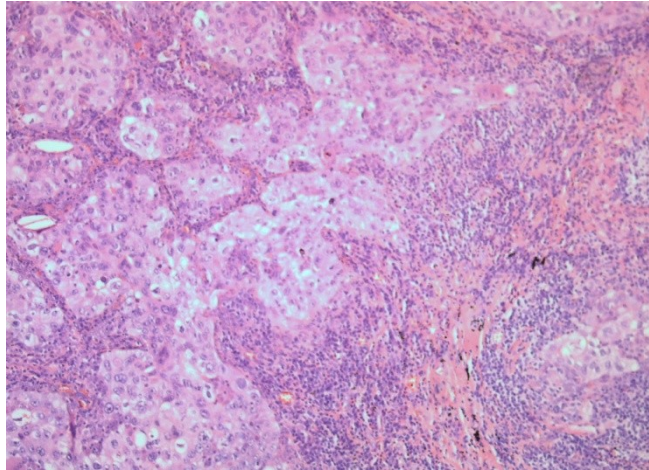
Slika 9. Mikropapilarno predominantni tip: plutajuće grupe tumorskih ćelija, H&E, 400x.

Ove razlikuje dve komponente mikropapilarnog tipa. Aerogena mikropapilarna komponenta se lako prepoznaje po tumorskim ćelijama koje plutaju unutar alveolarnih prostora. Stromalnu mikropapilarnu komponentu čine grupe tumorskih ćelija bez centralne vezivno-vaskularne osnove okružene praznim prostorima i procenjuju se kao invazivna komponenta u stromi (122).

Mikropapilarno predominantni tip je redak (u rasponu od 3,5% do 23%) (87,110,113). Prosečno je manji od 5 cm, podjednako zastupljen kod oba pola i češće metastazira u odnosu na ostale tipove (113,119,123,124,125). Prisustvo mikropapilarne komponente u primarnom tumoru, bez obzira na procentualnu zastupljenost, predstavlja prediktor agresivnog kliničkog ponašanja i udruženo je sa lošom prognozom stoga je potreban oprezan klinički tretman i praćenje takvih bolesnika (125,126). Petogodišnje preživljavanje je manje od 50%, a srednje vreme preživljavanja 41,6 meseci (114).

1.6.2.3.5. Solidno predominantni tip

Solidno predominantni tip adenokarcinoma sa produkcijom mucina grade poligonalne tumorske ćelije arazirane u solidne plaže, slabo podseća na druge tipove adenokarcinoma stoga diferencijalno dijagnostički problem može da predstavlja odvajanje ovog tipa od kruponoćelijskog i skvamoznog karcinoma (Slika 10.) (100,107,118,120).



Slika 10. Solidno predominantni tip, H&E,100x.

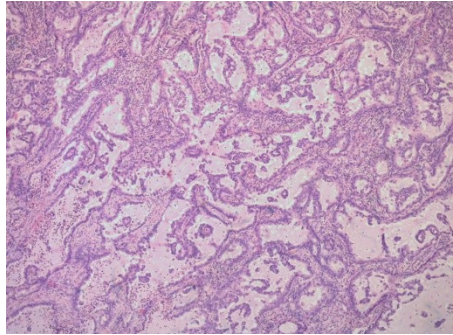
Prisustvo solidno predominantnog tipa je varijabilno (u rasponu od 12,38% do 50%) (87,106,120). Prosečne veličine je oko 5 cm. Limfovaskularna i pleuralna invazija, nekroza i metastaze su češće u odnosu na ostale tipove. Iako može da se nađe u svim stadijumima bolesti u I stadijumu je redak kada pokazuje i nižu TTF-1 ekspresiju (107,110,113,119). Petogodišnje preživljavanje bolesnika sa solidno predominantnim tipom adenokarcinoma je 74,2% (120).

1.6.2.4. Varijante invazivnog adenokarcinoma

1.6.2.4.1. Invazivni mucinozni adenokarcinom

Mucinozni adenokarcinom raste u vidu nejasno ograničenog čvora želatinoznog izgleda bez centralne fibroze, antrakotične pigmentacije ili uvlačenja pleure. Neki od ovih tumora rastu u vidu diseminiranih čvorova ili pokazuju difuznu konsolidaciju plućnog parenhima koja podseća na lobarnu pneumoniju (100).

Invazivni mucinozni adenokarcinom je redak (113). Tumorske ćelije su peharaste ili cilindrične, blago atipične sa obilnim intracitoplazmatskim mucinom koji se može naći i u alveolarnim prostorima (Slika 11.).



Slika 11. Mucinozni tip adenokarcinoma, H&E,200x.

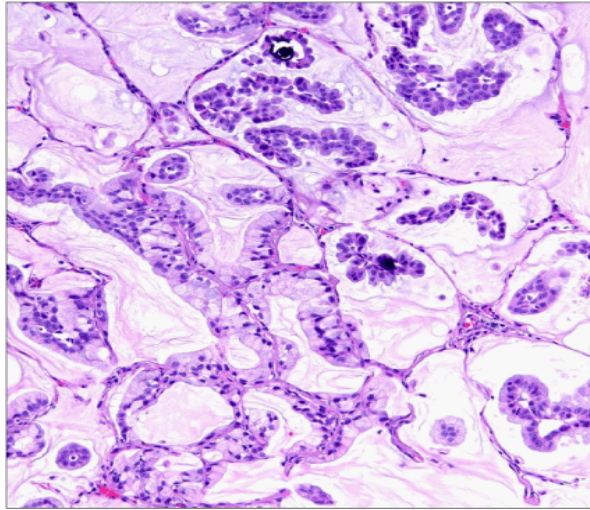
Ovi tumori pokazuju mešavinu lepidičnog, acinarnog, papilarnog, mikropapilarnog i solidnog tipa rasta. Kada je prisutna stromalna invazija količina mucina je manja, a atipija veća (100).

Invazivni mucinozni adenokarcinom se razlikuje od AIS i MIA sa mucinoznim izgledom na osnovu jednog ili više kriterijuma:

- a) tumor je veći od 3 cm,
- b) područje invazije je veće od 5 mm,
- c) tumor raste u vidu multiplih i nejasno ograničenih nodusa (100).

1.6.2.4.2. Koloidni adenokarcinom

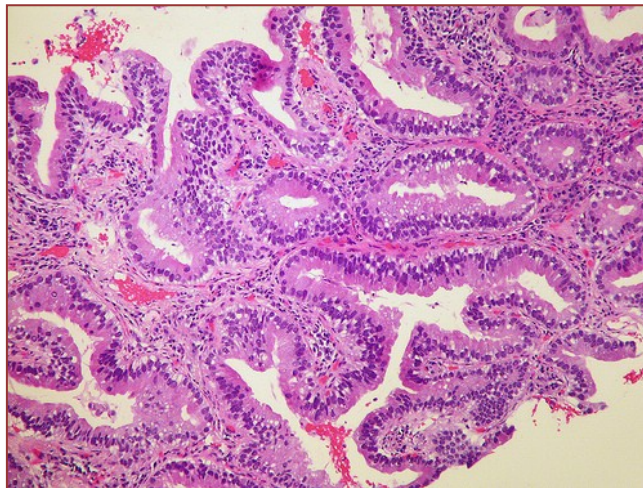
Koloidni adenokarcinom najčešće raste u vidu jasno ograničenog perifernog čvora ili mase, meke je konzistencije, na preseku želatinoznog izgleda i često citično izmenjen. Histološki se u koloidnom adenokarcinomu nalaze jezera ekstracelularnog mucina koja šire alveolarne prostore, kidaju alveolarne pregrade i sadrže klastere minimalno atipičnih mukoprodukujućih tumorskih ćelija često peharastog izgleda (Slika 12.). Tumor se klasifikuje kao koloidni adenokarcinom kada je ova komponenta dominantna. Ranije dijagnostikovao mucinozni cistadenokarcinom je ekstremno redak, danas je poznat kao koloidni adenokarcinom sa cističnim promenama. Ciste su ispunjene koloidom, oivičene peharastim ili kubičnim mukoprodukujućim ćelijama, a u zidu cisti se nalazi infiltrat histiocita i reakcija tipa oko stranog tela (88,94).



Slika 12. Koloidni adenokarcinom, H&E,200x.

1.6.2.4.3. Fetalni adenokarcinom

Fetalni tip adenokarcinom pluća raste u vidu jasno ograničenog, neinkapsulisanog čvora ili mase. Na preseku je beličasto-braonkast, delom cističan sa područjima krvarenja. Histološki je sagrađen od adenoidno aranžiranih necilijarnih i glikogenom bogatih ćelija uklopljenih u fibromiksoidnu stromu te podseća na fetalna pluća (Slika 13.). S obzirom na jedarnu atipiju, prisustvo skvamoznih morula i drugih tipova adenokarcinoma, količinu nekroze i strome kao i imunofenotip fetalni adenokarcinom je podeljen na dobro i loše diferentovani tip (93,100).

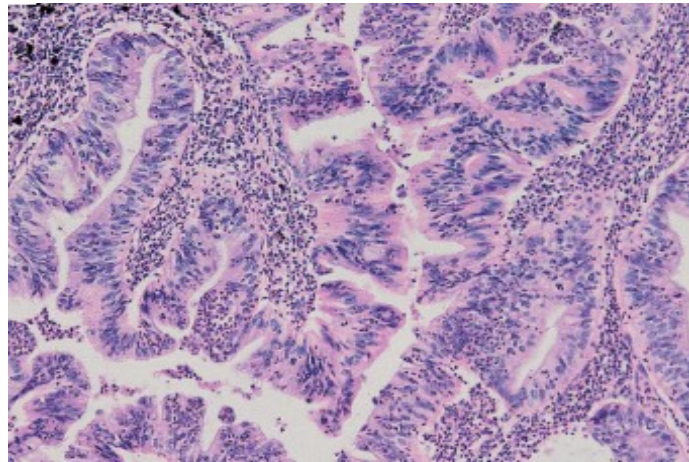


Slika 13. Fetalni adenokarcinom pluća H&E 200x.

1.6.2.4.4. Adenokarcinom sa crevnom (enteričnom) diferencijacijom

Adenokarcinom pluća sa crevnom (enteričnom) diferencijacijom raste u vidu jasno ograničenog periferno lokalizovanog sivkasto-beličastog čvora ili mase sa fokusima žučkaste

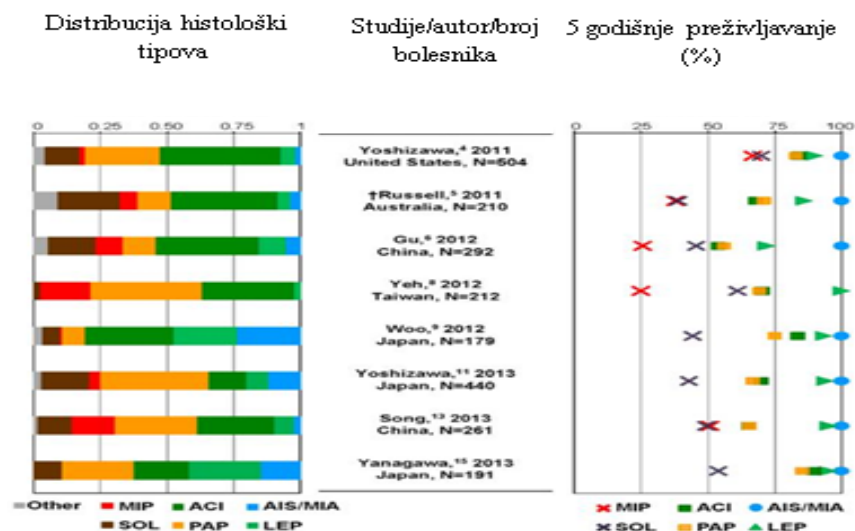
nekroze. Histološki podseća na adenokarcinom kolorektuma sagrađen od adenoidno, tubularno, papilarno i kribriformno aranžiranih visokih cilindričnih ćelija pseudostratifikovanih vezikularnih jedara i eozinofilne citoplazme sa područjima geografskih ili tačkastih nekroza (Slika 14.). Ukoliko je tumor heterogen sa enteričnim izgledom u $\geq 50\%$ reč je o primarnom plućnom adenokarcinomu sa enteričnom diferencijacijom. Kako neki od ovih tumora pored enterične morfologije imaju enterični imunofenotip (pozitivan CDX i CK20, a negativan CK7) dijagnostikuje se tek nakon što je klinički isključeno postojanje primarnog enteričnog tumora u gastrointestinalnom traktu (100).



Slika 14. Enterični tip adenokarcinoma.

1.6.2.5. Prognostički značaj IASLC/ATS/ERS klasifikacije invazivnog adenokarcinoma pluća

Različiti histomorfološki parametri uočeni u pojedinim tipovima adenokarcinoma pluća mogu da pruže dodatne prognostičke informacije. Imajući u vidu da funkcionalni fenotipovi održavaju osnovni genotip korišćenje histomorfoloških parametara kao pokazatelja prognoze bolesti je atraktivno jer je njihovo određivanje brzo, jeftino i određuje se u momentu postavljanja dijagnoze dok je određivanje molekularnog profila trenutno skupo i u mnogim sredinama nedostupno (103). S obzirom na prognozu bolesti adenokarcinom pluća je podeljen u tri grupe. AIS, MIA i lepidično predominantni tip su svrstani grupu sa dobrom prognozom; acinarno i papilarno predominantni tip u grupu sa intermedijernim kliničkim ponašanjem dok mikropapilarno i solidno predominantni tip, te posebno izdvojeni koloidni i mucinozni adenokarcinom imaju lošu prognozu (100,103,108).



Grafikon 1. Prognostički značaj predominantnih tipova invazivnog adenokarcinoma pluća. (Preuzeto: Eguchi T, Kadota K, Park BJ, Travis W, Adusumilli P. Lung adenocarcinoma classification: what the surgeon should know. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2014 Autumn;26(3):210-22).

1.7. MORFOLOŠKA DIJAGNOSTIKA ADENOKARCINOMA PLUĆA

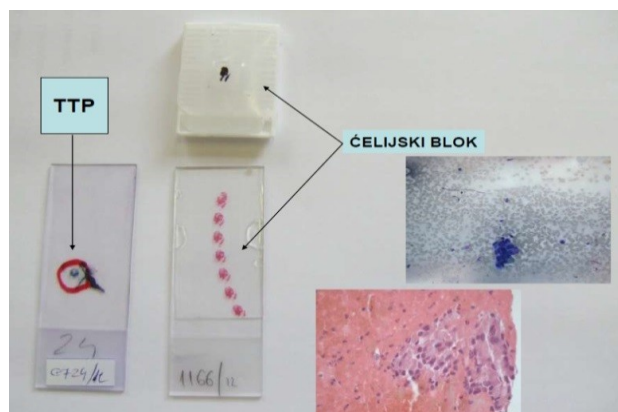
I pored načno-tehnološkog napretka pre svega u oblasti radiologije i bronhoskopije dijagnoza adenokarcinoma je i dalje morfološka (citološka i patohistološka) (Grafikon 2.).

| Patohistološki uzorci | Citološki uzorci |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Biopsijski uzorci (bronhobiopsija, transbronhijalna biopsija, biopsija pleure, otvorena biopsija (VMS/VATS), perkutana transtorakalna biopsija). • Uzorci dobijeni hirurškom resekcijom ("wedge", segmentektomija, lobektomija, bilobektomija i pneumonektomija) | <ul style="list-style-type: none"> •Esfolijativni citološki uzorci (sputum, aspirat bronha, bris bronha dobijen bronhijalnim četkanjem, bronhoalveolarna lavaža) •Aspiracioni citološki uzorci (pleuralni izliv, perikardijalni izliv, perkutani transtorakalni punktati, punktati uvećanih limfnih čvorova, punktati subkutanij i udaljenih metastaza (jetra, nadbubreg i dr.), transbronhijalni punktati, transtrahealni punktati, transtorakalna punkcija). |

Grafikon 2. Vrste dijagnostičkih uzoraka u plućnoj onkologiji.

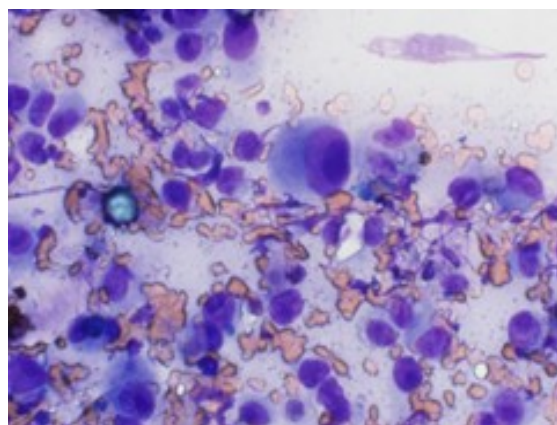
1.7.1. Citološka dijagnoza adenokarcinoma

Citološka analiza je: jednostavna, laka, brza, jeftina, minimalno invazivna i za pacijenta najmanje bolna dijagnostička procedura koja može da se izvodi i u ambulantnim uslovima. Citološki uzorak se priprema kao ćelijski razmaz ili parafinski ćelijski blok (Slika 15.) (127, 128,129,130,131).



Slika 15. Citološki uzorci.

U skladu sa činjenicom da je histološka slika adenokarcinoma pluća heterogena i njegov citološki izgled je varijabilan. Žlezdanu morfologiju mogu da predstavljaju cilindrične ćelije sa centralnim lumenom, ravne plaže izgleda pčelinjeg saća, trodimenzionalne loptaste nakupine ćelija, razgranate grupe sa ravnim luminalnim granicama, pseudopapilarni agregati ili prave papile sa centralnim fibrovaskularnim jezgrom. Citoplazma je većinom bazofilna, homogena, providna, granularna ili penušava sa prisutnim vakuolama koje potiskuju jedro ka periferiji te ćelija poprima izgled prstena pečatnjaka. Jedra su okrugla ili ovalna, ekscentrično postavljena i jedarne membrane su jasno definisane. Hromatin je fino granuliran i dispergovan kod dobro diferentovanih tumora, a grub kod srednje i loše diferentovanih tumora. Većina tumorskih ćelija ima prominentne i acidofilne makronukleoluse (Slika 16.) (93,127,129,132).



Slika 16. Ćelije adenokarcinoma, MGG, 400x.

U respiratornoj citologiji postoje brojne zamke i stanja koja oponašaju maligne procese te je potreban poseban oprez kod akutno obolelih bez radiološki evidentnog nodusa ili mase, kod bolesnika koji su prethodno primali terapiju ili su bili podvrgnuti drugom invazivnom dijagnostičkom postupku (133, 134).

1.7.2. Imunohistohemijaska dijagnoza adenokarcinoma

U velikom broju slučajeva moguće je razlikovati adenokarcinom od drugih histoloških tipova karcinoma pluća samo na osnovu standardnih morfoloških kriterijuma bojenjem sa hematoksilinom i eozinom (H&E). Diferencijacija je otežana kod: slabo diferentovanih tumora gde su glavna obeležja suptilna, malih uzoraka u kojima je morfološka diferencijacija slabije izražena zbog oskudne celularnosti, kraš artefakata ili disperzije ćelija. Uvek treba imati na umu da se oko 70% nemikrocelularnih karcinoma pluća u momentu postavljanja dijagnoze nalazi u neresektabilnoj fazi bolesti, te da analizirani uzorak predstavlja jedini materijal u kome se bolest dijagnostikuje, obavlja molekularno testiranje i na osnovu koga se određuje terapija (135).

Imunohistohemijski profil adenokarcinoma zavisi od histološkog tipa i stepena diferencijacije tumora (132). U razlikovanju loše diferentovanog adenokarcinoma od skvamoznog karcinoma koriste se: citokeratini (CK5/6 i CK7), *Thyroid Transcription Factor* (TTF-1), napsin A, p63 i p40 (135,136,137). Za razliku od skvamoznog karcinoma koji pokazuje homogen imunoprofil adenokarcinom pokazuje značajnu imunoheterogenost (135).

1.7.2.1. TTF-1

TTF-1 enkodira NKX2-1gen i ima važnu ulogu u morfogenezi pluća. Imunohistohemijski se detektuje u jedrima bronhiolarnog epitela, a kod odraslih dodatno eksprimira pneumocite tipa 2 i *Clara* ćelije. U visokom procentu TTF-1 se eksprimira i u adenokarcinomu pluća (106,138,139). Nivo ekspresije je veći kod tumora manjih dimenzija sa nižim mitotskim indeksom i boljom diferencijacijom. TTF-1 ima i prognostički značaj, TTF-1 negativni adenokarcinomi pokazuju lošiju prognozu, češće recidiviraju i imaju kraće vreme preživljavanja u odnosu na TTF1 pozitivne tumore (11,8 vs 27,4 meseci, $p=.001$) (140). EGFR mutacije su češće kod TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma (141,142,143). Kako su EGFR mutacije detektovane i kod bolesnika sa TTF-1 negativnim adenokarcinomom pluća TTF-1 negativnost ne treba da bude kriterijum za njihovo isključivanje iz EGFR molekularnog testiranja (140,142). Rezultat imunohistohemijske ekspresije treba da bude sastavni deo izveštaja patologa što bi doprinelo boljoj selekciji pacijenata u grupu sa visokim rizikom (106,138).

1.7.2.2. Drugi imunohistohemijski markeri

Pored TTF-1 i drugi imunohistohemijski markeri imaju prognostički značaj (137). Odsustvo ekspresije napsina A u hirurški reseciranom adenokarcinomu pluća je pokazatelj loše

prognoze bolesti (136). Timidin kinaza 1 (TK1) pozitivnost je veća kod bolesnika sa limfogenim metastazama i uznapredovalim stadijumom bolesti (144). Kod bolesnika sa pozitivnim Ki 67 nakon videoasistirane segmentektomije treba razmotriti primenu adjuvantne hemioterapije ili lobektomiju (145). Protein ekstracelularnog matriksa Laminin 5 ima ključnu ulogu u: interćelijskoj adheziji, ćelijskoj migraciji i tumorskoj invaziji. Njegova povećana ekspresija Laminina 5 može da bude udružena sa invazijom limfovaskularnih prostora i pleure i da ukaže na lošu prognozu bolesti (120).

Tumori različitih anatomskih lokalizacija često metastaziraju u pluća. Primena imunohistohemije ima važnu, ali ne i presudnu, ulogu u određivanju lokalizacije primarnog tumora. Metastatski adenokarcinom ima tendenciju da je više homogen u odnosu na primarni adenokarcinom pluća. U određivanju porekla primarnog tumora koriste se brojni imunohistohemijski markeri od kojih su najčešće u upotrebi: tireoglobulin (štitna žlezda), CK20 i CDX-2 (debelo crevo), estrogen, progesteron i mamaglobin (dojka), kalretinin (mezoteliom) (132,146). Treba imati na umu da ne postoje savršeni markeri i da je neophodna korelaciji patohistološkog nalaza sa kliničkom slikom bolesnika (135,147).

1.8.KARCINOGENEZA

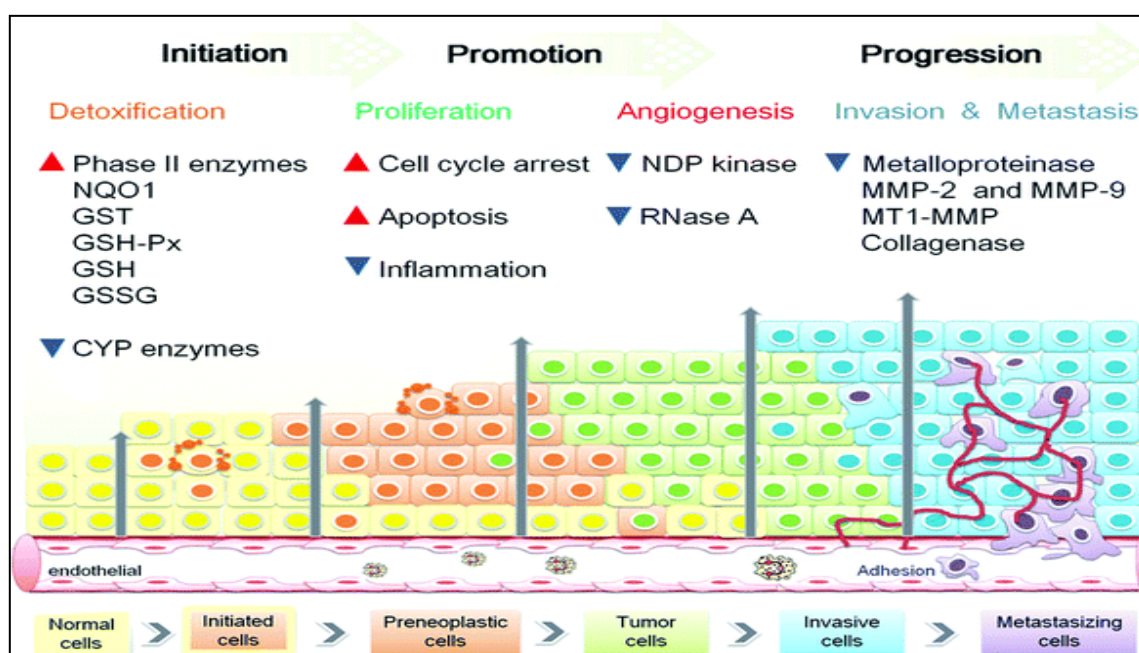
O karcinogenezi su tokom vremena postojale različite hipoteze i teorije. Boveri je 1929. godine tvrdio da osnovu karcinogeneze čine hromozomske promene i tačkaste mutacije gena koje dovode do nekontrolisane proliferacije ćelija. Zahvaljujući napretku u sferi molekularne biologije i genetike unapređena su saznanja o karcinogenezi i otvorene nove mogućnosti u dijagnostici, terapiji i ranom otkrivanju malignih tumora. Tumorske ćelije su genetski nestabilne, sklone genetskim oštećenjima u toku replikacije, pokazuju autonomnu sposobnost proliferacije i smanjenu osetljivost na inhibitore rasta, izbegavaju programiranu ćelijsku smrt, imaju neograničenu sposobnost replikacije, angiogena aktivnost je povećana, poseduju invazivni i metastatski potencijal. U početnoj fazi nastanka tumora sve ćelije su jednake-monoklonalne. Danas se zna da su maligni tumori bolesti gena koje su klinički vidljive za pet do 10 godina.

Razvoj malignog tumora se odvija kroz faze:

- 1) inicijacija,
- 3) promocija,
- 4) progresija,

5) metastaziranje.

Tumorska progresija je proces razvoja tumora od preneoplastičnih, displastičnih, mikroinvazivnih promena do pojave invazivnog tumora. Pored kinetike rasta tumora, na progresiju utiče i tumorska vaskularizacija. Nova kapilarna mreža se razvija od strane okolnog tkiva domaćina, raste prema tumoru čiji rast ubrzava. Proces metastaziranja je dinamičan, odvija se kroz niz događaja: lokalna invazija, ulazak u vaskularne ili limfne sudove, zaustavljanje u ciljanim tkivima i rast metastatskih depozita (Slika 17.) (28,148,149,150).



Slika 17. Faze razvoja malignog tumora. (Preuzeto Pan MH, Chiou YS, Wang YJ, Ho CT, Lin JK. Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. Food Funct. 2011 Feb;2(2):101-10.

Otkriće proto-onkogeni i njihove sposobnosti da se pretvore u onkogene koji dovode do nastanka malignog tumora predstavlja trijumf molekularne biologije za koji su *J. Michael Bishop* i *Harold Varmus* dobili Nobelovu nagradu 1989. godine. Dominantni proto-onkogeni stimulišu ćelijski rast i diferencijaciju. Recesivni antionkogeni, nazvani tumor supresorski geni, suprimiraju stimulatorne aktivnosti (29,150). Svaki gen koji učestvuje u regulaciji procesa proliferacije i diferencijacije ćelija može da bude mutiran, odnosno proto-onkogen može da se promeni u onkogen (151).

Mehanizmi pomoću kojih se proto-onkogeni pretvaraju u onkogene su:

- tačkaste mutacije koje deluju na područje presudno za vezivanje i hidrolizu GTP,

- b) hromozomske translokacije koje imaju za posledicu prejako izražavanje proto-onkogeni i dovode do promene u građi gena,
- c) povećanje broja gena - umnožavanje i mnogostuko povećanje DNK nizova, dovodi do prejake izraženosti njihovih proizvoda proto-onkogeni (28).

U rast karcinoma pluća uključene su četiri klase onkogeni:

- a) geni koji podstiču rast tumora-onkogeni,
- b) geni koji zaustavljaju rast tumora poznati kao tumor supresorski geni-antionkogeni,
- c) geni koji upravljaju apoptozom,
- d) geni koji popravljaju greške u DNK (28,150,152).

1.8.1. Proto-onkogeni

Proto-onkogeni enkodiraju proteine koji su uključeni u prenos signala rasta i deluju kao geni kontrolori. Transformacija proto-onkogeni u onkogene je odgovorna za poremećaj kontrole rasta. Faktori rasta (FR) utiču na: proliferaciju ćelija, indukuju ćelijsku pokretljivost, doprinose diseminaciji tumorskih ćelija i nastanku metastaza stoga mogu da budu potencijalne mete terapijskog delovanja. Prvi FR (eritropoetin) je otkriven pre više od jednog veka (149).

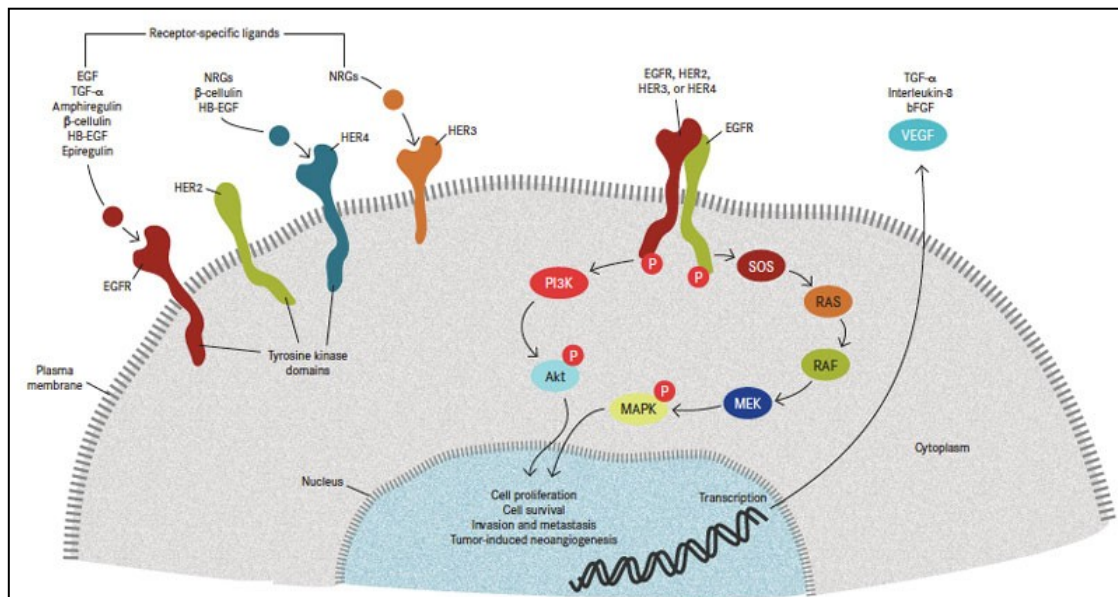
1.8.1.1. Epidermalni faktor rasta

Stanley Cohen je, iz ekstrakta pljuvačne žlezde, kojim je tretirao populaciju miševa, izolovao supstancu odgovornu za ubranu proliferaciju mišijeg epidermalnog epitela i epitela rožnjače. *Cohen* je novootkrivenu supstancu nazvao epidermalni faktor rasta (*Epidermal Growth Factor-EGF*) i za svoj pionirski rad sa *Ritom Levi-Montalcini* podelio je Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 1986. godine (153,154). EGF porodicu čine slični polipeptidi: EGF, transformišući faktor rasta- α (TGF- α), neuregulin, amfiregulin, epiregulin i β -celulin. EGF je protein, izgrađen od 53 aminokiseline, čija masa iznosi 6045 Da i koji poseduje 3 intramolekulske disulfidne veze (155). U drugoj polovini XX veka detektabilni nivoi EGF su pronađeni u ekstraktima tkiva i telesnim tečnostima (amnionska tečnost, mleko, pljuvačka, pankreasni, želudačni i duodenalni sokovi, žuč i urin) (156).

1.8.1.1.1. Receptor epidermalnog faktora rasta

Stanley Cohen je i prvi opisao strukturu i funkciju receptora epidermalnog faktora rasta krajem XX veka (157). Receptor epidermalnog faktora rasta (*Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR odnosno ErbB1/HER1*) pripada porodici receptora protein-tirozin kinaze,

kojoj pripadaju i ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4 članovi. Receptori ove porodice imaju sličnu građu: ekstracelularni, ligand vezujući domen, hidrofobni transmembranski region i citosolni, tirozin-kinazni domen (155,158,159) (Slika 18.).



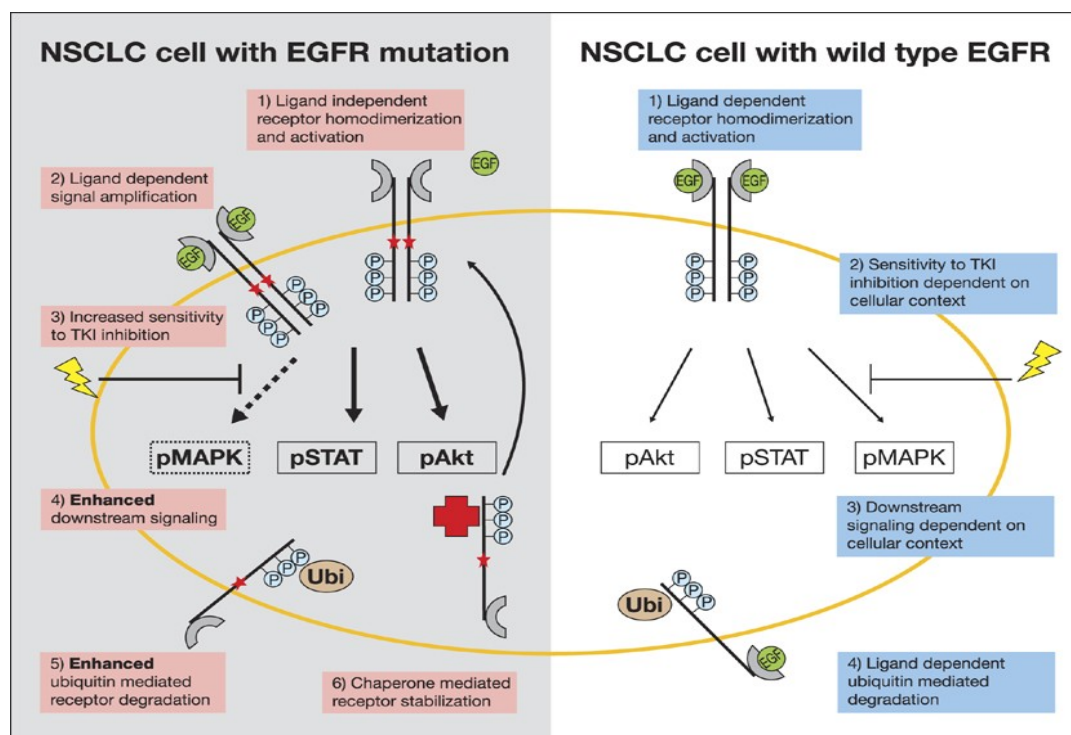
Slika 18. Porodica receptora tirozin kinaze. (Preuzeto: Oncogenic Signaling of the EGFR: Familiar Target Faces New Questions. Available from: <http://global.onclive.com/publications/Oncology-live/2011/september-2011/Oncogenic-Signaling-of-the-EGFR-Familiar-Target-Faces-New-Questions#sthash.JpeqTfu5.dpuf>).

EGFR je 170 kDa monomer koji spada u grupu tip I membranskih receptora, sastoji se od polipeptidnog lanca sa 1186 aminokiselinskih ostataka i N-vezujućih oligosaharida. Gen za EGFR se nalazi na hromozomu 7p12. Ekstracelularni deo ima visok afinitet za vezivanje EGF, ali i drugih članova EGF porodice, pre svega za amfiregulin i TGF- α . Ekstracelularni domen EGFR poseduje četiri dela. Delovi I i III su bogati leucinom i učestvuju u vezivanju liganda, delovi II i IV sadrže brojne rezidue cisteina koji učestvuju u izgradnji disulfidnih veza i u stvaranju dimera receptora (158,159,160,161,162,163,164).

, invazijom, inhibicijom apoptoze, tumorskom angienezom i metastatskim širenjem, stoga ima važnu ulogu u karcinogenezi i tumorskoj progresiji. Kada se uspostavi ligand-receptor vez

, što rezultira u visokom afinitetu vezivanja liganda (158).

Nakon vezivanja liganda EGFR može da formira homodimere sa drugim EGFR ili heterodimere sa drugim članom ErbB porodice (ErbB2, ErbB3 ili ErbB4), ali i da deluje kao signalni partner sa receptorima koji ne pripadaju ErbB porodici, pri čemu treba naglasiti da je heterodimerizacija snažniji aktivator nishodne signalne kaskade. Homodimerizacija i heterodimerizacija dovode do aktiviranja citoplazmatskog domena, sa posledičnom autofosforilacijom tirozinskih rezidua [uz pomoć adenozin trifosfata-(ATP)] unutar ćelije. Fosfotirozinske rezidue aktiviraju brojne nishodne signalne puteve: Ras/Raf/mitogen-aktivirajuća protein kinaza (MAPK), fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K/Akt/mTOR) i put signalnog prenosa i aktivatora transkripcije (STAT). Povećan broj genskih kopija EGFR gena (tzv. amplifikacija), povećana EGF sinteza i ekspresija EGFR receptora (*over*-ekspresija) i/ili mutacije u domenu EGFR gena dovode do poremećaja ćelijske homeostaze, pojave malignih, inflamatornih i autoimunih oboljenja (160,161,162,163,165,166) (Slika 19.).



Slika 19. Signalni putevi EGFR. (Preuzeto: Irmer D, Funk JO, Blaukat A. EGFR kinase domain mutations-functional impact and relevance for lung cancer therapy. Oncogene. 2007 Aug 23;26(39):5693-701).

1.8.1.1.2. EGFR mutacije

Prekomerna ekspresija EGFR kod nemikrocelularnog karcinoma pluća (NSCLC) je otkrivena krajem XX veka. Prognostički značaj EGFR mutacija u hirurški lečenim NSCLC je predmet rasprava i suprotstavljenih stavova. Sumirana analiza 18 publikovanih studija 2 972 pacijenata sa NSCLC pokazuje da prekomerna ekspresija EGFR nema značaja u preživljavanju

(167,168). Nasuprot navedenom, drugi autori pokazuju da prisustvo EGFR mutacija znači i duže vreme preživljavanja kod bolesnika sa hirurški lečenim NSCLC (169).

EGFR mutacije se detektuju u uzrastu od 19 do 85 godina, prosečna starost bolesnika sa mutiranim adenokarcinomom je između 55 i 65 godina, s tim da su muškarci neznatno stariji u odnosu na žene (170,171,172,173). EGFR mutacije su retke u mlađoj populaciji. *Ye* je u grupi mlađih od 40 godina detektovao EGFR mutacije kod 19/87 (21,8%) bolesnika (174). EGFR mutacije su češće kod žena, a bez obzira na etničku pripadnost i u kategoriji nepušača (u rasponu od 43% do 80%) (170,172,174,175,176,177).

U odnosu na ostale histološke tipove karcinoma pluća EGFR mutacije su češće u adenokarcinomu. Takav stav podržava i meta analiza u kojoj su EGFR mutacije zabeležene kod 1238/2468 (50,2%) obolelih od adenokarcinoma u odnosu na obolele od drugih nemikrocelularnih karcinoma pluća (226/1333; 17,0%) (172). EGFR mutacije su nađene u visokom procentu i u mucinoznom adenokarcinomu (30,4%) dok su u mukoeplidernom karcinomu, krupnoćelijskom karcinomu sa neuroendokrinom diferencijacijom i krupnoćelijskom karcinomu retke, a u karcinoidu nisu detektovane (175,178,179,180).

Podaci o povezanosti EGFR mutacija i stadijuma bolesti su kontradiktorni. Iako prema *Hongu i Liangu* ne postoji povezanost između učestalosti EGFR mutacija i stadijuma bolesti drugi autori pokazuju da su EGFR mutacija frekventnije u stadijumima II/III/IV u odnosu na stadijum I (171,173,181). Ekspresija TTF-1 u adenokarcinomu pluća je prema *Somaiah* prediktor prisustva EGFR mutacija, odnosno TTF-1 negativni adenokarcinomi su u većini slučajeva negativni na prisustvo EGFR mutacija (140). Neslaganja u mutacionom statusu primarnog i metastatskog tumora, između odvojenih primarnih tumora su retka. Smatra se da su ove diskrepance najverovatnije posledica lažno negativnih nalaza. Klinički značaj ovih neslaganja nije dovoljno ispitan (182).

Činjenica da su neke od EGFR mutacija udružene sa porodičnom istorijom karcinoma pluća trebala bi da predstavlja osnovu za buduća genetska savetovanja i skrining programe u rizičnoj populaciji (174,183).

1.8.1.1.3. Tipovi EGFR mutacija

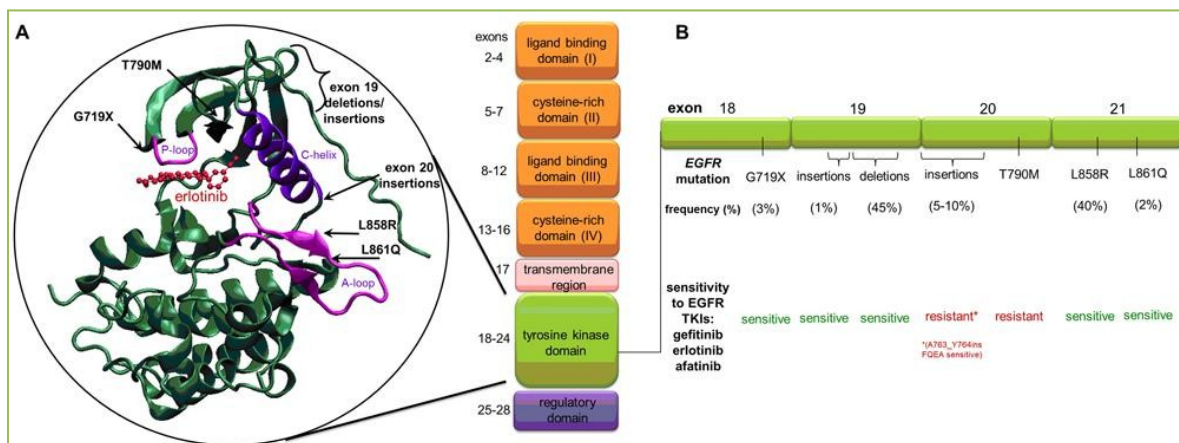
Aktivirane mutacije su heterozigotne, somatske i odvijaju se oko katalitičkog tirozin kinaza domena (181).

Mutacije u domenu *EGFR* gena se dele u tri klase:

Klasa I: delecije na egzonu 19 čine 44% od svih EGFR mutacija, dovode do gubitka aminokiselinske sekvence od leucina na poziciji 747 do glutaminske kiseline na poziciji 749.

Klasa II: supstitucije nukleotida tzv. tačkaste mutacije. Najznačajnija među njima je supstitucija na egzonu 21 na kodonu 858 (L858R) i čini 41% svih EGFR mutacija, dovodi do supstitucije arginina za leucin. Ovoj klasi mutacija pripada i supstitucija na egzonu 18 na kodonu 719 (G719X) kojoj pripada oko 4% svih EGFR mutacija i dolazi do zamene glicina serinom, alaninom ili cisteinom. Ostale tačkaste mutacije čine sa oko 6% svih EGFR mutacija.

Klasa III: duplikacije i insercije na egzonu 20, čine oko 5% svih EGFR mutacija, s tim da insercije na egzonu 20 mogu da budu razlog rezistencije na tirozin kinaza inhibitore (TKIs) (117) (Slika 20.).

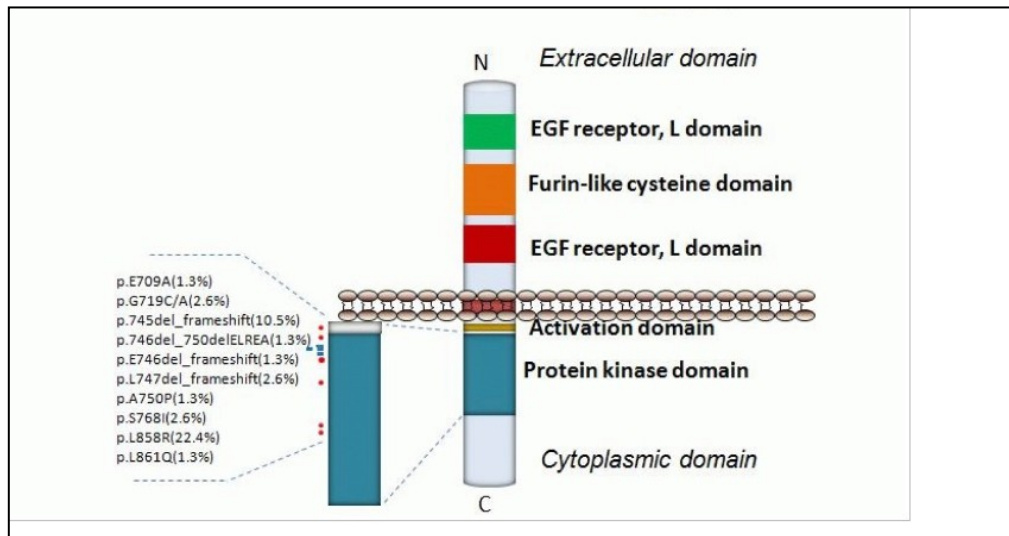


Slika 20. Frekvencija EGFR mutacije u karcinomu pluća. (Preuzeto: Kobayashi J, Costa DB. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. Braz J Med Biol Res. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144099>).

Delecije u egzonu 19 i L858R jesu najvažnije “pokretačke” tzv. aktivirajuće (*driver*) mutacije i najčešće EGFR mutacije (162). One čine ukupno oko 85% svih EGFR mutacija (170,171). Slične rezultate pokazuje studija *Lianga* u kojoj su mutacije detektovane kod 85/133 (63, 9%) od toga delecije na egzonu 19 i L858R mutacije na egzonu 21 kod 74/85 (90%). Ređe mutacije su: G719X mutacije na egzonu 18 (n=2); delecije na egzonu 19 (n=39); insercije na egzonu 20 (n=4); S768I mutacije na egzonu 20 (n=3); L861Q mutacije na egzonu 21 i T790M (n=1) (181).

Rutinski EGFR testovi za identifikaciju delecija na egzonu 19 treba da detektuju ne samo najčešće 15-bp i 18-bp delecije, retke 9-, 12-, 24-bp delecije, ali i neobične 15-bp i 18-bp insercije (184). *Missence* mutacije su retke, najčešće su vezane za egzon 21. *Cai* je *missense*

mutacije detektovao na: egzonu 21 (50,0%), egzonu 18 (8,3%), egzonu 20 (5,6%) i egzonu 19 (2,8%) (Slika 21.) (176,185).



Slika 21. Distribucija *missence* mutacija. (Preuzeto Cai D, Li H, Wang R, Li Y, Pan Y, Hu H, et al. Comparison of clinical features, molecular alterations, and prognosis in morphological subgroups of lung invasive mucinous adenocarcinoma. *OncoTargets Ther.* 2014 Nov 18;7:2127-32).

Duple ili multiple EGFR mutacije su retke. Prisutne su kod manje od 5% svih mutiranih adenokarcinoma. *Wang* je u meta analizi zabeležio duple i multiple mutacije kod kod 2,9% mutiranih adenokarcinoma, najčešće na egzonu 19 i 21 (172). Za razliku od osetljivih G719X delecija na egzonu 19 (1, 1%), L858R (278; 28,3%) i L861Q (7; 0,7%) mutacija, mutacije S768I (2; 0,2%) i insercije na egzonu 20 (31; 3,2%) su rezistentne mutacije i udružene su sa slabim odgovorom na primenu TKIs (123,186,187). Od svih EGFR mutacija tačkaste T790M mutacije su najčešće udružene sa porodičnom istorijom karcinoma pluća (183).

1.8.1.1.4. Povezanost EGFR mutacija sa tipovima adenokarcinoma

Postoje neslaganja u pogledu postojanja veze između frekvencije EGFR mutacija i predominantnog tipa invazivnog adenokarcinoma. Prema grupi autora EGFR mutacije su češće u lepidično, papilarno i acinarno predominantnom tipu nego u solidno predominantnom tipu (170,171,188,189,190). Suprotno navedenom, druge studije pokazuju najveću frekvencu EGFR mutacija u mikropapilarno predominantnom tipu (171,191,192).

Uočen različit odnos između EGFR mutacionog statusa i predominantnog histološkog tipa može da bude posledica etničkih razlika među obolelim, ali i veličine ispitivanog uzorka (117,171).

Predominantni tip adenokarcinoma određen na osnovu kriterijuma IASLC/ATS/ERS klasifikacije je prediktor prognoze bolesti. Na osnovu ovih kriterijuma može da se vrši odabir obolelih za molekularno testiranje EGFR mutacija kao i selekcija pacijenata za primenu adjuvantne hemioterapije. Međutim, primena ove klasifikacije ne predstavlja kriterijum za isključenje pacijenata za primenu TKIs (170,171,188).

1.8.1.1.5. Selekcioni kriterijumi za EGFR molekularno testiranje

Kako kliničke karakteristike nisu dovoljno osetljive i specifične za odabir obolelih od karcinoma pluća kod kojih će biti primenjena ciljana EGFR TKIs terapija vrši se EGFR testiranje. Ovo testiranje se preporučuje kod obolelih sa dijagnostikovanim plućnim: adenokarcinomom, mešovitim-krupnoćelijskim ili loše diferentovanim karcinomom koji pokazuje imunohistohemijsku pozitivnu TTF-1ekspresiju, karcinomom koji ima histohemijski potvrđen sadržaj mucina, karcinomom u kome je odsutna i/ili prisutna slaba ekspresija p63 ili p40. U EGFR testiranje se ne uključuju oboleli sa: dijagnostikovanim čistim skvamoznim karcinomom, sitnoćelijskim karcinomom i krupnoćelijskim karcinomom odnosno karcinomi bez imunohistohemijske potvrde diferencijacije adenokarcinoma (100,170,182). Ukoliko se u uzorkovanom materijalu ne može u potpunosti isključiti komponenta adenokarcinoma, klinički kriterijumi (dob, pol i pušački status) potencijalno se mogu koristiti u odabiru pacijenata za EGFR testiranje (182).

1.8.1.1.6. Vreme izvođenja EGFR testiranja

EGFR testiranje se naručuje u momentu postavljanja dijagnoze adenokarcinoma ili karcinoma sa komponentom adenokarcinoma kod obolelih koji na osnovu TNM klasifikacije imaju proširenu bolest (stadijum IIIB i IV), u vreme recidiva ili progresije bolesti. Mada ovi oboleli imaju benefit od primene TKIs kao druge linije lečenja, oni sa EGFR mutacijama pokazuju bolje rezultate kada se ciljana terapija koristi kao prva linija lečenja. Stoga je neophodno pravovremeno molekularno testiranje, a zlatni standard (*Turnaround time* -TAT) za EGFR molekularno testiranje je pet radnih dana, maksimalno 10 dana (182).

Klinički odgovor na EGFR TKIs u EGFR mutiranim tumorima se manifestuje brzo. Neželjeni efekti u odnosu na hemioterapiju koja je bazirana na platini su ređi. Iako su neke studije pokazale da “divlji” (*wild type-wt*) EGFR ima bolji odgovor na konvencionalnu hemioterapiju, posebno kod proširene bolesti, pojedini onkolozi započinju EGFR TKIs terapiju pre nego što rezultati EGFR testiranja budu dostupni (193).

Ukoliko je citološki i/ili histološki materijal insuficijentan za molekularno testiranje neophodno je pre terapije sprovesti dodatne dijagnostičke postupke, uzorkovati novi materijal za patohistološku i/ili citološku dijagnostiku koji će zatim biti upotrebljen i za molekularno testiranje. Iako oboleli kod kojih je bolest lokalizovana imaju potencijal za hirurško lečenje i ne trebaju ciljanu terapiju njihovo testiranje je rezultat lokalne odluke (182).

1.8.1.1.7. Uzorci za EGFR testiranje

Za EGFR testiranje se koristi: sveže tkivo, brzozmrznuto tkivo, tkivo koje je nakon fiksacije u formalinu ili alkoholu ukalupljeno u parafinske blokove i citološki materijal dobijen struganjem sa staklenih pločica. Vreme fiksacije biološkog materijala je bitan momenat za uspešno molekularno testiranje. Za biopsijske uzorke dobijene bronhoskopijom vreme fiksacije iznosi od 6 do 12 sati, za materijal dobijen hirurškom resekcijom je od 8 do 18 sati. Tkivo obrađeno procesom dekalcinacije, tkivo tretirano kiselinama ili teškim metalima treba izbegavati za molekularno testiranje (182). Hirurški uzorak predstavlja optimalni izvor DNK za detekciju EGFR mutacija jer pokazuje kompletnu genomiku tumora i minimalne lažno negativne rezultate (194,195). Međutim, u dijagnostikovanju karcinoma pluća trend je sve veća primena minimalno invazivnih dijagnostičkih procedura kojima se dobija mala količina tumorskog tkiva. Dijagnostička tačnost i adekvatnost uzoraka za molekularno testiranje je različita, zavisi od dijagnostičkog modaliteta, vrste uzorka kao i od promera upotrebljenih igala (196,197). Igle većeg promera obezbeđuju celularniji uzorak i tačnije rezultate. Međutim, loše celularne uzorake ne treba isključiti iz molekularnog testiranja već primeniti visoko senzitivne molekularne testove (198). Citološki i biopsijski uzorci su kompatibilni za određivanje EGFR mutacija što potvrđuju i rezultati *Shi-a* i saradnika koji su evidentirali poklapanje mutacionog statusa kod 21/23 bolesnika (199). Iako su citološki uzorci podesni za EGFR testiranje i uporedivi sa tkivnim uzorcima, preporuka je da se izrađuju ćelijski blokovi kada je to moguće prvenstveno kada je reč o najmanje adekvatnim uzorcima kao što su oni dobijeni torakocentezom ili lavažom (182,196,197,198,200,201). Do danas ne postoji koncenzus u pogledu broja tumorskih ćelija potrebnih za EGFR i druge molekularne analize. Prema *Travisu* i saradnicima preporuka za EGFR testiranje je minimum 200 do 400 tumorskih ćelija (100).

1.8.1.1.8. Metode određivanja EGFR mutacija

1.8.1.1.8.1. Fluorescentna in situ hibridizacija

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je visoko specifična i senzitivna metoda čiji su rezultati dostupni za 24-48 sata. Zasniva se na hibridizaciji odgovarajuće sekvence gena ispitivanog hromozoma i odgovarajućeg broja nukleotida vezanih za fluorescentni marker. FISH metoda se sastoji iz dva dela: denaturacije proteina visokom temperaturom, pri čemu dolazi do razdvajanja dvostrukih lanaca DNK analiziranih hromozoma i hibridizacije, odnosno vezivanja probe za odgovarajući segment hromozoma koji „označava“ traženu genetsku aberaciju (202,203).

FISH metodom mogu da se otkriju: numeričke i strukturne promene na hromozomima, identifikuju genetske promene, urade genska mapiranja i određuje broj EGFR genskih kopija u NSCLC s ciljem bolje selekcije pacijenata za primenu EGFR TKIs (204).

U FISH metodi mogu da se koriste: sveži uzorci, uzorci fiksirani u smeši metanola i sirćetne kiseline, brzo smrznuta tkiva kao i biološki materijal ukalupljen u parafinske blokove. Nedostatak ove metode jeste potreba za primenom fluorescentnog mikroskopa sa epifluorescentnim objektivima i posebnim filterima, što nije sastavni deo rutinske opreme većine laboratorija. FISH signali blede za nekoliko nedelja, a rezultati se registruju skupim digitalnim fotoaparatom (205).

1.8.1.1.8.2. Hromogena in situ hibridizacija

metodi. Koristi se za procenu: genske amplifikacije ili delecije, hromozomske aneuploidije ili hromozomske translokacije. Dobijeni signali se analiziraju u kontekstu morfologije, lako se tumače čak i kada su u pitanju tkivni uzorci iz parafinskih blokova gde su tumorske ćelije pomešane sa velikom količinom netumorskog tkiva. U detekciji genske probe u CISH metodi se umesto fluorescentne boje, koja se upotrebljava u FISH metodi, koristi peroksidaza reakcije, a rezultat mogu biti vizualizovani rutinskim svetlosnim mikroskopom (206,208).

Diskrepanca između rezultata dobijenih CISH i FISH metodom je niska. *Sholl* je saradnicima zabeležio diskrepancu od 6,5%. Ovo razmimoilaženje je posledica preklapanja jedara, gubitka tkiva i neuspelog tumačenja komponente tumora u jednom od ispitivanih slučajeva (208).

1.8.1.1.8.3. Imunohistohemijska metoda

Imunohistohemijska metoda je jednostavna i brza skrining metoda za procenu EGFR mutacionog statusa koja omogućava racionalnu primenu EGFR TKIs čime se izbegavaju nepotrebni troškovi lečenja kod EGFR negativnih pacijenata. Najčešće se koriste specifična monoklonalna antitela protiv EGFR sa E746-A750 delecijama na egzonu 19 i L8585R

tačkastim mutacijama. Mada su ova antitela relativno specifična, DNK ekstrahovana iz tkiva koje je ukalupljeno u parafin često je raščinjena i pomešana sa značajnom količinom normalnog tkiva što otežava imunohistohemijsku evaluaciju (209,210).

1.8.1.1.8.4. Lančana reakcija polimeraze

Osnovno obeležje molekula DNK je sposobnost replikacije. Ukoliko se dvostruka DNK spirala odmoti, svaki polinukleotidni lanac predstavlja kalup (matricu) za stvaranje novog, komplementarnog lanca, pri čemu se od jedne molekule DNK dobijaju dve nove, identične molekule DNK. Zahvaljujući tome, genetska informacija koju nosi DNK precizno se kopira u komplementarni lanac. Na ovom obeležju DNK baziraju se savremene metode molekularne biologije, među kojima je i lančana reakcija polimeraze (149,150,152). Lančana reakcija polimeraze (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) je metoda umnožavanja DNK kojom se, u *in vitro* uslovima, željene sekvence DNK umnožavaju (amplifikuju) u veliki broj identičnih kopija, čime je olakšana njihova detekcija i analiza eventualno izmenjenih nukleotidnih struktura za čije otkriće je *Kary Mullis* dobio Nobelovu nagradu za hemiju početkom devedestih godina prošlog veka (211).

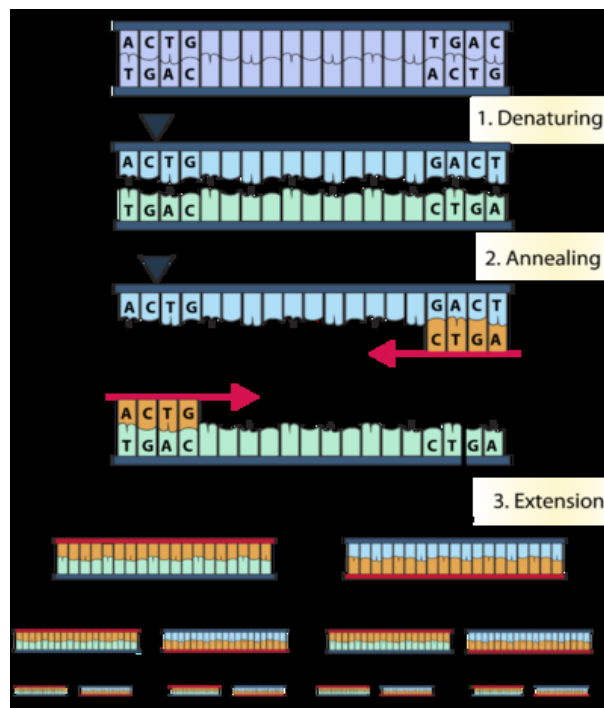
PCR metoda se primenjuje kao osnovna ili pomoćna metoda koja treba da osigura dovoljnu količinu DNK za dalje analitičke postupke, kao što su sekvenciranje, kloniranje ili hibridizacija. Prednost PCR-a nad ostalim tehnikama je u tome što zahteva minimalnu količinu polaznog materijala i omogućava amplifikaciju željenog segmenta DNK do milijardu puta. Koristi se u mnogim oblastima medicine: prenatalnoj medicini, infektivnim bolestima, forenzici i dr. Uz pomoć PCR-a moguće je analizirati DNK iz biološkog materijala čije ćelije sadrže jedro: periferna krv, epitel bukalne sluznice, amnionska tečnost, horionske resice, urin, semena tečnost, cerebrospinalna tečnost, koren dlake, krvna mrlje, pljuvačka i arhivski (citološki, histološki i autopsijski) materijal (212,213,214,215).

PCR metoda se odvija kroz tri osnovna koraka (Slika 22.):

- 1) Denaturacija dvolančane DNK matrice, pri čemu se razdvajaju sparni lanci DNK koji služe kao kalupi za amplifikaciju, izvodi se na temperaturi od 95°C i traje od 3 do 5 minuta.
- 2) Hibridizacija specifičnih oligonukleotida koji se nazivaju prajmeri (amplimeri, graničnici) i DNK matrice. Uloga prajmera je da ograniče željenu sekvencu u molekulu DNK. Kako bi se oligonukleotidni prajmeri vezali za komplementarne razdvojene lance

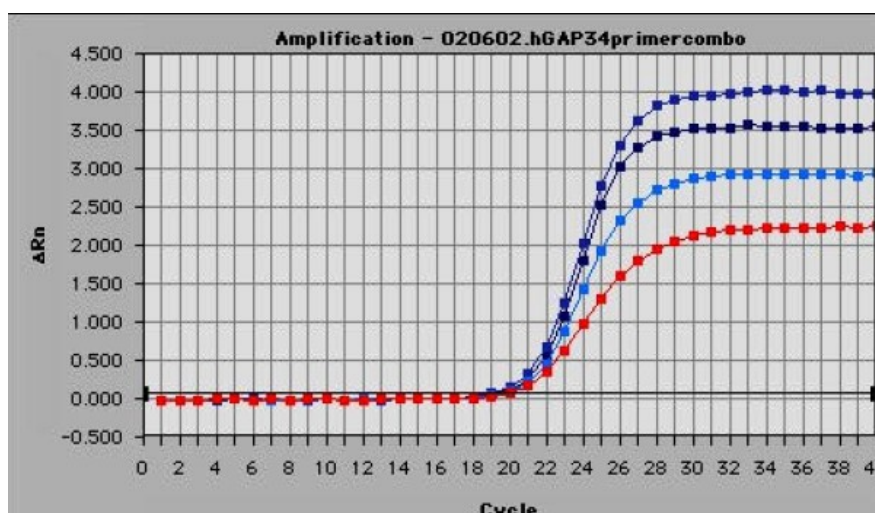
DNK matrice, odnosno za komplementarne krajeve dela DNK koji se umnožava, temperatura se snižava do 42-65°C i ova faza traje od 20 sekundi do 1 minuta.

- Ekstenzija (elongacija) prajmera se odvija na 72°C, u trajanju od 20 sekundi do 2 minuta, a to je optimalna temperatura za delovanje termostabilne *Taq*-polimeraze. Polimeraza ugrađuje nove komplementarne nukleotide sve dok ne stigne do drugog prajmera. Kako se sinteza odvija na oba lanca, u jednom ciklusu amplifikacije broj DNK molekula će biti udvostručen, a broj novonastalih molekula DNK koji sadrže ciljnu sekvencu raste eksponencijalno (215,216).



Slika 22. PCR. (Preuzeto:CK-12 Biology. Available from: <http://www.ck12.org/book/CK-12-Biology/section/8.3/>).

Opisani koraci PCR reakcije čine jedan ciklus PCR-a koji se ponavlja 20–45 puta pri čemu se željeni fragment DNK (gen ili deo gena) umnožava million do milijardu puta. Nakon 40 ponovljenih ciklusa gubi se efikasnost reakcije, odnosno nastaje “fenomen platoa” (Slika 23.) (215,217).



Slika 23. Dinamika PCR reakcije. (Preuzeto: Cikota B, Janežić A, Magić Z. Kvantifikacija ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze. *Vojnosanit Pregl.* 2002;59(5):551-6).

Za izvođenje PCR-a potreban je:

- uzorak DNK koji će da bude kalup za amplifikaciju u količini prosečno 50 do 100 nanograma;
- termostabilna DNK polimeraza, najčešće izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*;
- dva odgovarajuća sintetska jednolančana oligonukleotidna prajmera, dužine 18-20 nukleotida, sa GC sadržajem 40-75%, sa tačkom topljenja od 42 do 65° C, koncentracijom od 0,1 do 0,6 μM , bez palindromske sekvence;
- reakcijski pufer koji se koristi za održavanje odgovarajuće pH sredine u smeši;
- gradivni blokovi dezoksiribonukleotid-trifosfati (dNTP), ekvimolarni za svaki od četiri tipa nukleotida: adenin, timin, citozin i guanin (A, T, C i G). Najčešće korišćena koncentracija dNTP-a je 20-200 μM svakog nukleotida u finalnoj PCR smeši;
- joni magnezijuma - neophodni su za PCR reakciju jer se vezuju za dNTP koji se jedino u formi kompleksa sa jonima magnezijuma mogu ugraditi u rastući lanac tokom elongacije;
- voda za molekularne analize (PCR grade water).

PCR metoda se odvija u uređaju poznatom pod nazivom PCR termoblok, koji automatski i precizno kontroliše promene temperature tokom faza PCR reakcije, kao i dužinu trajanja pojedinih faza. PCR metoda može biti kvalitativna i kvantitativna.

Vrste PCR metode:

1) Umreženi (*Nested*) PCR – PCR u dva stepena;

Ukoliko je dostupna vrlo mala količina DNK, može se desiti da rezultat PCR metode nije moguće očitati. Iz tog razloga se primenjuje *nested* PCR koji se zasniva na dvostrukoj PCR metodi. Prvo se uradi klasični PCR postupak s malom količinom DNK, a potom se nastali produkt PCR reakcije koristi kao kalup za novi PCR. Reakciona smeša u obe PCR reakcije je identična, ali su u odnosu na prajmere iz prvog PCR, novi prajmeri smešteni unutar PCR produkta prve reakcije.

2) Multiplex PCR

Ova vrsta PCR metode predstavlja istovremenu analizu više segmenata istog DNK uzorka iz jedne epruvete uz primenu više parova prajmera. Metodu je otkrio *Chamberlain* 1988. god. kada je koristio šest parova prajmera i načinio multiplex amplifikaciju. Za uspešno očitavanje dovoljna je i različita dužina koja se uočava na agaroznom gelu metodom elektroforeze. Ukoliko je prisutan veliki broj amplificiranih fragmenata, koristi se označavanje prajmera različitim fluorescentnim bojama i razdvajanje PCR produkta metodom kapilarne elektroforeze ili se može dokazati metodama hibridizacije na pločicama ili na specijalno pripremljenim hibridizacijskim membranama (strip tehnologija).

3) RT-PCR (*Reverse transcription*-PCR)

Polazni genetski materijal je RNK, u kojoj se umesto timina nalazi uracil te nije moguće izvršiti amplifikaciju pomoću DNK polimeraze. Stoga se u prvom koraku PCR reakcije RNK prepisuje pomoću enzima reverzne transkriptaze u komplementarnu DNK (cDNA) koja predstavlja kalup za amplifikaciju segmenta DNK od interesa.

4) *Real-time* PCR (PCR u „realnom“ vremenu)

Ova vrsta PCR-a se zasniva na standardnom PCR s tim da poseduje i simultani sistem za detekciju PCR produkta (215).

Pristupi u detekciji PCR produkata su:

- 1) Primena hemijskog spoja (*SYBER GREEN*) koji se može ugraditi između nukleotida dvostrukog lanca novosintetisane DNK i pri tome emituje fluorescenciju. U slobodnoj formi, spoj (boja koja nije vezana za DNK) ne emituje fluorescenciju, tako da je taj efekat iskorišten za praćenje porasta fluorescencije u svakom ciklusu PCR-a, što je indirektna mera za količinu nastalog PCR produkta.
- 2) Primena prajmera obeleženih fluorescentnim spojevima, tako da se amplifikacija DNK prati preko ugradnje prajmera u PCR produkt, a zapravo se generiše porast intenziteta fluorescencije.
- 3) Primena standardnih prajmera i specijalnih proba koje su komplementarne segmentu ciljane regije DNK, a obeležene su različitim kombinacijama spojeva koji emituju svetlosnu energiju i spojeva koji blokiraju takvo delovanje. Tokom PCR reakcije, dinamika odnosa ovih spojeva se menja, tako da se kao krajnji efekt meri porast energije zračenja u obliku fluorescentne svetlosti (FRET sistem i TaqMan probe).

Nivo fluorescencije se očitava nakon svakog ciklusa, a odgovarajući program omogućava praćenje tih vrednosti na monitoru računara (praćenje reakcije u realnom vremenu). U početku PCR reakcije, kriva odnosa intenziteta fluorescencije prema broju ciklusa pokazuje sigmoidni oblik. Kako su supstrati PCR reakcije tokom amplifikacije iscrpljeni, kriva prelazi u ravan oblik "plato", a tačka u kojoj se intenzitet fluorescencije naglo povećava, obično nekoliko standardnih devijacija iznad bazne linije, naziva se granični ciklus. *Threshold* je vrednost koja pokazuje nivo fluorescencije koji treba da se detektuje za pojedinačan uzorak i ta vrednost se zadaje aparatu. Uvek se postavlja u eksponencijalnoj fazi. Uzorci se međusobno razlikuju po *Ct* vrednosti, a to je broj ciklusa koji im je potreban da dostignu zadatu vrednost fluorescencije (218,219).

Real Time PCR kvantifikacija se obavlja apsolutno, pomoću standarda, ili relativno, poređenjem sa kontrolnim genom. Apsolutna kvantifikacija se zasniva na standardnoj krivoj. Za izradu standardne krive se mogu koristiti plazmidna DNK ili drugi oblici DNK s tim da apsolutna koncentracija svakog standarda treba da bude poznata.

1.8.1.1.9. Tirozin kinaza inhibitori

Ciljana (*target*) terapija predstavlja novi pristup u lečenju obolelih od malignih bolesti. Usmerena je prema blokadi mesta vezivanja liganda za receptor i prema citoplazmatskom (kinaznom) domenu koji poseduje tirozin-kinaznu aktivnost. Male molekule tirozin kinaza

inhibitora (TKIs) se vezuju za ATP-vezujući region tirozin kinaznog intracelularnog domena, sprečavaju njegovu fosforilaciju i dalju aktivaciju signalnih puteva (220).

Oboleli sa proširenim NSCLC pluća bez terapije žive 4 do 5 meseci dok se kod onih sa mutacijama, posebno delecijama na egzonu 19 imaju duže vreme do progresije bolesti (*Progression Free Survival*-PFS) i do 27 meseci. Kako su mutacije u domenu EGFR gena snažan prediktor odgovora na primenjenu terapiju oboleli sa EGFR mutiranim adenokarcinomom pluća su kandidati su za primenu TKIs (171,220,221,222).

Prva velika randomizirana studija poznata kao *Iressa Pan-Asia Study* (IPASS) je potvrdila efikasnost EGFR TKIs kod EGFR mutiranih i uznapredovalih karcinoma pluća kao i bolji odgovor kod ovih pacijenata u odnosu na pacijente koji su primali karboplatin/paklitaksel (223). Do sličnih rezultata su došle i tri velike studije (*North East Japan-NEJ*) 002, *West Japan Thoracic Oncology Group* (WJTOG) 3405, OPTIM EUROTAC u kojima su komparirani rezultati primene TKIs (gefitinib ili erlotinib) sa rezultatima hemioterapije kao prvom linijom terapije kod EGFR mutiranih NSCLC. Na osnovu dobijenih rezultata TKIs se počela razmatrati kao standardna prva linija terapije u uznapredovalim EGFR mutiranim NSCLC (224).

1.8.1.1.10. Rezistencija na primenu TKIs

Progresija bolesti i transformacija adenokarcinoma u drugi histološki tip tumora, kod pojedinih EGFR mutiranih adenokarcinoma pluća, je najčešće posledica stečene rezistencije na primenjenu EGFR TKIs. Stečena rezistencija na EGFR TKIs može da bude rezultat sekundarnih mutacija EGFR ili angažovanja alternativnih signalnih puteva kao što su PI3K/Akt, insulinu sličan faktor rasta 1 receptora i C- mezenhimalnoepitelni faktor tranzicije (c-MET), aktivacija mTOR signalnog puta i drugi (163,225).

Dominantnu ulogu u nastanku stečene rezistencije imaju tačkaste mutacije na egzonu 20 gde je treonin zamenjen metioninom na poziciji 790 (T790M). Ove mutacije su detektovane kod više od polovine rezistentnih bolesnika i često su udružene sa porodičnim karcinomom pluća (183,226).

Insercije na egzonu 20, tačkaste mutacije na egzonu 19 i kombinacije mutacija G719S i L858R; L858R i D761I, L858R i L747S, L858R i T854A i L858R i T790M takođe mogu da budu razlog stečene rezistencije na TKIs (117).

1.8.1.2. K-RAS

Belančevine koje prenose signale (*signal transducing proteins*) su smeštene na unutrašnjoj strani ćelijske membrane, nalaze se pod kontrolom proto-onkogeni iz RAS porodice koju čine: HRAS gen (*homologous to the oncogene of the Harvey rat sarcoma virus*) i KRAS gen (*homologous to the oncogene of the Kirsten rat sarcoma virus*). Oni kodiraju 21-kD protein (p21-ras). U stanju mirovanja RAS proteini su vezani za GDP. Nakon promene GDP do GTP, RAS-GTP kompleks aktivira multiple signalne puteve (MAPK, STAT i PI3K) koji regulišu ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, pokretljivost i apoptozu. K-ras mutacije se detektuju u različitim biološkim uzorcima (sputum, lavaža respiratornog i gastrointestinalnog sistema, pankreasni i duodenalni sokovi), ali i u adenokarcinomu pluća. S obzirom na učestalost KRAS mutacije su ređe u odnosu na EGFR mutacije (172,228,229).

1.8.1.3. C-MYC

Porodica proto-onkogeni myc ima tri člana: C-myc, N-myc i L-myc. Humani c-myc proto-onkogen je homolog ptičjeg v-myc gena. Lokalizovan je na hromozomu 8q24 i predstavlja 65 kDa nuklearni fosfoprotein sa 439 aminokiseline. Pripada klasi heliks-petlja-heliks protein sa leucinskim zatvaračima -b-HLHZop (*helix-loop-helix leucine zipper-b/HLH/LZ*), veže se na DNK i deluje kao regulator transkripcije

, ćelijska transformacija i transkripcija (230). C-myc je jedan od e pogođenih gena u Burkittovom limfomu, udružen sa agresivnim ponašanjem, predstavlja nezavistan prognostički parametar loše prognoze, a samim tim i ciljanu metu za primenu “target” lekova (231).

1.8.2. Tumor supresorski geni

Tumor supresorski geni pospešuju nesvrshodni rast ćelija supresijom ili gubitkom vlastite funkcije (150).

1.8.2.1. Retinoblastoma tumor supresor gen

Retinoblastoma tumor supresor gen (Rb) je lokalizovan na dužem kraku hromozoma 13 (13q). Njegov produkt fosfoprotein učestvuje u procesu fosforilacije i stimuliše diobu ćelija. Funkcionalno može da bude inaktiviran usled: genetskih abnormalnosti (mutacija i/ili delecija), hiperfosforilacije, neaktivnosti p16/Ink4 gena kroz genetski ili epigenetski mehanizam gde je pokretač hipermetilacija i prekomerna ekspresija ciklin D1 zbog genske amplifikacije (232).

1.8.2.2. Gen p53

Gen p53 se nalazi na kratkom hromozomu 17 (17p), enkodira brzo stabilizirajući 53kDa protein, meta je virusnih onkoproteina DNK virusa (SV40) i HPV (334- reguliše proliferaciju ćelija i indukuje apoptozu ćelija sa oštećenom DNK (233).

Iako gubitak funkcije gena p53 predstavlja najčešće genetsko oštećenje u karcinomu pluća, češće kod SCLC u odnosu na NSCLC (70%:50%), može da se nađe u preneoplastičnim promenama, ali i u tkivu pluća kod pušača. Prisustvo mutacija samo na jednom od alela nije dovoljno za nastanak karcinoma. Pored delecije kratkog kraka hromozoma 17 česte su tačkaste mutacije na preostalom alelu gena p53 (234).

1.8.2.3. Tumorska angiogeneza

Angiogeneza je proces nastanka novih krvnih sudova pupanjem ili klijanjem iz postojećih vaskularnih struktura. Ovaj proces je u velikoj meri isključen nakon embriogeneze, ali je uključen u patogenezi infektivnih, fibroproliferativnih, inflamatornih i malignih bolesti. Faktori uključeni u angiogenezu su proizvod tumorskih ćelija ili ćelija zapaljenja. Najvažniji induktori procesa angiogeneze su vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i fibroblastični faktor rasta (FFR) (149,150,152).

VGFR je najviše eksprimiran u adenokarcinomu pluća i indikator je loše prognoze bolesti, stoga blokada angiogeneze predstavlja bitnu strategiju u sprečavanju progresije bolesti. Značajan benefit u preživljavanju pacijenata sa NSCLC je zabeležen kod onih koji su uz terapiju paklitakselom i karboplatinom dodatno primali i bevacizumab iz grupe antiangiogenih lekova (235).

1.8.3. Geni koji upravljaju apoptozom

Apoptoza je programirana smrt ćelije, odgovorna je za niz fizioloških stanja, predstavlja prirodnu barijeru u nastanku malignih tumora i nalazi se pod kontrolom Bcl-2 proto-onkogenom. Defekt apoptoze doprinosi tumorogenezi i odgovoran je za rezistenciju na primenjene lekove. Apoptoza je prvobitno definisana na osnovu morfoloških osobina umiruće ćelije koje se manifestuju kao kondenzacija i fragmentacija jedra, kondenzacija citoplazme, mehurasto ispupčenje ćelijske membrane, stvaranje apoptotskih telašaca koja fagocitiraju okolni makrofagi, ali bez prateće reakcije zapaljenja u okolini (149,150,152).

Danas se zna da je mehanizam apoptoze kompleksan, sofisticiran i rezultat je energetski zavisnih kaskada molekularnih procesa. Spoljašnji (receptorski) i unutrašnji (mitohondrijalni)

signalni putevi u ćelijama sisara dovode do serije proteolitičkih reakcija rezultiraju apoptozom ćelije (236).

1.8.3.1. Bcl-2 proto-onkogeni

Najvažniji intraćelijski regulatori apoptoze su proapoptotski (Bax, Bak, Bid i Bim) i antiapoptotski (Bcl-2 i Bcl-X_L) proteini iz porodice Bcl-2 proteina koji je prvobitno otkriven u folikularnom B ćelijskom limfomu, ali se nalazi i u karcinomima pluća gde je evideno bolje preživljavanje kod bolesnika sa Bcl-2 pozitivnim tumorima u odnosu na one sa Bcl-2 negativnim tumorima (237).

1.8.4. Geni koji popravljaju DNK

Oštećenje DNK je posledica delovanja nepovoljnih faktora iz spoljašnje sredine ili grešaka koje mogu da nastanu spontano u toku DNK replikacije. Pod uticajem enzima: endonukleaze, egzonukleaze, DNK polimeraze i DNK ligaze oštećeni deo DNK lanca se iseca, odstranjuje, uvode se nove baze i vrši povezivanje na mestu prekida. Popravka oštećene DNK se odvija pod kontrolom DNK reparacionih gena (149,150,152).

2. CILJEVI

Uzimajući u obzir činjenicu da primena ciljane molekularne terapije (TKIs) kod obolelih sa EGFR mutiranim adenokarcinomom pluća poboljšava prognozu bolesti, da postoji rezistencija kod pojedinih tipova EGFR mutacija kao i povezanost EGFR mutacionog statusa sa histopatološkim i imunohistohemijskim karakteristikama tumora, da se bolest dijagnostikuje u uznapređovalom stadijumu kada je bronhološki uzorak jedini uzorak u kome je potrebno odrediti i molekularni profil tumora osnovni cilj ove disertacije je da se odredi učestalost i tip EGFR mutacija u invazivnom adenokarcinomu pluća i povezanost EGFR mutacionog statusa sa karakteristikama adenokarcinoma. Da bi se to realizovalo postavljeni su sledeći zadaci:

- 1) Izvršiti histopatološku reklasifikaciju invazivnog adenokarcinoma pluća na operativnom hirurškom uzorku i preoperativnom bronhološkom uzorku na osnovu kriterijuma koje je postavila internacionalna asocijacija za proučavanje karcinoma pluća, američko torakalno društvo i evropsko respiratorno društvo.
- 2) Odrediti ekspresiju TTF-1 u invazivnom adenokarcinomu pluća i povezanost sa EGFR mutacionim statusom.
- 3) Odrediti učestalost i tip EGFR mutacija u invazivnom adenokarcinomu pluća.
- 4) Odrediti povezanost EGFR mutacionog statusa sa predominantnim tipom invazivnog adenokarcinoma pluća.
- 5) Utvrditi da li bronhoskopska biopsija tumora može da bude reprezentativni uzorak za određivanje EGFR mutacionog statusa kod obolelih od adenokarcinoma pluća.

3. HIPOTEZA RADA

Da bi se ostvarili ciljevi ovog istraživanja, a u skladu sa publikovanim rezultatima, hipoteza se sastoji od nekoliko pretpostavki:

- 1) Adenokarcinom pluća u više od 80% slučajeva ima heterogenu histopatološku sliku.
- 2) Predominantni tip u primarnom tumoru određuje dominantni tip u limfogenim metastazama.
- 3) Adenokarcinom pluća u više od 70% slučajeva pokazuje pozitivnu TTF-1 ekspresiju i postoji pozitivna korelacija sa EGFR mutacionim statusom.
- 4) Prevalencija EGFR mutacija u invazivnom adenokarcinomu pluća je manja od 30%, a oko 90% svih EGFR mutacija se nalazi na egzonu 19 i 21.
- 5) Postoji pozitivna korelacija EGFR mutacija i dominantnog tipa invazivnog adenokarcinoma pluća.
- 6) Bronhoskopska bopsija je reprezentativni uzorak za EGFR testiranje kod obolelih od invazivnog adenokarcinoma pluća.

4. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je bilo delom retrospektivnog, a delom prospektivnog karaktera i sprovedeno je u Centru za patologiju Instituta za plućne bolesti Vojvodine (IPBV) u Sremskoj Kamenici.

1.7. ISPITANICI, DIJANOSTIČKO-TERAPIJSKE PROCEDURE I KARAKTERISTIKE PRIMARNOG TUMORA

U istraživanje je bilo uključeno 60 bolesnika kod kojih je urađena radikalna hirurška intervencija zbog invazivnog adenokarcinoma pluća na Klinici za grudnu hirurgiju IPBV u periodu od 2010-2015. godine. Kod svih bolesnika je pre operacije, zbog radiološki verifikovane infiltrativne promene u plućima, urađen bronhoskopski pregled i uzet biopsijski materijal prema standardnoj kliničkoj proceduri u Centru za bronhološku dijagnostiku IPBV. Patohistološka dijagnoza invazivnog adenokarcinoma pluća je postavljena u Centru za patologiju IPBV.

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje bili su:

- bolesnici kod kojih postoji jedan nodus i/ili masa dijagnostikovani kao invazivni adenokarcinom pluća,
- bolesnici koji nisu imali prethodno dijagnostikovani adenokarcinom pluća ili drugih organa,
- bolesnici koji nisu primali preoperativnu radioterapiju i/ili hemioterapiju.

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja bili su:

- bolesnici kod kojih postoje multipli adenokarcinomi pluća,
- bolesnici koji su imali raniji adenokarcinom pluća ili drugih organa,
- bolesnici koji su primali preoperativnu radioterapiju i/ili hemioterapiju.

Anamnestički podaci prikupljeni iz istorije bolesti bili su: dob, pol i pušačke navike koje su kod aktuelnih pušača bile izražene brojem kutija/godina (*pack/years*). Dobijeni rezultat pokazuje broj popušanih cigareta na dan te trajanje pušenja. Izračunava se tako da se broj popušanih cigareta dnevno pomnoži sa brojem godina pušenja te se proizvod podeli sa 20.

Podaci preuzeti iz patohistoloških izveštaja arhive Centra za patologiju IPBV bili su: vrsta biopsije, veličina biopsijskog uzorka (mm), vrsta operacije, anatomska lokalizacija tumora, veličina tumora (mm) i patološki stadijum bolesti.

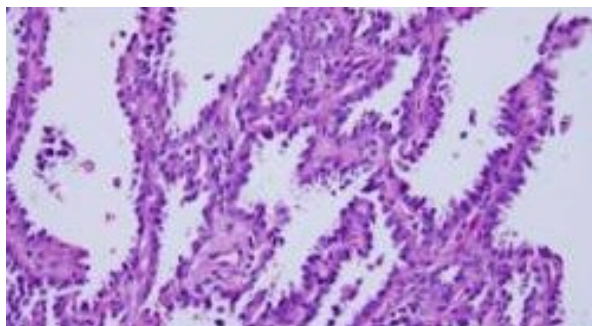
4.2. TKIVNI UZORCI DOBIJENI HIRURŠKOM RESEKCIJOM

4.2.1. Patohistološka evaluacija

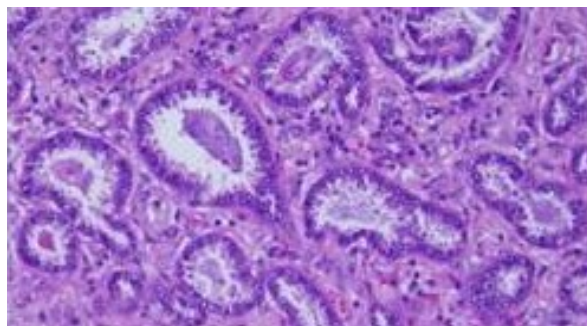
Kod svakog od 60 bolesnika je iz hirurški resecciranog materijala, nakon određivanja makroskopskih karakteristika tumora, uziman adekvatan broj reprezentativnih uzoraka iz tumorskog tkiva, okolnog plućnog parenhima i limfni čvorovi. Uzorci su fiksirani u 10% pufersanom formalinu tokom 12 časova, dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, prožeti i ukalupljeni u parafin i sečeni na kliznom mikrotomu (*Leica, Germany*) na serijske rezove debljine od 4 μ m, zatim deparafinisani, bojeni rutinskom hematoksilin-eozin (H&E) metodom i montirani DPX-om. Kada je postojala nedoumica oko: određivanja histološkog tipa tumora, postojanja invazije visceralne pleure ili diferencijacije pojedinih tipova invazivnog adenokarcinoma urađene su standardne histohemijske i/ili imunohistohemijske metode bojenja (PAS i/ili *Alcian blue*-bojenje na sluz, *Victoria van Gieson*-bojenje na elastiku, CK7, p63, TTF1, CK5/6, *synaptophysin* i *chromogranin*) na dodatno sečenim histološkim rezovima uzoraka koji su odabrani na osnovu histoloških rezova bojenih H&E metodom bojenja.

Iz hirurški resecciranog materijala određen je broj uzoraka i broj histoloških rezova bojenih H&E metodom koji su bili sa elementima tumorskog tkiva. Svi uzorci su reklasifikovani primenom histopatoloških IASLC/ATS/ERS kriterijuma. Semikvantitativno je određena svaka predložena komponenta invazivnog adenokarcinoma koja je bila zastupljena u $\geq 5\%$ pregledanog tumorskog tkiva.

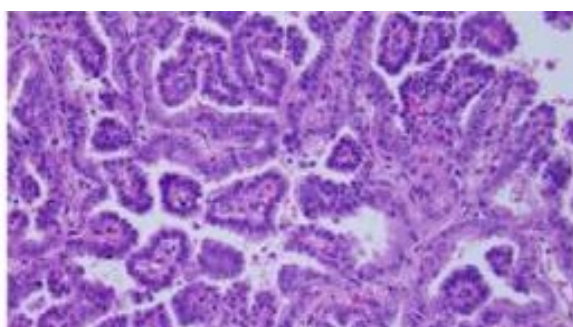
Predominantni tip je definisan kao tip koji je zastupljen u najvećem procentu. Uzorci su s obzirom na predominantni tip podeljeni u grupe: lepidično predominantni (Slika 24.), acinarno predominantni (Slika 25.), papilarno predominantni (Slika 26.), mikropapilarno predominantni (Slika 27.) i solidno predominantni tip (Slika 28.).



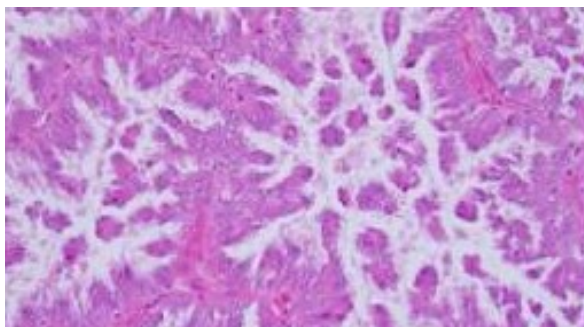
Slika 24. Lepidično predominantni tip, H&E,200x.



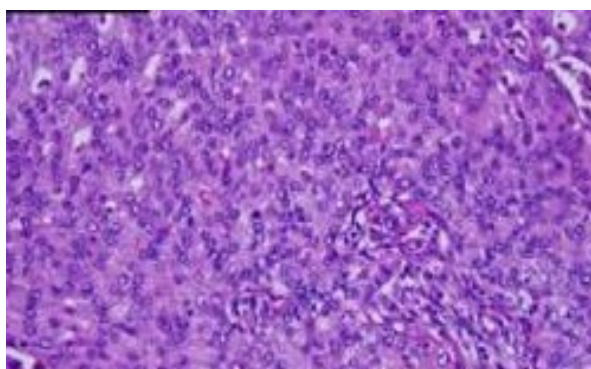
Slika 25. Acinarno predominantni tip, H&E,200x.



Slika 26. Papilarno predominantni tip, H&E,200x.



Slika 27. Mikropapilarno predominantni tip, H&E,200x.



Slika 28. Solidno predominantni tip, H&E,200x.

4.2.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije TTF-1

Od svih isečaka iz hirurški resektiranog tumorskog tkiva na osnovu histoloških rezova bojenih H&E metodom, odabran je po jedan isečak bez ili sa minimalnom nekrozom koji je zatim sečeni mikrotomom (*Leica, Germany*) na histološke rezove debljine 4 μm , koji su hvatani na Superfrost predmetna stakla i sušeni na 60°C 30 minuta.

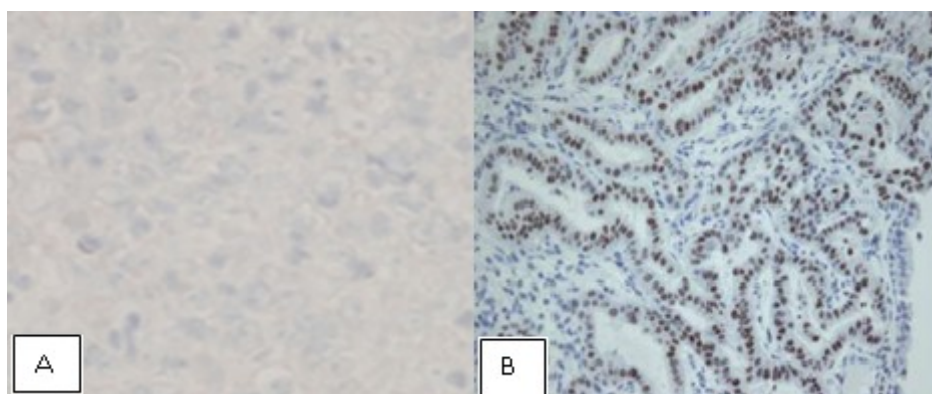
Demaskiranje antigenih determinanti je vršeno razblaženim rastvorom *Envision Flex* pufera za pretretman (50x) visokog pH. Pretretman isečaka je vršen u mikrotalasnoj pećnici, po *Envision Flex* protokolu za toplotni pretretman, preporučenom od kompanije DAKO.

Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, sledila je primena protokola propisana od strane proizvođača DAKO (*Envision Flex Manual Protocol*). Uzorci su nakon ispiranja razblaženim puferom za ispiranje (20x) i blokade endogene peroksidaze (3% H₂O₂), inkubirani TTF-1 antitelom (*Flex Monoclonal Mouse Anti-thyroid Transcription Factor TTF-1, Clone 8G7G3/1 Ready to use*) u trajanju od 20 minuta. Za vizualizaciju je korišćen EnvisionFlex/HRP (RTU) sistem u trajanju od 20 minuta. Radni rastvor hromogena (*Envision Flex Substrate i Envision Flex DAB hromogen*) je inkubiran 10 minuta. Bojenje i kontrastiranje je izvršeno primenom Majer-ovog hematoksilina u trajanju od 5 minuta.

Za kontrolu kvaliteta, pored pozitivne unutrašnje kontrole, uz svaki isečak je rađena pozitivna i negativna spoljašnja kontrola.

Imunohistohemijska ekspresija TTF-1 je evaluirana semikvantitativno, određen je procenat tumora sa pozitivnim nuklearnim bojenjem i intenzitet bojenja (blag, umeren i jak) (Slika 29A,B.) prema skor:

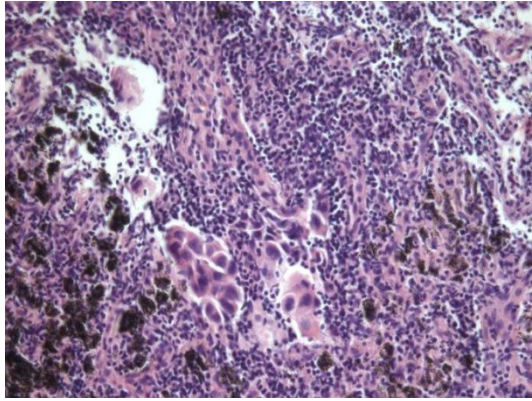
- 0- nuklearna ekspresija nije prisutna,
- 1- nuklearna ekspresija bilo kog intenziteta u < 50% tumorskih ćelija,
- 2- nuklearna ekspresija blagog intenziteta u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija,
- 3- nuklearna ekspresija umerenog intenziteta u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija,
- 4- nuklearna ekspresija jakog intenziteta u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija.



Slika 29. TTF-ekspresija: A-skor 0; B- -skor 4.

4.2.3. Patohistološka evaluacija metastatski izmenjenih limfnih čvorova

U uzorcima limfnih čvorova sa metastazom adenokarcinoma je na osnovu IASLC/ATS/ERS kriterijuma određen svaki zastupljeni histološki tip adenokarcinoma (Slika 30.).



Slika 30. Metastaza adenokarcinoma u limfnom čvoru.

4.3. TKIVNI UZORCI DOBIJENI BIOPSIJOM

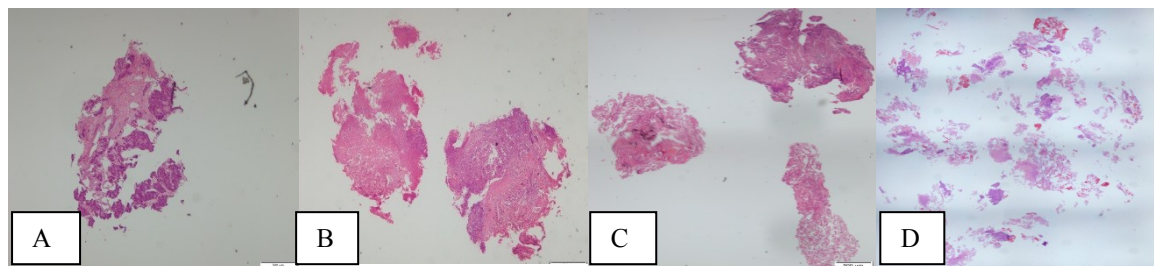
4.3.1. Patohistološka evaluacija

Biopsijski uzorci su fiksirani u 10% pufersanom formalinu tokom 12 časova, dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, prožeti i ukalupljeni parafin i sečeni na kliznom mikrotomu (*Leica, Germany*) na serijske rezove debljine od 4 μ m na tri mikroskopske pločice od kojih su uzorci na prvoj i trećoj pločici deparafinirani, bojeni rutinskom H&E metodom i montirani DPX-om.

Kada je postojala nedoumica oko: određivanja histološkog tipa tumora urađene su standardne histoheмиjske i/ili imunohistoheмиjske metoda bojenja (PAS i/ili *Alcian blue*-bojenje na sluz, CK7, p63, TTF1, CK5/6, *synaptophysin* i *chromogranin*). Dopunske histoheмиjske metode bojenja su vršene na drugoj mikroskopskoj pločici. Dodatne imunohistoheмиjske metode bojenja su vršene na materijalu koji je dobijen naknadnim sečenjem histoloških rezova iz parafinskih blokova sa ukalupljenim biopsijskim uzorcima.

U svim biopsijskim uzorcima određen je broj histoloških rezova bojenih HE metodom. Svi uzorci su reklasifikovani primenom histopatoloških IASLC/ATS/ERS kriterijuma. Semikvantitativno je određena svaka predložena komponenta invazivnog adenokarcinoma i predominantni tip.

Broj biopsijskih uzoraka je određivan kvantitativnom metodom upotrebom svetlosnog mikroskopa *Olympus BX43* (*Olympus, Tokyo, Japan*) pri uvećanju od 100 puta i podelili ih u grupe (u rasponu od 1 do 7). Slučajeve u kojima nije bilo moguće odrediti broj uzoraka smo smatrali neklasifikovanim (Slika 31 A,B,C,D.).

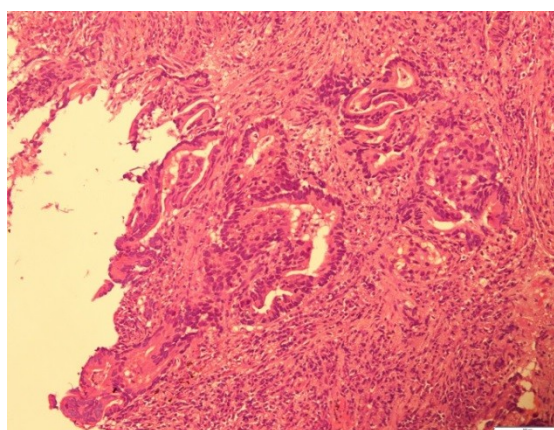


Slika 31. Broj biopsijskih uzoraka: A-jedan, B-dva, C-tri, D-neklasifikovan.

Broj tumorskih ćelija u biopsijskom uzorku je određivan kvantitativnom metodom upotrebom svetlosnog mikroskopa *Olympus BX43* (*Olympus, Tokyo, Japan*), pri čemu su brojana samo očuvana jedra pri uveličanju od 400 puta. Broj ćelija se klasifikovan kao skor (od 1 do 7) (Slika 32.).

Skor broja tumorskih ćelija:

- 1) ≤ 20 očuvanih tumorskih ćelija
- 2) više od 20, a manje od 50 očuvanih tumorskih ćelija
- 3) više od 50, a manje od 100 očuvanih tumorskih ćelija
- 4) više od 100, a manje od 200 očuvanih tumorskih ćelija
- 5) više od 200, a manje od 500 očuvanih tumorskih ćelija
- 6) više od 500, a manje od 1000 očuvanih tumorskih ćelija
- 7) više od 1000 očuvanih tumorskih ćelija.



Slika 32. Acinarni tip-skor 4, H&E, 200x.

Reklasifikaciju adenokarcinoma, imunohistohemijsku evaluaciju TTF-1 ekspresije i određivanje broja tumorskih ćelija izvršila su nezavisno dva patologa zaposlena u Centru za

patologiju IPBV koji se u svakodnevnom radu dominantno bave plućnom patologijom duže od dve godine. Konačni patohistološki nalaz je bio rezultat konzenczusa. U slučajevima gde nije postojalo slaganje dva patologa traženo je mišljenje i trećeg patologa, supervizora, koji je ujedno i patolog sa najdužim stažom u ovoj oblasti.

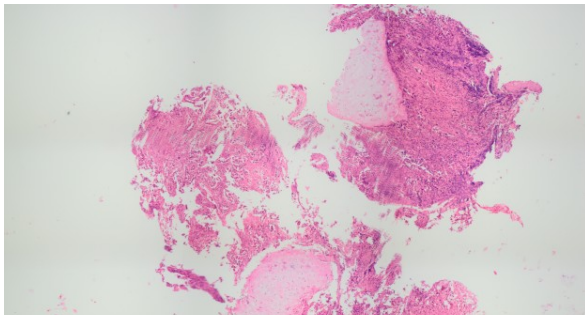
4.3.2. Morfometrijska analiza biopsijskih uzoraka

Po jedan histološki rez bojen metodom H&E analiziran je pod mikroskopom *Olympus BX43* (*Olympus, Tokyo, Japan*) pri uveličanju od 200 i 400 puta i fotografisan uz pomoć mikroskopske kamere *Olympus DP 73* (*Olympus, Tokyo, Japan*).

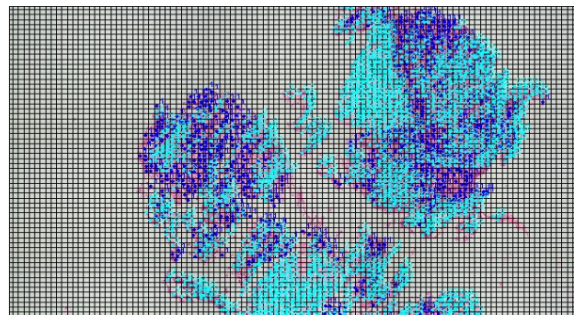
Procenat volumenske gustine netumorskog tkiva i tumorskog tkiva određivan je upotrebom kompjuterskog programa *Image J* sa instaliranim plugin-om; (*Plugins*) za analizu broja pogodaka (*COST* i *Analyze*).

Preko digitalizovane fotografije postavljena je mreža linija (*Grid Type: line*) veličine 50 piksela (*size*), proizvoljnog rasporeda (*Random Offset*) sa zabranjenim linijama koje su imale faktor 3 (*Forbidden line option*), analiziran (*Analyze*) je broj kockica (*Cell Counter*) koje padaju (*Initialize*) na netumorsko (*Type 1*) i tumorsko tkivo (*Type 2*) (Slika 33 A,B.).

Na osnovu broja pogodaka na tumorsko i netumorsko tkivo određena je volumenska gustina tumorskog tkiva u svakom biopsijskom uzorku. Kako volumenska gustina celokupnog



Slika 33A-Biopsijski uzorak H&E, 100x.



Slika. 33B-Morfometrijska analiza.biopsijskog uzorka.

biopsijskog uzorka (V_{by}) čini 100 % na osnovu dobijenih podataka o broju pogodaka na: biopsijskom uzorku (P_{by}), tumorskom tkivu (P_t) i netumorskom tkivu (P_{nt}) pomoću proporcija dobijene su procentualne vrednosti volumenske gustine tumorskog tkiva (PVT) i procentualne vrednosti volumenske gustine netumorskog tkiva ($PVNT$):

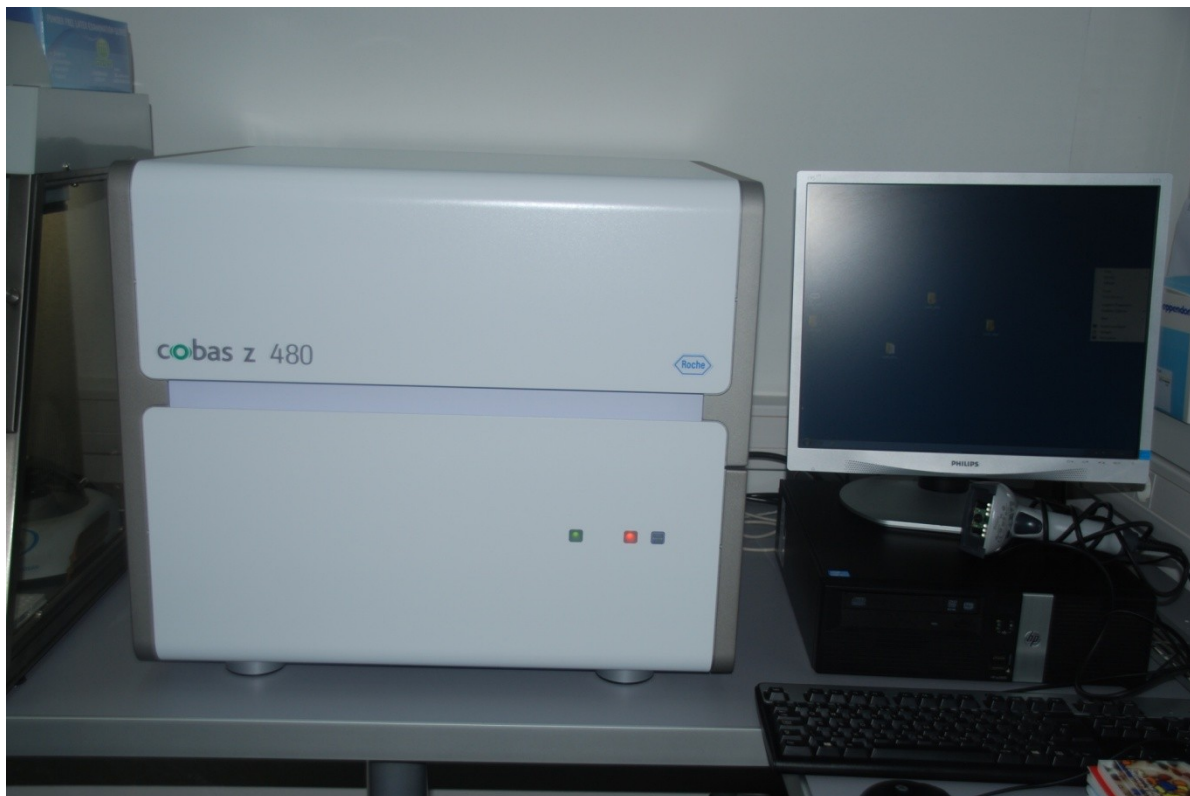
$$100\%:P_{by} = PVT:P_t \quad 100\%:P_{by} = PVNT:P_{nt}$$

$$PVT = P_t:P_{by} \times 100$$

$$PVNT = P_{nt}:P_{by} \times 100$$

4.4. MOLEKULARNA ANALIZA

Kod svih bolesnika uključenih u istraživanje prospektivno je određivano prisustvo EGFR mutacija i njihov tip na COBAS[®] 4800 sistemu, na aparatu Cobas z 480 *analyzer* (Slika 34.).



Slika 34. Cobas-z 480 *analyzer*.

Molekularna analiza je urađena na tkivnim uzorcima koji su dobijeni biopsijom i hirurškom resekcijom, a koji su odabrani na osnovu histoloških rezova bojenih H&E metodom. Svi analizirani uzorci bili su ukalupljeni u parafinske blokove.

4.4.1. Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tumorskog tkiva

Izolacija DNK je izvršena uz pomoć *cobas[®] DNA Sample Preparation Kit* (CE-IVD) (Slika 35.), prema uputstvima proizvođača Roche:



Slika 35. „DNA Sample Preparation Kit“ (CE-IVD)

- 1) Od svakog uzorka ukalupljenog u parafinski blok isečeno je jedan do četiri histološka reza debljine 3-5 μ u mikrotubu zapremine 1,5 ml.
- 2) Deparafinizacija je izvršena dodavanjem 500 μ l ksilena, sadržaj je vorteksovan 10 sekundi i tuba je ostavljena da odstoji 5 minuta na 15 - 30 °C.
- 3) Dodato je 500 μ l apsolutnog etanola i promešano na vorteksu 10 sekundi. Tuba je stavljena da odstoji 5 minuta na 15 - 30 °C.
- 4) Nakon centrifugiranja (16000 do 20000 x g 2 minuta) supernatant je odstranjen.
- 5) Dodat je 1 ml apsolutnog etanola i vorteksovan 10 sekundi.
- 6) Centrifugiran na 16000 do 20000 x g 2 minuta, supernatant je odstranjen.
- 7) Talog tkiva u otvorenoj mikrotubi je sušen 10 minuta na 56 °C u suvom termo bloku.
- 8) Osušeni talog tkiva je resuspendovan dodavanjem 180 μ l DNA pufera za liziranje tkiva (DNA TLB) i 70 μ l odmrznute rekonstituisane PK.
- 9) Mikrotube koje sadrže smešu uzorak/DNA TLB/PK i negativnu kontrolu (NEG CT) su vorteksovane 30 sekundi pri čemu je tkivo u potpunosti potopljeno u DNA TLB/PK smešu. Mikrotube su stavljene u suvi termo blok na 56 °C u i inkubirane 60 minuta zatim vorteksovane 10 sekundi.
- 10) Tube sa smešom uzorak/DNA TLB/PK je stavljeno u suvi termo blok i inkubirano (Slika 36.) na 90 °C 60 minuta. Inkubacijama u DNA TLB/PK postiže se potpuna razgradnja tkiva i oslobađa se DNK.
- 11) Tokom inkubacije, pripremljen je potreban broj filter tuba (FT) sa poklopcem, postavljanjem FT na kolekcione tube (CT). Za svaki uzorak je pripremljena 1 FT, 3 CT i

- 1 eluciona tubu (1,5 ml mikrotuba). Poklopac svake FT i elucione tube sa pravilnom identifikacijom uzorka ili kontrole je adekvatno obeležen.
- 12) Tube su nakon hlađenja na 15 - 30 °C kratko centrifugirane pri čemu je tečnost oborena sa poklopca.
 - 13) U svaku mikrotubu je dodato po 200 µl DNA parafin vezujućeg pufera (DNA PBB); sadržaj je promešan pipetiranjem gore-dole 3 puta i mikrotube su inkubirane na 15 - 30 °C 10 minuta.
 - 14) U svaku mikrotubu je dodato po 100 µl izopropanola; sadržaj je promešan pipetiranjem gore-dole 3 puta.
 - 15) Svaki lizat iz mikrotube je prebačen u odgovarajuće obeleženi FT/CT sklop i centrifugiran na 8000 x g 1 minut.
 - 16) Zatim je svaki FT prebačen u novi CT, a sadržaj upotrebljenih CT spremljen u hemijski otpad, upotrebljeni CT su ispravno odloženi. U svaku FT/CT tubu je dodato 500 µl radnog rastvora pufera WB I, FT/CT tube su centrifugirane na 8000 x g 1 minut, a sadržaj upotrebljenih CT je odbačen u hemijski otpad. FT je postavljen nazad u istu CT.
 - 17) U svaku FT/CT tubu je dodato 500 µl radnog rastvora pufera WB II, FT/CT tube su centrifugirane na 8000 x g 1 minut. Svaki FT je prebačen u novi CT, a sadržaj upotrebljenih CT je odbačen u hemijski otpad. FT je postavljen nazad u istu CT.
 - 18) FT/CT tube su centrifugirane na 16000 do 20000 x g 1 minut da bi se osušile filter membrane.
 - 19) Svaki FT je prebačena u prethodno obeležene elucione mikrotube, a sadržaj upotrebljenih CT je odbačen u hemijski otpad.
 - 20) U centar svakog FT bez dodirivanja FT membrane je dodato 100 µl DNA elucionog pufera (DNA EB), FT sa elucionom mikrotubom su inkubirane na 15 - 30° C tokom 5 minuta.
 - 21) FT sa elucionim mikrotubama su centrifugirane na 8000 x g 1 minut.
 - 22) Poklopci na elucionim tubama su zatvoreni. Elucione epruvete sadrže DNK štok (izolovanu DNK).



Slika 36. Termoblok.

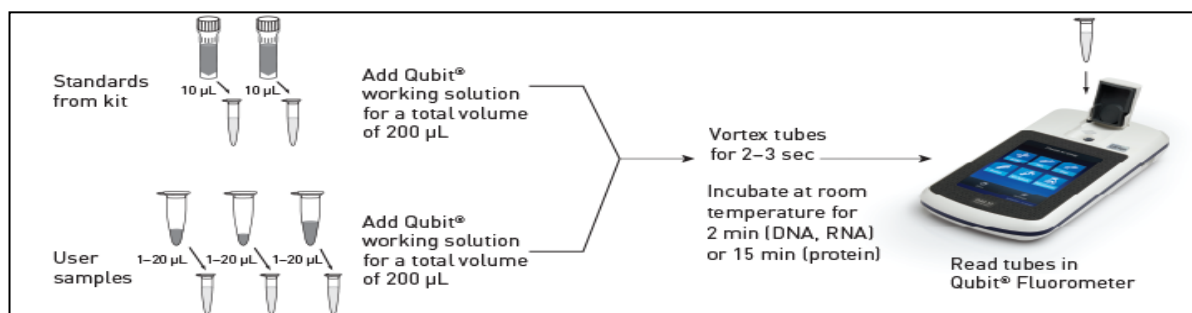
Merenje koncentracije DNK je izvršeno odmah posle postupka DNK izolacije i pre skladištenja. Istovremeno sa ispitivanim uzorcima po istom postupku izolacije DNK kao i za ostale uzorke, obrađena je negativna kontrola izolacije koja je pripremljena dodavanjem 180 μ l DNA TLB i 70 μ l PK rastvora u mikrotubu zapremine 1,5 ml.

4.4.2. Određivanje koncentracije izolovane genomske DNK

Koncentracije izolovane DNK su određivane na aparatu Qubit[®] 2.0 fluorometru. Za analizu su korištene po dve tubice (Qubit[®] assay tube 0,5 ml) za standarde (Standard 1 i Standard 2) i po jedna tubica (Qubit[®] assay tube 0,5 ml) za svaki uzorak. Bočice Qubit[®] (Quant-iT[™]) dsDNA BR Assay Kita su izvađene iz frižidera i kratko inkubirane na sobnoj temperature, vorteksovane po 5 sekundi i kratko centrifugirane. U većoj epruveti je pripremljen Quant-iT[™] radni rastvor mešanjem potrebne zapremine Quant-iT[™] Pufera i Quant-iT[™] Reagensa po sledećim formulama (μ l Quant-iT[™] Pufera = $199 \times n$ μ l; μ l Quant-iT[™] Reagensa = $1 \times n$ μ l; * n = broj standarda + broj uzoraka).

Sadržaj u epruveti (Quant-iT[™] radni rastvor) je vorteksovao, odmereno je po 190 μ l radnog rastvora u tubice za standarde i po 180-199 μ l radnog rastvora u tubice za uzorke. Odmereno je 10 μ l Standarda 1 u prvu tubicu za standard i 10 μ l Standarda 2 u drugu tubicu za standard. Odmereno je po 1-20 μ l svakog uzorka u odgovarajuće obeležene tubice (tako da ukupna zapremina u tubici bude 200 μ l). Sve tubice su vorteksovane 2 sekunde, inkubirane na sobnoj

temperaturi 2 minuta i očitavana je koncentracija DNK na Qubit[®] 2.0 fluorometru, prema uputstvima proizvođača (Slika 37.).



Slika 37. *Qubit* kvantifikaciona analiza. (Preuzeto: www.thermofisher.com).

4.4.3. Detekcija EGFR mutacija

Detekcija prisustva EGFR mutacija je izvršena uz pomoć *cobas*[®] *EGFR Mutation Test* (CE-IVD), prema uputstvima proizvođača Roche:

Za pripremu finalnog volumena DNK, čija koncentracija treba da bude 2 ng/µl, korišćene su formule kojima su izračunavane potrebne zapremine DNK štoka i DNK diluenta (DNA SD).

U slučajevima kada je koncentracija DNK štoka 2 ng/µl razblaženje nije vršeno. Ukoliko je koncentracija DNK štoka bila > 2 ng/µl i < 36 ng/µl potrebna zapremina (µl) DNK štoka je izračunavana za svaki uzorak prema formuli: $\mu\text{l DNK štoka} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{koncentracija DNK štoka} [\text{ng}/\mu\text{l}]$. Za svaki uzorak, izračunavana je potrebna zapremina (µl) DNA SD: $\mu\text{l DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l DNK štoka}$. Ukoliko je koncentracija DNK štoka ≥ 36 ng/µl korištena je formula koja omogućava izračunavanje zapremine finalnog razblaženja DNK štoka (µl) koristeći 5 µl DNK štoka: $\mu\text{l finalnog razblaženog DNK štoka} = (5 \mu\text{l} \times \text{koncentracija DNK štoka} [\text{ng}/\mu\text{l}]) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Za svaki uzorak, izračunati zapreminu (µl) DNA SD potrebnu za razblaženje 5 µl DNK štoka do koncentracije 2 ng/µl: $\mu\text{L DNA SD} = \mu\text{l finalnog razblaženog DNK štoka} - 5 \mu\text{l}$.

4.4.4. Razblaživanje uzoraka

Pripremljen je i obeležen odgovarajući broj 1, 5 ml mikrotuba za DNK razblaženja. Upotrebom pipete i nastavaka sa aerosol barijerom u obeležene tube pipetirane su izračunate zapremine DNA SD. Ispipetirano je 45 µL DNA SD u 1, 5 ml mikrotubu, koja je označena

kao negativna kontrola. Svaki DNK štok i negativna kontrola izolacije su vorteksovani po 5 do 10 sekundi. Upotrebom pipete i nastavaka sa aerosol barijerom pipetirane su izračunate zapremine svakog DNK štoka u odgovarajuću tubu koja sadrži DNA SD. Pipetirano je 45 µL negativne kontrole izolacije u mikrotubu u kojoj pipetirano 45 µL DNA SD (negativna kontrola). Epruvete su zatvorene i vorteksovane po 5 do 10 sekundi

4.4.5. Priprema radnog rastvora Master Miksa (MMX-1, MMX-2 i MMX-3)

Svaki ispitivani uzorak se testira u tri reakcije, što je zahtevalo ukupno 75 µl razblaženog DNK štoka, čija je koncentracija 2 ng/µl (ukupno 150 ng DNK). Pripremljena su tri radna rastvora MMX u tri različite mikrotube (EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 i EGFR MMX-3). Zapremina radnih rastvora (EGFR MMXa (µl) je izračunata primenom formule:

Potrebna zapremina MMX (µl) = (broj uzoraka + 2 kontrole +1) x 20 µl

Izračunata je i zapremina rastvora magnezijuma (MGAC) neophodnog za pripremu radnih rastvora svakog MMX primenom sledeće formule:

Potrebna zapremina MGAC (µl) = (broj uzoraka + 2 kontrole +1) x 5 µl

EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 i MGAC bočice su vorteksovane 5 sekundi, tečnost je spuštена kratkim centrifugiranjem na dno epruveta pre upotrebe. Označena je po jedna sterilna mikrotuba za radne rastvore MMX-1, MMX-2 i MMX-3, dodata je izračunata zapremina MMX-1, MMX-2 i MMX-3 u obeležene mikrotube i izračunata zapremina MGAC u obeležene mikrotube. Tube su vorteksovane 5 sekundi.

4.4.6. Pipetiranje na mikrotitar ploču

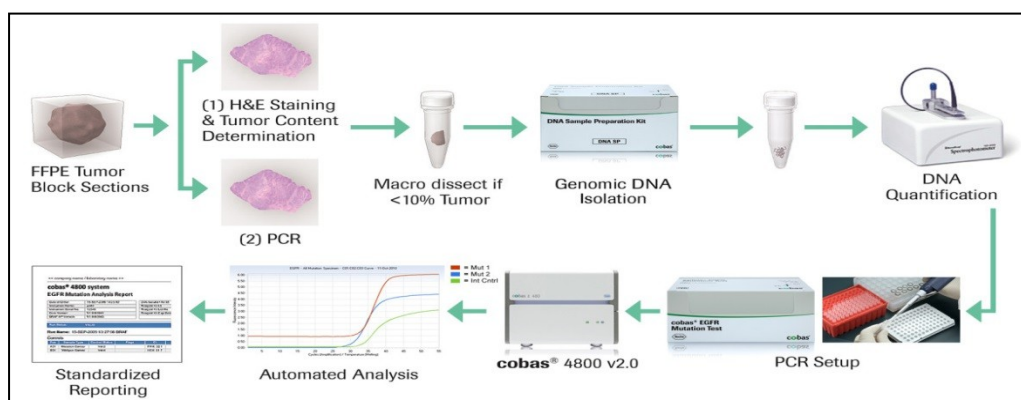
Pipetirano je po 25 µl radnih rastvora MMX u svaki reakcioni otvor na mikrotitar ploči. Dodati su radni rastvori: MMX-1 na mikrotitar ploču (*AD-plate*) u otvore kolona 1, 4, 7 i 10, MMX-2 na mikrotitar ploču (*AD-plate*) u otvore kolona 2, 5, 8 i 11 i MMX-3 na mikrotitar ploču (*AD-plate*) u otvore kolona 3, 6, 9 i 12. Novim nastavcima, pipetirano je 25 µl EGFR MC u otvore A1, A2 i A3 na mikrotitar ploči. Novim nastavcima pipete, pipetirano je 25 µl negativne kontrole u otvore B1, B2 i B3 na mikrotitar ploči. Koristeći nove nastavke pipeta, dodato je 25 µl prvog razblaženog uzorka DNK u otvore C1, C2 i C3 na mikrotitar ploči; dobro promešano. Ponoviti ovu proceduru za razblaženje DNK ostalih uzoraka (otvori D1, D2 i D3, itd). Mikrotitar ploče su pokrivene sa zaptivnim filmom.



Slika 38. Pipetiranje u mikrotube i mikrotitar ploča.

4.4.7. Interpretacija rezultata

Detekcija mutacija EGFR gena je određivana na cobas® 4800 sistemu, na aparatu Cobas z 480 analyzer (Slika 39.). Ceo tok amplifikacije, detekcije i validacije uzoraka izvršen je pomoću Cobas® 4800 softvera, prema uputstvima proizvođača. Validni testovi mogu da uključuju i validne i nevažeće (invalidne) rezultate uzoraka. Primenom Cobas® EGFR *Mutation Test* (CE-IVD) mogu da se detektuju različite mutacije prema opisanoj proceduri (Slika 39.).



Slika 39 Proces detekcije EGFR mutacija. (Preuzeto: www.biomedcentral.com).

U našem istraživanju smo detektovali EGFR mutacija na egzonu 18,19,20 i 21 (Tabela 8.).

Tabela 8. Tipovi EGFR mutacija

| Egzon | Mutacije |
|-------|---|
| 18 | Tačkaste mutacije: G719X; G719A; G719C; G719S |
| 19 | Delecije Kompleksne mutacije |
| 20 | Tačkaste mutacije: S768I; T7980M Insercije |
| 21 | Tačkaste mutacije:L858R |

4.5. STATISTIČKA OBRADA (ANALIZA) PODATAKA

U cilju prikazivanja osnovnih karakteristika ispitanika i tumora korišćeni su elementarni pokazatelji deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardno odstupanje, minimalna, maksimalna vrednost, procenti) koji su kada je za tim bilo potrebe i grafički ilustrovani.

Raspodela posmatranih karakteristika (svojstava) u okviru postavljenih grupa je ispitivana χ^2 i Fišerovim neparametarskim testom, i to Fišerovim dvostranim testom ukoliko je neka od posmatranih grupa imala manje od 5 elemenata, u suprotnom korišćen je χ^2 -test. Sva izračunavanja su vršena sa rizikom od 5% i prezentovana preko p-vrednosti, gde vrednost $p < 0,05$ ukazuje na to da je razlika između posmatranih raspodela statistički značajna, tj. u slučaju $p > 0,05$ nema statistički značajne razlike među raspodelama. Vrednost $p < 0,001$ ukazuje na statistički veoma značajnu razliku.

Za poređenje srednjih vrednosti numerički iskazanih grupa podataka korišćen je t-test i metoda analize varijansi (ANOVA). U slučaju poređenja srednjih vrednosti za dve grupe podataka vršeni su neupareni (nezavisni) t-test (ako su grupe bile različite brojnosti ili ukoliko nije postojala veza među parovima podataka) i uparen (zavisni) t-test (ako je postojala veza među parovima podataka). Srednje vrednosti za više od dve grupe istovremeno su poređene analizom varijansi u okviru koje su korišćeni Takijev i Dankanov test. Na osnovu jednakosti srednjih vrednosti grupe su svrstavane u klase, gde istoj klasi pripadaju grupe među čijim srednjim vrednostima nema statistički značajne razlike. Takođe, preko p-vrednosti je iskazana i jednakost srednjih vrednosti posmatrana u čitavom modelu. Uzevši u obzir rizik od 5%, kao

i u slučaju neparametarskih testova, vrednost $p < 0,05$ ukazuje na to da je razlika između posmatranih srednjih vrednosti statistički značajna.

Jačina linearne korelacije među grupama podataka je iskazana preko Pirsonovog koeficijenta korelacije (r), gde vrednost $0,8 < |r| < 1$ ukazuje na jaku korelaciju, $0,5 < |r| < 0,8$ relativno jaku korelaciju, $0,3 < |r| < 0,5$ na slabu korelaciju i $|r| < 0,3$ veoma slabu korelaciju. Za $r > 0$ posmatrana korelacija je pozitivna (direktna), u suprotnom je reč o negativnoj (obrnuto srazmernoj) korelaciji.

Sva izračunavanja su vršena u statističkom softveru *Statistica 12*.

5. REZULTATI

Naše istraživanje je bilo delom retrospektivnog, a delom prospektivnog karaktera. U prospektivnom delu istraživanja određena je: imunohistohemijska ekspresija TTF-1 u hirurškim uzorcima, morfometrijska analiza biopsijskih uzoraka i EGFR molekularni status u biopsijskim i hirurškim uzorcima dok su ostali parametri istraživanja analizirani retrospektivno.

5.1. ISPITANICI, DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKE PROCEDURE I KARAKTERISTIKE PRIMARNOG TUMORA

5.1.1. Pol

U ovo istraživanje je bilo uključeno 60 bolesnika, 35 (58%) muškaraca i 25 (42%) žena u omeru 1,4:1 u korist muške populacije. Vrednost p ($p=0,068$) dobijena χ^2 -testom je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u brojnosti među polovima.

5.1.2. Starost

Ukupna prosečna starost svih bolesnika je iznosila $61,8 \pm 8,08$ godina (raspon od 43 do 79), kod muškaraca ($63,6 \pm 7,21$) i žena ($59,4 \pm 8,71$) godina. Vrednost p ($p=0,044$) dobijena t -testom je pokazala da postoji statistički značajna razlika između prosečne starosti muškaraca i žena.

U daljoj analizi starosne dobi bolesnike smo podelili u četiri starosne grupe sa intervalom od 10 godina. U ukupnoj populaciji najviše (24/60; 40%) bolesnika smo imali u drugoj grupi (51-60 god.), kod muškaraca (17/35; 49%) u trećoj grupi (61-70 god.), a žena u drugoj starosnoj grupi (13/25; 52%) (Tabela 9.). Iako je ženska populacija procentualno bila zastupljenija u prvoj i drugoj grupi (16/25; 64%), a muška u trećoj i četvrtoj grupi (23/35; 66%) dobijena vrednost neparametarskog Fišerovog testa ($p=0,112$) je pokazala da su polovi ravnomerno raspoređeni po prikazanim starosnim grupama.

Starost bolesnika smo posmatrali i u odnosu na postavljenu granicu od 65 godina. Sve bolesnike smo podelili u dve grupe (A<65 god. i B \geq 65 god.) (Tabela 9.). Vrednost p ($p<0,001$) dobijena χ^2 -testom je pokazala da u ukupnoj populaciji postoji statistički značajna razlika u brojnosti između grupe A i grupe B. Do istog zaključka smo došli i kada smo postavljenu starosnu granicu posmatrali odvojeno kod muškaraca i žena s tim da je grupa B manje zastupljena kod žena (20%) u odnosu na mušku populaciju (37%) (Tabela 9.).

Tabela 9. Distribucija bolesnika prema starosti i polu.

| Starosne grupe (godine) | Ukupno n (%) | Muškarci n (%) | Žene n (%) |
|-------------------------|--------------|----------------|------------|
| I (41-50) | 4 (7) | 1 (3) | 3 (12) |
| II (51-60) | 24 (40) | 11 (31) | 13 (52) |
| III (61-70) | 23 (38) | 17 (49) | 6 (24) |
| IV (71-80) | 9 (15) | 6 (17) | 3 (12) |
| A (<65) | 42 (80) | 22 (63) | 20 (80) |
| B (≥65) | 18 (20) | 13 (37) | 5 (20) |
| P | <0,001 | 0,032 | <0,001 |
| Ukupno | 60 (100) | 35 (100) | 100 |

5.1.3. Pušačke navike

Podaci o pušačkim navikama su preuzeti iz istorije bolesti i bili su poznati za sve bolesnike od kojih je 6/60 (10%) nepušača, 10/60 (17%) bivših pušača i 44/60 (73%) aktivnih pušača ($pack/year = 39,6 \pm 21,45$) (Tabela 10.). Primenom χ^2 -testa smo poredili raspodelu bolesnika u odnosu na pušačke navike. Dobijena vrednost p ($p < 0,001$) je pokazala da postoji statistički značajna razlika kada smo poredili grupu aktivnih pušača sa grupom nepušača i bivših pušača, dok razlika između broja bivših pušača i nepušača nije statistički značajna ($p = 0,408$).

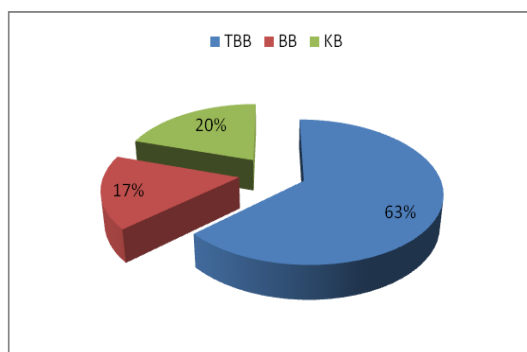
U daljoj analizi smo posmatrali odnos pušačkih navika i pola bolesnika. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je procenat aktivnih pušača najviši kod oba pola, ali je broj bivših pušača, u odnosu na ukupnu populaciju, procentualno značajno veći kod muškaraca, dok je procenat nepušača značajno veći kod žena (Tabela 10.). Razlike pušačkog statusa i pola bolesnika su analizirane Fišerovim testom. Dobijena vrednost p ($p = 0,044$) je pokazala da postoji statistički značajna razlika između pušačkog statusa muškaraca i žena.

Tabela 10. Distribucija bolesnika prema pušačkim navikama i polu.

| Pušačke navike | Ukupno n (%) | Muškarci n (%) | Žene n (%) |
|----------------|--------------|----------------|------------|
| Aktivni pušači | 44 (73) | 24 (68) | 20 (80) |
| Bivši pušači | 10 (17) | 9 (26) | 1 (4) |
| Nepušači | 6 (10) | 2 (6) | 4 (16) |

5.1.4. Dijagnostičke procedure

Kod svih bolesnika dijagnoza invazivnog adenokarcinoma pluća je postavljena u biopsijskim uzorcima dobijenim forceps biopsijom, a veličina uzoraka određena je u Centru za patologiju prilikom prijema materijala. Transbronhijalna biopsija (TBB) je sa udelom od 63% bila značajno češća dijagnostička tehnika uzorkovanja u odnosu na bronhobiopsiju (BB) i kateter biopsiju (KB) (Grafikon 3).



Grafikon 3. Distribucija dijagnostičkih procedura.

Prosečna veličina biopsijskih uzoraka je iznosila 1,32 mm (u rasponu od 1 do 3 mm), u 4 (7%) slučajeva veličinu nije bilo moguće odrediti te su ti uzorci označeni kao uzorci neodređene veličine.

5.1.5. Terapijske procedure

Kod svih bolesnika je urađena R0 resekcija tumora, najčešće lobektomija (45/60; 75%), dok je bilobektomija (2/60; 3%) i "wedge" resekcija (1/60; 2%) bila ređi vid hirurškog lečenja (Tabela 11.). Raspodela tipova hirurške intervencije po polu bolesnika primenom Fišerovog testa je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli tipa hirurške intervencije među polovima p (p=0,405).

Tabela 11: Distribucija tipa hirurške procedura prema polu.

| Tip resekcije tumora | Ukupno n (%) | Muškarci n (%) | Žene n (%) |
|----------------------|--------------|----------------|------------|
| Lobektomija | 45 (75) | 25 (71) | 20 (80) |
| Pneumonektomija | 12 (20) | 8 (23) | 4 (16) |
| Bilobektomija | 2 (3) | 2 (6) | 0 (0) |
| "Wedge" resekcija | 1 (2) | 0 (0) | 1 (4) |

5.1.6. Makroskopske karakteristike tumora

S obzirom na anatomsku lokalizaciju tumori su podeljeni u pet grupa koje odgovaraju anatomske građi pluća. Najviše tumora se nalazilo u gornjem desnom režnju kako u ukupnoj populaciji (24/60; 40%) tako i kod oba pola [muškaraca (16/35; 46%) i žena (8/25; 32%)] (Tabela 12.). Poredeći grupe anatomske raspodele tumora prema polovima primenom Fišerovog testa dobijena vrednost p ($p=0,333$) je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika među njima.

U daljoj analizi smo posmatrali lokalizaciju tumora na desnoj i levoj strani pluća i uočili da su tumori u ukupnoj populaciji češće lokalizovani desno (60%) kao i kod muškaraca (71%), ali ne i žena (44%) (Tabela 12.). Poređenjem podele tumora na desnoj i levoj strani i prema polu, vrednost p ($p=0,033$) dobijena χ^2 -testom je pokazala da je uočena razlika statistički značajna.

Tabela 12. Distribucija tumora prema anatomske lokalizaciji i polu.

| Anatomska lokalizacija tumora | Ukupno n (%) | Muškarci n (%) | Žene n (%) |
|-------------------------------|--------------|----------------|------------|
| Gornji desni | 24 (40) | 16 (46) | 8 (32) |
| Srednji | 5 (8) | 4 (11) | 1 (4) |
| Donji desni | 7 (12) | 5 (14) | 2 (8) |
| Gornji levi | 12 (20) | 5 (14) | 7 (28) |
| Donji levi | 12 (20) | 5 (14) | 7 (28) |
| Distribucija desno/levo | | | |
| Desno | 36 (60) | 25 (71) | 11 (44) |
| Levo | 24 (40) | 10 (29) | 14 (56) |

Prosečna veličina tumora u ukupnoj populaciji je iznosila $54,4 \pm 24,39$ (u rasponu od 9 do 140 mm), muškaraca (54,7 mm) i žena (53,9 mm). Posmatranjem prosečne veličine tumora kod muškaraca i žena primetna je bliskost u dobijenim vrednostima, odnosno p vrednost ($p=0,914$) dobijena t-testom, ubedljivo je pokazala da među njima nema statistički značajne razlike.

S obzirom na veličinu tumori su podeljeni u četiri klase: I (0-20 mm), II (21-30 mm), III (31-50 mm) i IV (više od 50 mm). U ukupnoj populaciji i kod muškaraca najfrekvntnija je III klasa dok su kod žena tumori najfrekvntniji u IV klasi. Poređenjem veličine tumora,

posmatrane po klasama, među polovima vrednost p ($p=0,147$) dobijena Fišerovim testom je pokazala da nema statistički značajne razlike u veličini tumora među polovima, posmatrano po definisanim klasama (Tabela 13.).

Tabela 13. Distribucija tumora prema veličini i polu.

| Veličina tumora (mm) | Ukupno n (%) | Muškarci n (%) | Žene n (%) |
|----------------------|--------------|----------------|------------|
| 0-20 | 2 (3) | 0 (0) | 2 (8) |
| 21-30 | 6 (10) | 3 (9) | 3 (12) |
| 31-50 | 25 (42) | 18 (51) | 7 (28) |
| >50 | 27 (45) | 14 (40) | 13 (52) |

5.1.7. Patološki stadijum bolesti

Kod svih bolesnika je nakon hirurške intervencije i patohistološke analize određen patološki stadijum bolesti. Najfrekvenciji stadijum u ukupnoj populaciji je bio IIB (18/60; 30%), kod muškaraca IB i IIB (sa udelom od po 31%) i kod žena IIA (32%). Najmanje bolesnika u ukupnoj populaciji je bilo u IA (5%), kod muškaraca u IA (3%) i žena u IB (4%) stadijumu bolesti (Tabela 14.). Činjenica da je IB stadijum kod žena najređi, a kod muškaraca zajedno sa IIB najfrekvenciji i p vrednost ($p=0,030$) dobijena neparametarskim Fišerovim testom je pokazala da je uočena razlika između stadijuma bolesti i pola statistički značajna.

U daljoj analizi posmatrali smo odnos između stadijuma bolesti i starosnih grupa. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 13. Analizirajući ovaj odnos, vrednost p ($p=0,920$) dobijena Fišerovim neparametarskim testom je pokazala da postoji velika sličnost u raspodeli stadijuma bolesti po starosnim grupama.

Tabela 14. Distribucija bolesnika prema patološkom stadijumu bolesti, polu i starosnim grupama.

| Stadijum bolesti | Ukupno n (%) | Muškarci n (%) | Žene n (%) | Starosne grupe | | | |
|------------------|--------------|----------------|------------|----------------|-------|-------|-------|
| | | | | 41-50 | 51-60 | 61-70 | 71-80 |
| IA | 3 (5) | 1(3) | 2 (8) | 0 | 1 | 2 | 0 |
| IB | 12 (20) | 11(31) | 1 (4) | 1 | 3 | 5 | 3 |
| IIA | 17 (28) | 9 (26) | 8 (32) | 1 | 9 | 5 | 2 |
| IIB | 18 (30) | 11(31) | 7 (28) | 2 | 6 | 7 | 3 |
| IIIA | 10 (17) | 3(9) | 7 (28) | 0 | 5 | 4 | 1 |

5.2. TKIVNI UZORCI DOBIJENI HIRURŠKOM RESEKCIJOM

Svi hirurški uzorci s tumorom su pregledani od strane dva patologa koji su u slučaju neslaganja do krajnjeg rezultata došli konsenzusom. Prosečno je pregledano $4,8 \pm 1,62$ (raspona od 1 do 11) uzoraka sa tumorom u prosečno $9,4 \pm 3,47$ (od 2 do 23) histoloških rezova bojenih H&E metodom. Dobijeni Pirsonov koeficijent korelacije $r=0,31$ pokazuje da postoji relativno slaba korelacija između broja uzoraka sa tumorom i veličine tumora.

5.2.1. Kompleksnost histološke građe adenokarcinoma

Ćelije adenokarcinoma su u hirurškim uzorcima pokazivale pet tipova histoloških aranžmana: lepidični, acinarni, papilarni, mikropapilarni i solidni. Tumor sagrađen od jednog aranžmana smo smatrali čistim (homogenim) dok su mešani tumori imali dva ili više aranžmana. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je više bilo mešanih tumora (48/60, 80%), od čega su najfrekventniji bili tumori sa dva aranžmana (36/60; 60%) (Tabela 15.). Poredeći broj homogenih i heterogenih tumora vrednost p ($p < 0,001$) dobijena primenom χ^2 neparametarskog testa je pokazala da je uočena razlika i statistički značajna.

Tabela 15: Histološka građa i broj histoloških aranžmana u adenokarcinomu.

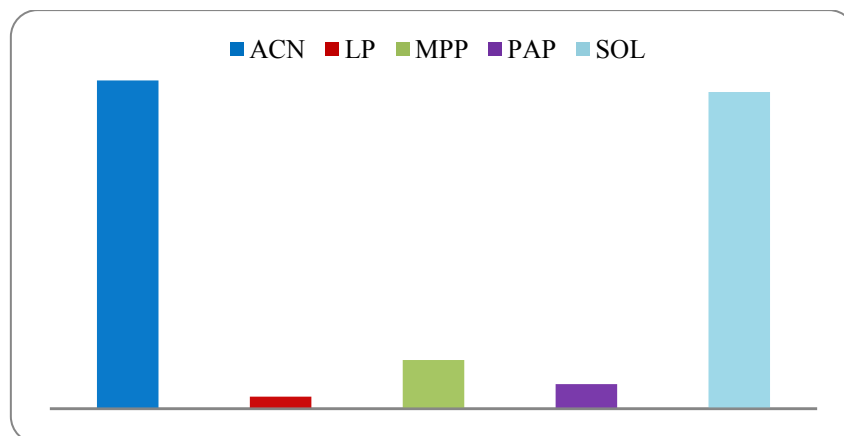
| Heterogenost tumora | Broj (%) |
|---------------------|----------|
| Čisti | 12 (20) |
| Mešani | 48 (80) |
| Broj aranžmana | |
| Jedan | 12 (20) |
| Dva | 36 (60) |
| Tri | 10 (17) |
| Četiri | 2 (3) |
| Pet | 0 (0) |
| Ukupno | 60 (100) |

5.2.2. Predominantni histološki tip

Sve hirurške uzorke smo reklasifikovali na osnovu IATSL/ATS/ERS kriterijuma evidentirajući procentualnu zastupljenost svakog histološkog tipa koji se nalazio u $\geq 5\%$

celokupnog tumora, a zatim smo odredili predominantni tip, odnosno tip koji je bio procentualno najzastupljeniji.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je najfrekventniji predominantni tip acinarni (27/60; 45%), zatim solidni (26/60; 43%), dok su mikropapilarni, papilarni i lepidični zastupljeni u malom broju slučajeva (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Distribucija adenokarcinoma prema predominantnom tipu.

5.2.2.1. Povezanost predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama bolesnika

Povezanost predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama bolesnika (pol, starost i pušačke navike) je prikazana u tabeli 16. Koristeći χ^2 neparametarski test pokazali smo da postoji statistički značajna jednakost u raspodeli predominantnih tipova po polu ($p=0,608$).

Posmatrajući povezanost predominantnog tipa sa prosečnom starosti ispitanika našli smo da su vrednosti ujednačene. Kod jedinog ispitanika sa lepidično predominantnim tipom evidentirana je starost od 58 godina, dok je najveća prosečna starost (66,5 god.) zabeležena u grupi ispitanika sa mikropapilarno predominantnim tipom. U dva najfrekventnija predominantna tipa (acinarni i solidni) prosečna starost je bila slična (62,5 i 60,7 godina). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je prosečna starost muškaraca i žena u najfrekventnijim predominantnim tipovima (acinarni, solidni i mikropapilarni) slična, s tim da su muškarci u acinarno predominantnom tipu bili za 6,7 godina stariji u odnosu na žene.

Svi bolesnici su s obzirom na starost svrstani u četiri starosne grupe sa intervalom od 10 godina. Najveći broj bolesnika sa najfrekventnijim predominantnim tipovima (acinarni i solidni) je bio star između 51 i 70 godina s tim da je u osmoj deceniji evidentiran nešto veći broj bolesnika sa acinarno predominantnim tipom u odnosu na solidni tip (Tabela 16.).

Posmatrajući povezanost predominantnog tipa s pušačkim navikama uočili smo da je kod najvećeg broja pušača (40/44; 91%) predominantni tip bio acinarni i solidni, dok je kod polovine nepušača (3/6; 50%) evidentiran acinarno predominantni tip (18% vs 8%) (Tabela 16.).

Tabela 16: Odnos predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama bolesnika.

| | LP n (%) | ACN n (%) | PAP n (%) | MPP n (%) | SOL n (%) |
|------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Pol | | | | | |
| Muškarci | 1 (100) | 17 (63) | 1 (50) | 1 (25) | 15 (58) |
| Žene | 0 (0) | 10 (37) | 1 (50) | 3 (75) | 11 (42) |
| Starost (godine) | | | | | |
| 41-50 | 0 (0) | 1 (4) | 1 (50) | 0 (0) | 2 (8) |
| 51-60 | 1 (100) | 11 (41) | 0 (0) | 1 (25) | 11 (42) |
| 61-70 | 0 (0) | 10 (37) | 0 (0) | 2 (50) | 11 (42) |
| 71-80 | 0 (0) | 5 (18) | 1 (50) | 1 (25) | 2 (8) |
| Pušačke navike | | | | | |
| Aktivni pušači | 0 (0) | 18 (67) | 1 (50) | 3 (75) | 22 (85) |
| Bivši pušači | 0 (0) | 6 (22) | 1 (50) | 0 (0) | 3 (11) |
| Nepušači | 1 (100) | 3 (11) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (4) |

5.2.2.2. Povezanost predominantnog tipa s karakteristikama primarnog tumora

U ovom istraživanju smo analizirali povezanost predominantnog tipa sa karakteristikama primarnog tumora (prosečna veličina, veličina tumora podeljena po klasama, patološki T stadijum tumora i stadijum bolesti). Podaci o navedenom odnosu su prikazani u tabeli 17.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je najmanja prosečna veličina tumora evidentirana u acinarnom (48,7; u rasponu od 20 do 130 mm) i lepidičnom (55 mm) predominantnom tipu, nešto veća u papilarnom (57,5; u rasponu od 55 do 60 mm) i solidnom (55,7; u rasponu od 9 do 140 mm) predominantnom tipu, dok je najveća u mikropapilarnom predominantnom tipu (82,2; u rasponu od 54 do 105 mm). Prosečna veličina tumora u predominantnim tipovima kod muškaraca i žena je sličnih vrednosti s tim da je kod acinarno predominantnog tipa

neznatno veća kod muškaraca u odnosu na žene, dok je u slučaju solidno, papilarno i mikropapilarno predominantnog tipa situacija obrnuta.

S obzirom na veličinu svi slučajevi adenokarcinoma su podeljeni u četiri klase. Dva najfrekventnija predominantna tipa (acinarni i solidni) su najzastupljeniji u trećoj i četvrtoj klasi (od 31 do >50 mm) sa udelom od 45/60 (75%) s tim da je kod acinarno predominantnog tipa primećen manji broj tumora većih od 50 mm u odnosu na solidno predominantni tip (8 vs 12). Prosečna veličina tumora u slučaju svih lepidično, papilarno i mikropapilarno predominantnih tipova je bila veća od 50 mm (Tabela 17.).

U svim slučajevima određen je patološki stadijum tumora (pT) i izvršena raspodela predominantnih tipova prema ovom stadijumu (Tabela 17.). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su svi papilarno i lepidično predominantni tipovi bili u stadijumu pT2b, mikropapilarni u stadijumu pT3 dok su acinarno i solidno predominantni tipovi bili podjednako raspoređeni po pT stadijumima. Vrednost p ($p=0,198$) dobijena primenom Fišerovog neparametarskog testa je pokazala da postoji jednaka raspodela predominantnih tipova po pT stadijumu.

Raspodela predominantnih tipova prema patološkom stadijumu bolesti je prikazana u tabeli broj 17. U ovom istraživanju evidentirali smo da se svi papilarno i lepidično predominantni tipovi nalaze u IIA stadijumu dok su mikropapilarno predominantni tipovi podjednako raspoređeni u višim stadijumima bolesti (IIB i IIIA). Najfrekventniji predominantni tipovi (acinarni i solidni) su podjednako raspoređeni u svim stadijumima bolesti. Vrednost $p=0,571$ dobijena Fišerovim neparametarskim testom je ukazala na statistički jednaku raspodelu predominantnih tipova po stadijumu bolesti.

Tabela 17: Odnos predominantnog tipa i karakteristika primarnog tumora.

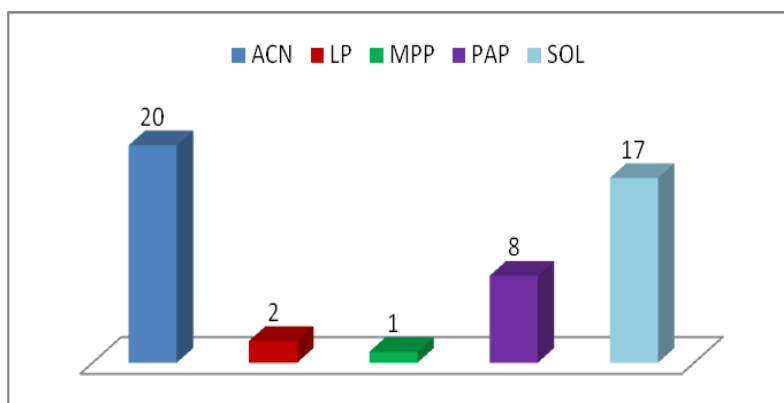
| Prosečna veličina (mm) | Ukupno | LP | ACN | PAP | MPP | SOL |
|------------------------|---------|-------|---------|-------|-------|---------|
| Ukupno | 54,37 | 55,0 | 48,7 | 57,5 | 82,2 | 55,7 |
| Muškarci | 54,66 | 55,0 | 53,2 | 55,0 | 10,0 | 53,2 |
| Žene | 53,96 | 0 | 41,0 | 60,0 | 76,3 | 59,1 |
| Veličina tumora (mm) | | | | | | |
| 0-20 | 2 (3) | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (4) |
| 21-30 | 6 (10) | 0 (0) | 4 (15) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (8) |
| 31-50 | 25 (42) | 0 (0) | 14 (52) | 0 (0) | 0 (0) | 11 (42) |

Nastavak tabele 17.

| | | | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| >50 | 27 (45) | 1 (100) | 8 (29) | 2 (100) | 4 (100) | 12 (46) |
| pT | | | | | | |
| pT1b | 6 (10) | 0 (0) | 4 (15) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (8) |
| pT2a | 19 (32) | 0 (0) | 10 (37) | 0 (0) | 0 (0) | 9 (34) |
| pT2b | 16 (26) | 1 (100) | 6 (22) | 2 (100) | 0 (0) | 7 (27) |
| pT3 | 18 (30) | 0 (0) | 6 (22) | 0 (0) | 4 (100) | 8 (31) |
| pT4 | 1 (2) | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 0 (0) | 50 (0) |
| Stadijum bolesti | | | | | | |
| IA | 3 (5) | 0 (0) | 2 (7) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (4) |
| IB | 12 (20) | 0 (0) | 6 (22) | 0 (0) | 0 (0) | 6 (23) |
| IIA | 17 (28) | 1 (100) | 8 (30) | 2 (100) | 0 (0) | 6 (23) |
| IIB | 18 (30) | 0 (0) | 8 (30) | 0 (0) | 2 (50) | 8 (31) |
| IIIA | 10 (17) | 0 (0) | 3 (11) | 0 (0) | 2 (50) | 5 (19) |

5.2.3. Sekundarni histološki tip

Kod svih mešanih tumora evidentirali smo procentualnu zastupljenost preostalih histoloških tipova. Tip koji je po procentualnoj zastupljenosti bio iza predominantnog smatrali smo sekundarnim tipom. Sekundarni tip je zabeležen kod 48/60 (80%) slučajeva, od kojih su acinarni i solidni bili najzastupljeniji sa ukupnim udelom od 37/48 (77%). Papilarno, lepidično i mikropapilarno predominantni tipovi su češće bili sekundarni nego predominantni tipovi (Grafikon 5.).



Grafikon 5. Distribucija sekundarnih tipova.

5.2.4. Prognostičke grupe

S obzirom na prognostički značaj svi adenokarcinomi su klasifikovani u tri prognostičke grupe. U grupi sa dobrom prognozom se nalazio lepidično predominantni tip koji je u ovom istraživanju evidentiran samo u jednom slučaju 1/60 (2%). U grupi sa umerenom prognozom su bili acinarno i papilarno predominantni tip (29/60; 48%) dok je grupa sa lošom prognozom (mikropapilarno i solidno predominantni tip) bila najzastupljenija (30/60; 50%).

5.2.5. Imunohistohemijska evaluacija

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su četiri standardna imunohistohemijska bojenja namenjena pre svega za diferencijaciju adenokarcinoma od skvamoznog karcinoma (TTF-1, CK7, CK 5/6 i p63) urađena kod malog broja bolesnika, kod devet u biopsijskim uzorcima i kod četiri na hirurški reseciranom materijalu. Histochemijska metoda bojenja (PAS/AB) je urađena jednom slučaju i to u biopsijskom uzorku.

Imunohistohemijska evaluacija nuklearne ekspresije TTF-1 je izvršena u prospektivnom delu istraživanja od strane dva patologa. Karakteristike i rezultati TTF-1 ekspresije su prikazani u tabeli 18. TTF-1 pozitivna ekspresija je evidentirana u 52/60 (87%) slučajeva. Poredeći broj TTF-1 negativnih i TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma vrednost p ($p < 0,001$) dobijena neparametarskim χ^2 -testom je pokazala da postoji statistički značajna razlika među njima.

U daljoj analizi poredili smo pušačke navike bolesnika sa TTF-1 pozitivnim i TTF-1 negativnim adenokarcinomom, vrednost p ($p = 0,649$) dobijena neparametarskim χ^2 -testom je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli pušačkih navika među njima.

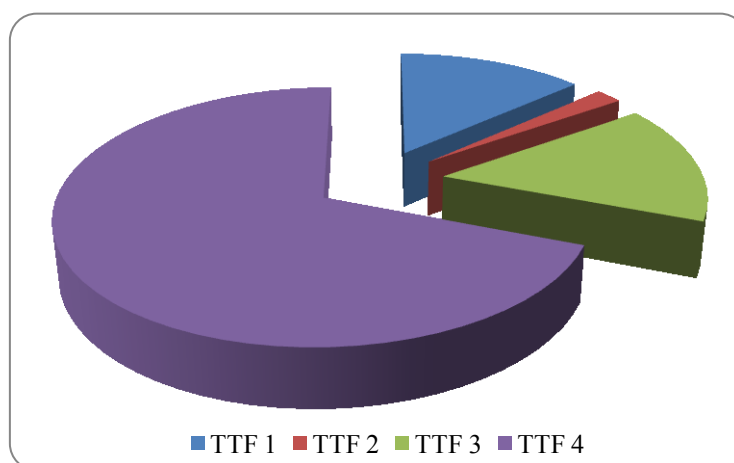
Kada smo poredili polnu distribuciju u grupi TTF-1 negativnih i TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma vrednost p ($p = 0,123$) dobijena neparametarskim χ^2 -testom je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika među njima.

Poredeći prosečnu veličinu tumora između TTF-1 pozitivnih i TTF-1 negativnih adenokarcinoma vrednost p ($p = 0,210$) dobijena t-testom je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika među njima.

Tabela 18: Distribucija TTF-1 ekspresije prema kliničko-patološkim karakteristikama

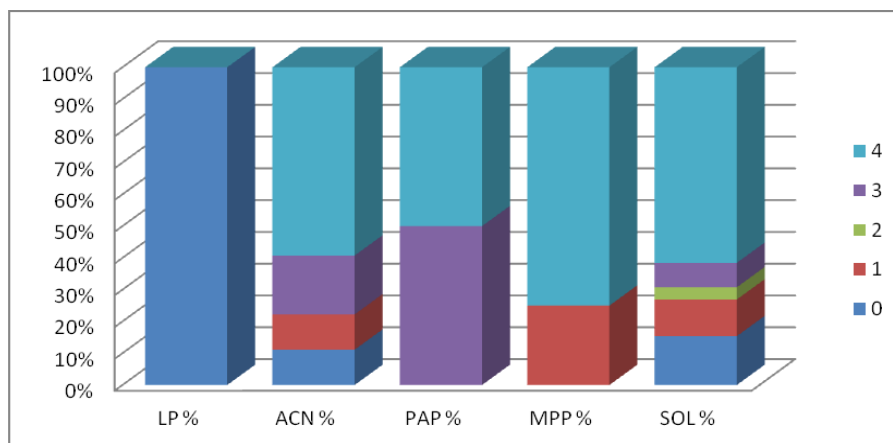
| TTF-1 ekspresija | Negativan n (%) | Pozitivan n (%) |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| Ukupno | 8 (13) | 52 (87) |
| Pol | | |
| Muškarci | 7 (88) | 28 (54) |
| Žene | 1 (12) | 24 (46) |
| Prosečna starost | 62. 25 | 61. 77 |
| Pušačke navike | | |
| Nepušači | 1 (12.5) | 5 (10) |
| Bivši pušači | 2 (25.0) | 7 (13) |
| Aktivni pušači | 5 (62.5) | 40 (77) |
| Veličina tumora (mm) | | |
| Prosečna | 64,5 | 52,8 |
| Rang veličine (mm) | 25-100 | 90-140 |

S obzirom na procenat tumorskih ćelija koje pokazuju pozitivnu TTF-1 ekspresiju i na intenzitet imunohistohemijske ekspresije sve TTF-1 pozitivne adenokarcinome smo podelili u četiri skora od kojih je skor 4 (intenzivna nuklearna ekspresija u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija) bio najfrekventniji (36/52; 69%), dok je skor 2 (nuklearna ekspresija blagog intenziteta u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija) bio najređi (1/52; 2%) (Grafikon 6.).



Grafikon 6. Distribucija skora TTF-1 ekspresije.

Odnos između TTF-1 skora i predominantnog tipa je prikazan grafički (Grafikon 7.). U dva najfrekventnija predominantna tipa (acinarni i solidni) TTF-1 ekspresija je evidentirana u više od 80%, kod acinarno predominantnog u 24/27; (89%) i kod solidno predominantnog u 22/26 (85%) dok su svi papilarno i mikropapilarno predominantni TTF-1 pozitivni, a jedini lepidično predominantni TTF-1 negativan. Vrednost p ($p=0,633$) dobijena χ^2 neparametarskim testom je pokazala da nema statistički značajne razlike u raspodeli TTF skora u najfrekventnijim predominantnim tipovima (acinarni i solidni).



Grafikon 7. Distribucija skora TTF-1 skora prema predominantnom tipu.

5.2.6. Limfogene metastaze

Od ukupnog broja bolesnika kod 25 (42%) nađene su metastaze u limfnim čvorovima od toga kod 21 u intrapulmonalnim, hilarnim i interlobarnim (N1) i kod četiri u mediastinalnim (N2) limfnim čvorovima. Metastaze su bile čiste (jedan histološki aranžman) kod 20 i mešane (dva histološka aranžmana) kod pet bolesnika. Od 25 bolesnika sa metastazama u limfnim čvorovima primarni tumori su bili čisti (jedan histološki aranžman) kod četiri i mešani (≥ 2 histološka aranžmana) kod 21 bolesnika.

5.2.6.1. Odnos između predominantnog tipa u primarnom tumoru i predominantnog tipa u limfogenim metastazama

Bez obzira na broj histoloških aranžmana u limfnim čvorovima predominantni su bili acinarni (13) i solidni (12) tip. Kod 19/25 bolesnika predominantni tip u limfnom čvoru bio je identičan sa predominantnim tipom u primarnom tumoru [acinarni (9) i solidni (10)]. Kod preostalih šest bolesnika nije uočeno poklapanje između predominantnog tipa u primarnom tumoru sa predominantnim tipom u limfogenim metastazama (Tabela 19.).

Tabela 19. Odnos između predominantnog tipa u primarnom tumoru i limfogenim metastazama

| Predominantni tip u primarnom tumoru | Predominantni tip u limfogenim metastazama | | | | | |
|--------------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|--------|
| | LP | ACN | PAP | MPP | SOL | Ukupno |
| LP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ACN | 0 | 9 | 0 | 0 | 2 | 11 |
| PAP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MPP | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| SOL | 0 | 2 | 0 | 0 | 10 | 12 |
| Ukupno | 0 | 13 | 0 | 0 | 12 | 25 |

5.2.6.2. Odnos između sekundarnog tipa u primarnom tumoru i predominantnog tipa u limfogenim metastazama

Odnos između sekundarnog tipa u primarnom tumoru i predominantnog tipa u limfogenim metastazama je prikazana u tabeli 19. Kod pet bolesnika uočeno je poklapanje predominantnog tipa u limfnom čvoru sa sekundarnim tipom u primarnom tumoru [acinarni (3) i solidni (2)] dok kod preostalih 16 bolesnika ovo poklapanje nije uočeno (Tabela 20.).

Tabela 20. Odnos između predominantnog tipa u limfogenim metastazama i sekundarnog tipa u primarnom.

| Predominantni tip u limfnim čvorovima | Sekundarni tip u primarnom | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|--------|
| | LP | ACN | PAP | MPP | SOL | Ukupno |
| LP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ACN | 1 | 3 | 3 | 1 | 4 | 12 |
| PAP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MPP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SOL | 0 | 6 | 1 | 0 | 2 | 9 |
| Ukupno | 1 | 9 | 4 | 1 | 6 | 21 |

5.2.6.3. Odnos između sekundarnog tipa u limfogenim metastazama sa histološkom građom primarnog tumora

Mikropapilarni tip je bio sekundarni tip u limfogenim metastazama kod dva bolesnika od kojih je u jednom slučaju ovaj tip bio dominantan u primarnom tumoru dok je u drugom

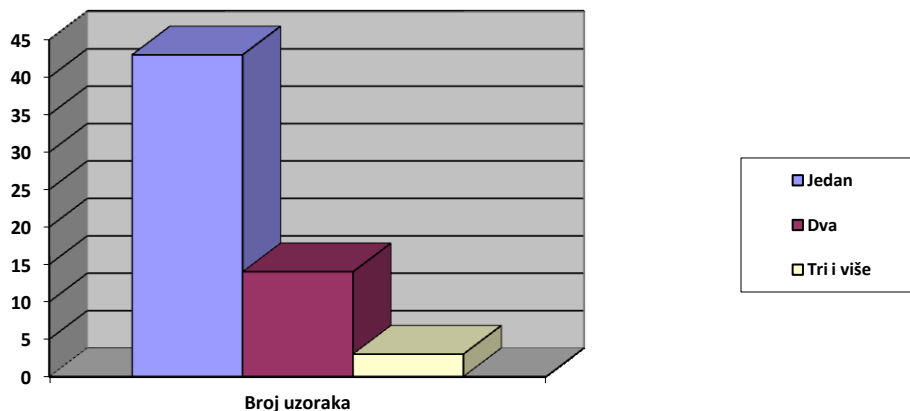
slučaju sa udelom od 10% bio iza acinarnog i solidnog tipa. U tri slučaja sekundarni tip u limfogenim metastazama je bio acinarni tip koji je bio sekundarni tip primarnim tumorima.

5.3. TKIVNI UZORCI DOBIJENI BIOPSIJOM

5.3.1. Histološka evaluacija biopsijskih uzoraka

Biopsijski uzorci: transbronhijalna biopsija pluća-TBB , bronhobiopsija-BB i kateter biopsija-KB su sečeni na prosečno $16,3 \pm 6,63$ (ranga od 4 do 44) histoloških rezova koji su bojeni standardnom H&E metodom bojenja i reklasifikovani na osnovu IATSL/ATS/ERS kriterijuma.

Tumor sagrađen od jednog aranžmana smo smatrali čistim (homogenim) dok su mešani (heterogeni) tumori imali dva ili više aranžmana. Broj slučajeva sa jednim histološkim aranžmanom (43/60; 72%) je značajno veći od broja slučajeva sa dva i više aranžmana (17/60; 18%). Dva histološka aranžmana su nađena kod 14 (23%), tri kod 3 (5%) biopsijskih uzoraka, uzorci s više od tri aranžmana nisu evidentirani (Grafikon 8.). Vrednost p ($p < 0,001$) dobijena primenom χ^2 neparametarskog testa je pokazala da postoji statistički značajna razlika između broja homogenih i heterogenih tumora u biopsijskim uzorcima.



Grafikon 8. Distribucija biopsijskih uzoraka prema broju histoloških aranžmana.

Analizirajući frekventnost predominantnih tipova u biopsijskim uzorcima rezultati ovog istraživanja su pokazali da je acinarno predominantni tip bio najzastupljeniji u svim uzorcima (35/60; 58%), dok su lepidično predominantni i mikropapilarno predominantni bili zastupljeni u manjem broju (Tabela 21.).

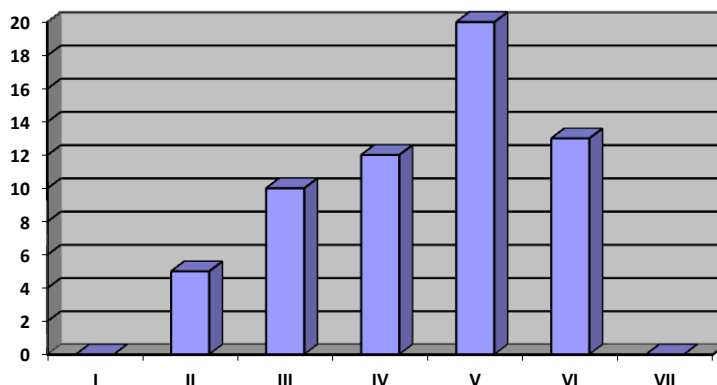
U daljem istraživanju smo odredili frekventnost sekundarnih tipova u svim heterogenim tumorima. Od svih sekundarnih tipova najučestaliji je bio acinarni (8/17; 47%) dok su lepidični, mikropapilarni i papilarni bili ređi (Tabela 21.).

Tabela 21: Zastupljenost dominantnog i sekundarnog tipa u biopsijskim uzorcima.

| | Ukupno n (%) | LP n (%) | ACN n (%) | PAP n (%) | MPP n (%) | SOL n (%) |
|---------------|--------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Predominantni | 60 | 1 (2) | 35 (58) | 1 (2) | 2 (3) | 21 (35) |
| Sekundarni | 17 | 1 (6) | 8 (47) | 2 (12) | 2 (12) | 4 (23) |

Mikroskopskom analizom smo odredili broj biopsijskih uzoraka. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je bilo prosečno 1,96 (u rasponu od 1 do 7) biopsijskih uzoraka, od kojih je prosečno 1,5 uzoraka bilo sa tumorom. Od svih najfrekventniji su slučajevi s jednim (21/60; 35%) i dva (21/60; 35%) biopsijska uzorka, zatim sa tri (12/60; 20%) dok su oni sa četiri (1/60, 2%) i sedam (1/60; 2%) uzoraka bili retki. U četiri slučaja (4/60; 6, 67%) broj biopsijskih uzoraka nije bilo moguće odrediti.

S obzirom na broj očuvanih tumorskih ćelija (TĆ) svi biopsijski uzorci su klasifikovani u sedam grupa (I ≤ 20 TĆ; II 21-50 TĆ; III 51-100 TĆ; IV 101-200 TĆ; V 201-500 TĆ; VI 501-1000 TĆ; VII >1000 TĆ) (Grafikon 9.). U grupi sa više od 200 TĆ, a manje od 500 TĆ nalazilo se najviše uzoraka (n=20; 33%), a najmanje (n=5; 8%) uzoraka bilo je u grupi koja sadrži više od 20 TĆ, a manje od 50 TĆ, uz napomenu da grupe sa manje od 20 TĆ i više od 1000 TĆ u ovom istraživanju nismo evidentirali.



Grafikon 9. Distribucija biopsijskih uzoraka s obzirom grupe očuvanih tumorskih ćelija.

5.3.2. Morfometrijska analiza biopsijskih uzoraka

U svim biopsijskim uzorcima smo odredili procenat volumenske gustine tumorskog tkiva (PVT) i procenat volumenske gustine netumorskog tkiva (PVNT).

U različitim tipovima biopsije (TBB, BB i KB) poredili smo procenat volumenske gustine tumorskog tkiva (Tabela 22.). Vrednost p ($p=0,360$) dobijena korištenjem metode analize varijansi (ANOVA) je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika između srednjih vrednosti procenta volumenske gustine tumorskog tkiva u posmatranim tipovima biopsije.

U daljem istraživanju smo poredili odnos između procenta volumenske gustine tkiva u predominantnom tipu u 58 biopsijskih uzoraka (Tabela 22.). Iz istraživanja su isključeni uzorci sa lepidično i papilarno predominantnim tipom jer su bili zastupljeni samo u po jednom slučaju.

Vrednost p ($p=0,857$) dobijena metodom analize varijansi je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika između procenta volumenske gustine tumorskog tkiva i predominantnog tipa.

Procenat volumenske gustine tumorskog tkiva smo poredili i u odnosu na grupe ćelija formirane u odnosu na broj tumorskih ćelija (grupe od I do VII) (Tabela 22.). Vrednost p ($p<0,001$) dobijena ANOVA analizom je pokazala da postoji statistički značajna razlika među njima, odnosno da se srednje vrednosti procenta volumenske gustine tumorskog tkiva u grupi V (201-500 TC) i grupi VI (501-1000 TC) statistički značajno razlikuju u odnosu na ostale grupe u kojima je manje od 200 tumorskih ćelija.

Tabela 22: Odnos između procenta volumenske gustine tumorskog tkiva i tipa biopsije, predominantnog tipa i broja očuvanih tumorskih ćelija.

| Karakteristike | Broj (%) | PVT |
|------------------------|----------|--------------------|
| Tip biopsije | | |
| TBB | 38 (63) | 21,63 ^a |
| BB | 10 (17) | 31,22 ^a |
| KB | 12 (20) | 21,80 ^a |
| Predominantni tip u By | | |
| ACN | 35 (60) | 22,30 ^a |
| SOL | 21(36) | 24,83 ^a |
| MPP | 2 (4) | 27,56 ^a |

Nastavak tabele 22

| Grupe ćelija (broj ćelija) | | |
|----------------------------|---------|--------------------|
| I (≤ 20) | 0 (0) | 0 |
| II (21-50) | 5 (8) | 6,64 ^a |
| III (51-100) | 10 (17) | 10,95 ^a |
| IV (101-200) | 12 (20) | 10,87 ^a |
| V (201-500) | 20 (33) | 31,63 ^b |
| VI (501-1000) | 13 (22) | 37,70 ^b |
| VII (> 1000) | 0 (0) | 0 |

Legenda: malim slovima su obeležene klase kojima pripadaju srednje vrednosti, dobijene ANOVA analizom)

Od interesa za ovo istraživanje je bila i analiza procenta volumenske gustine tumorskog tkiva u biopsijskim uzorcima pri postavljenoj granici od 10%. Od ukupnog broja uzoraka 19/60 (32%) je bilo sa manje od 10%, dok je 41/60 (68%) bilo sa $\geq 10\%$ PVT. Vrednost p ($p < 0,001$) dobijena χ^2 -testom je pokazala da je uočena razlika statistički značajna.

5.4. PODUDARNOST IZMEĐU HISTOLOŠKIH KARAKTERISTIKA TUMORA U BIOPSIJSKIM UZORCIMA I UZORCIMA DOBIJENIM HIRURŠKOM RESEKCIJOM

5.4.1. Podudarnost histološke građe

U ovom istraživanju smo poredili broj homogenih i heterogenih tumora u biopsijskim i u hirurškim uzorcima kao i njihov međusobni odnos (Tabela 23.). Vrednost p ($p < 0,001$) dobijena χ^2 neparametarskim testom je pokazala da postoji statistički značajna razlika u broju homogenih i heterogenih tumora u biopsijskim i hirurškim uzorcima.

Distribucija predominantnih tipova u biopsijskim i hirurškim uzorcima sa odgovarajućim p vrednostima je prikazana u tabeli 23. Fišerovim neparametarskim testom ($p = 0,656$) je potvrđeno da uočena razlika u raspodeli pacijenata sa određenim predominantnim tipom u hirurškim i biopsijskim uzorcima nije statistički značajna.

Tabela 23: Distribucija tumora s obzirom heterogenost tumora i predominantni tip u biopsijskim i hirurškim uzorcima.

| Karakteristike | Biopsijski uzorci n (%) | Hirurški uzorci n (%) | P |
|---------------------|-------------------------|-----------------------|-------|
| Heterogenost tumora | | | |
| Čisti | 43 (72) | 12 (20) | |
| Mešani | 17 (18) | 48 (80) | |
| Predominantni tip | | | |
| LP | 1 (2) | 1 (2) | 1 |
| ACN | 35 (58) | 27 (45) | 0,144 |
| PAP | 1 (2) | 2 (3) | 1 |
| MPP | 2 (3) | 4 (7) | 0,680 |
| SOL | 21 (35) | 26 (43) | 0,350 |

5.4.2. Podudarnost između predominantnih tipova

Kod svih bolesnika izvršena je analiza poklapanja predominantnog tipa u biopsijskom i hirurškom uzorku. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je u 80% slučajeva predominantni tip identičan u obe grupe uzoraka. Od preostalih 20% slučajeva koji imaju lepidično, papilarno, mikropapilarno i solidno predominantni tip u hirurškom uzorku u biopsijskim uzorku je predominantni tip bio acinarni, dok se u dva slučaja kada je predominantni tip u hirurškom uzorku acinarni u biopsijskom je predominantni lepidični i solidni (Tabela 24.).

Tabela 24: Odnos između predominantnih tipova u hirurškim i biopsijskim uzorcima.

| Hirurški uzorci | Biopsijski uzorci | | | | | Ukupno n (%) |
|-----------------|-------------------|---------|-------|-------|---------|--------------|
| | LP | ACN | PAP | MPP | SOL | |
| LP | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 (2) |
| ACN | 1 | 25 | 0 | 0 | 1 | 27 (45) |
| PAP | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 (3) |
| MPP | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 (7) |
| SOL | 0 | 6 | 0 | 0 | 20 | 26 (43) |
| Ukupno n (%) | 1 (2) | 35 (58) | 1 (2) | 2 (3) | 21 (35) | 60 (100) |

5.4.3. Podudarnost između sekundarnih tipova

Sekundarni histološki tip u biopsijskim i hirurškim uzorcima i odgovarajuća p vrednost je prikazan u tabeli 25. Poređenjem učestalosti sekundarnih tipova u analiziranim uzorcima primenom χ^2 i Fišerovog testa našli smo da nema statistički značajne razlike u pojavljivanju svakog tipa ponaosob (p vrednosti su date u tabeli 25) kao i da globalno nema (p=0,450) razlike u pojavljivanju sekundarnih tipova u hirurškim i biopsijskim uzorcima.

Tabela 25. Odnos između sekundarnih tipova u hirurškim i biopsijskim uzorcima.

| Tip uzorka | Ukupno | ACN | LP | MPP | PAP | SOL | P |
|------------|--------|-------|----|-------|-----|-------|-------|
| Hirurški | 48 | 20 | 2 | 1 | 8 | 17 | 0,450 |
| Biopsijski | 17 | 8 | 1 | 2 | 2 | 4 | |
| P | | 0,700 | 1 | 0,165 | 1 | 0,547 | |

5.5. MOLEKULARNA ANALIZA

5.5.1. Izolacija DNK

DNK smo izolovali iz biopsijskih i hirurških uzoraka. Od svih hirurških uzoraka sa tumorskim tkivom odabirali smo uzorke bez ili sa minimalnom količinom nekroze kako bi se, što je više moguće, izbegla degradacija DNK i inhibicija Tag polimeraze. Prosečna koncentracija izolovane DNK u biopsijskim uzorcima je iznosila 5,81 ng/ μ l (u rasponu od 0,38 do 19,2 ng/ μ l) i znatno je manja u odnosu na prosečnu koncentraciju izolovane DNK u hirurškim uzorcima 28,32 ng/ μ l (u rasponu od 0,55 do 110 ng/ μ l).

Koristeći metodu analize varijansi poredili smo srednje vrednosti koncentracije izolovane DNK u biopsijskim uzorcima u odnosu na tip biopsije (transbronhijalna biopsija, bronhobiopsija i kateter biopsija) (Tabela 26.). U kateter biopsiji je verifikovana znatno niža prosečna vrednost koncentracije izolovane DNK. Dankanovim testom u okviru ANOVA analize uočena je statistički značajna razlika među srednjim vrednostima koncentracije za bronhobiopsiju i kateter biopsiju, te su one razdvojene u zasebne klase, dok transbronhijalna biopsija pripada obema klasama.

U daljem istraživanju za grupe predominantnih tipova u biopsijskim uzorcima u kojima je bilo više od jednog bolesnika izvršeno je poređenje srednjih vrednosti koncentracije izolovane DNK koristeći metodu analize varijansi ANOVA. Dobijena vrednost p (p=0,237) je pokazala

da nema statistički značajne razlike među srednjim vrednostima koncentracije izolovane DNK po posmatranim predominantnim tipovima.

Tabela 26: Odnos koncentracije izolovane DNK sa tipom biopsije i predominantnim tipom.

| Karakteristike | konc. DNK ng/ml | <i>P</i> |
|-------------------|--------------------|----------|
| Tip by | | |
| TBB | 6,15 ^{ab} | p=0,055 |
| BB | 7,75 ^b | |
| KB | 3,09 ^a | |
| Predominantni tip | | |
| ACN | 6,64 ^a | p=0,237 |
| SOL | 4,46 ^a | |
| MPP | 7,51 ^a | |

Legenda: malim slovima su obeležene klase kojima pripadaju srednje vrednosti, dobijene ANOVA analizom.

Osim što smo odredili procenat volumenske gustine tumorskog tkiva odredili smo i procenat volumenske gustine netumorskog tkiva, krvi i nekoze. Nekroza je evidentirana u dva slučaja sa udelom od 20% i 40% i u oba slučaja su dobijeni validni rezultati EGFR molekularnog testiranja. Za razliku od nekroze, krv je u 20 biopsijskih uzoraka nađena u rasponu od 2,25% do 90,72% procenta. Kod dva od 20 slučajeva čiji je procenat volumenske gustine različit (11,73% i 71,71%) koncentracija izolovane DNK je 3,84 ng/μl i 1,71 ng/μl, dobijeni su nevažeci (invalidni) rezultati molekularnog EGFR testiranja.

5.5.2. EGFR mutacioni status

U ovom istraživanju EGFR mutacioni status je određen kod 60 bolesnika, ukupno je analizirano 120 uzoraka [biopsijski uzorci (n=60) i hirurški uzorci (n=60)].

Od ukupnog broja uzoraka invalidni rezultat EGFR testiranja je evidentiran u sedam uzoraka (5,8%), od kojih je bilo šest biopsijskih uzoraka i jedan hirurški uzorak. Uzorci u kojima su dobijeni invalidni rezultati su retestirani pri čemu je rezultat EGFR molekularnog testiranja u biopsijskim uzorcima ostao nepromenjen, dok je u hirurškom uzorku dobijen *wt* EGFR.

Koristeći t-test poređene su srednje vrednosti koncentracije izolovane DNK u hirurškim (H) i biopsijskim (B) uzorcima kod pacijenata sa *wt* EGFR i mutiranim EGFR tumorom i

ustanovljeno je, sa rizikom od 5%, da nema statistički značajne razlike među poređenim vrednostima ($p=0,132$ i $p=0,641$) (Tabela 27.).

Tabela 27. Srednje vrednosti koncentracije izolovane DNK u hirurškim i biopsijskim uzorcima između *wt* EGFR i EGFR mutiranih adenokarcinoma.

| Karakteristike | EGFR mutirani | <i>wt</i> EGFR | <i>P</i> |
|-----------------------------------|---------------|----------------|----------|
| Koncentracija DNK ng/ μ l (H) | 7,38 | 29,42 | 0,132 |
| Koncentracija DNK ng/ μ l (B) | 4,53 | 5,87 | 0,641 |

EGFR mutacije su detektovane kod tri od 60 bolesnika (5%), odnosno u pet od 120 analiziranih uzorka (tri hirurška uzorka i dva biopsijska uzorka).

Od tri bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom dve su žene. Prosečna starost ovih bolesnika je iznosila 63 godine s tim da su dva bolesnika imali ≥ 65 godina. Dva bolesnika su bili pušači koji su pušili prosečno 20 godina s tim da je kod jednog od njih *index pack/year* iznosio 2,5 (Tabela 28.).

Tabela 28. Karakteristike bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom

| Slučaj | Pol | Starost | Pušenje |
|--------|----------|---------|---------|
| 1. | Muškarac | 50 | Pušač |
| 2. | Žena | 65 | Pušač |
| 3. | Žena | 74 | Nepušač |

Dijagnoza invazivnog adenokarcinoma kod svih bolesnika je postavljena u transbronhijalnom biopsijskom uzorku prosečne veličine od 2,8 mm.

Kod dva bolesnika je urađena lobektomija i jednog pneumonektomija. Tumor prosečne veličine od 55 mm je u dva slučaja bio lokalizovan u gornjem desnom režnju i jednom u donjem levom režnju. S obzirom na veličinu jedan tumor se nalazio u klasi I (0-20 mm), dok su druga dva bili u klasi IV (>50 mm).

U ovom istraživanju uočena je različita distribucija EGFR mutiranih adenokarcinoma u odnosu na pT stadijum i stadijum bolesti pri čemu su dva bolesnika bili u IIB, jedan u IIA stadijumu bolesti (Tabela 29.).

Prosečno je pregledano 5,7 uzoraka sa tumorom u prosečno 8,3 histoloških rezova bojjenih metodom H&E. S obzirom na kompleksnost histološke građe u hirurškim uzorcima u sva tri slučaja adenokarcinomi su bili mešani, odnosno sagrađeni od dva histološka aranžmana. U dva slučaja predominantni tip je bio solidni, u jednom acinarni. Sekundarni tip u primarnom tumoru je acinarni (dva slučaja) i lepidični (jedan slučaj). S obzirom na prognozu bolesti dva bolesnika se nalaze u grupi sa lošom prognozom i jedan u grupi sa intermedijernom prognozom. Intenzivna imunohistoheksijska ekspresija TTF-1 u $\geq 50\%$ tumorskog tkiva (skor 4) je evidentirana kod dva adenokarcinoma i negativna u jednom slučaju. Limfni čvorovi sa metastazom adenokarcinoma su nađeni kod dva od tri bolesnika. U jednom slučaju u metastazi je evidentirana homogena histološka građa i u tom slučaju je odgovarala predominantnom tipu u primarnom tumoru. U slučaju kada je metastaza bila heterogena uočeno je poklapanje između predominantnog i sekundarnog u metastazi i primarnom tumorom (Tabela 29.).

Biopsijski uzorci su sečeni u prosečno 31 histoloških rezova bojjenih metodom H&E. S obzirom na kompleksnost histološke građe u sva tri slučaja adenokarcinom je bio čist (homogen). Predominantni tipovi su bili acinarni (dva slučaja) i lepidični (jedan slučaj). S obzirom na predominantni tip u hirurškim i biopsijskim uzorcima u sva tri slučaja nije uočeno poklapanje između predominantnih tipova (Tabela 29.).

Tabela 29. Karakteristike bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom.

| Slučaj | H-P/S | By-P/S | LČ-P/S | pT | Stage | TTF- 1 |
|--------|--------------------|-----------|------------------|-----|-------|--------|
| 1. | Solidni/Acinarni | Acinarni | Negativan | T3 | IIB | 0 |
| 2. | Solidni/Acinarni | Acinarni | Solidni/Acinarni | T2b | IIB | 4 |
| 3. | Acinarni/Lepidični | Lepidični | Acinarni | T2a | IIA | 4 |

Legenda: P/S- predoninantni/sekunarni; H- hirurški uzorak; By-biopsijski uzorak; LČ-limfni čvorovi;

U dva slučaja biopsijski uzorci su imali po jedan biopsijski fragment koji je bio s tumorom. Dva biopsijska fragmenta, od kojih je u jednom bilo evidentirano tumorsko tkivo, su nađeni u jednom slučaju.

Od tri slučaja sa EGFR mutiranim adenokarcinomom u dva je biopsijski uzorak bio svrstan u grupu III (51-100 tumorskih ćelija) i jedan u grupu IV (101 do 200 tumorskih ćelija) (Tabela 30.).

Prosečna koncentracija izolovane DNK u hirurškim uzorcima EGFR mutiranih adenokarcinoma je iznosila 7,38 ng/ μ l, biopsijskim uzorcima 4,53 ng/ μ l. Prosečna vrednost procenta volumenske gustine tumorskog tkiva u biopsijskim uzorcima je iznosila 11,59%, u dva slučaja ispod 10%. Krv je nađena u jednom biopsijskom uzorku sa udelom od 32% dok nekroza nije evidentirana u biopsijskim uzorcima sa EGFR mutiranim adenokarcinomom (Tabela 30.).

Tabela 30. Karakteristike biopsijskih uzoraka kod EGFR mutiranog adenokarcinoma.

| Slučaj | Grupe ćelija | Koncentracija DNK ng/ μ l | PVT | %K |
|--------|--------------|-------------------------------|------|------|
| 1. | III | 12,6 | 9,21 | 0,0 |
| 2. | IV | 0,389 | 18,0 | 32,0 |
| 3. | III | 0,598 | 7,55 | 0,0 |

U ovom istraživanju su evidentirane su EGFR mutacija na egzonu 20 i egzonu 21. U hirurškim uzorcima L858R mutacije na egzonu 20 (dva slučaja) i insercije na egzonu 21 (jedan slučaj). Poklapanje mutacionog EGFR statusa u hirurškim i biopsijskim uzorcima evidentirano je kod dva bolesnika Tabela (31.).

Tabela 31. Distribucija mutacija u hirurškim i biopsijskim uzorcima.

| Slučaj | Hirurški uzorak | Biopsijski uzorak |
|--------|-----------------------|------------------------|
| 1. | Egzon 21 L858R | <i>Wilde type EGFR</i> |
| 2. | Insercija u egzonu 20 | Insercija u egzonu 20 |
| 3. | Egzon 21 L858R | Egzon 21 L858R |

6. DISKUSIJA

Karcinom pluća je vodeći uzrok obolevanja i umiranja u svetu (2). Oko 58% svih karcinoma pluća je evidentirano u manje razvijenim zemljama sveta pri čemu je najveća zabeležena incidenca kod oba pola u Severnoj Americi i Evropi, a najmanja Africi, Latinskoj Americi i na Karibima. Odnos između pojedinih histoloških tipova se menjao vremenom. U ranom registracionom periodu (1977.god.-1981.god.), sa udelom od 32% skvamozni karcinom je bio dominantan u odnosu na adenokarcinom (<30%). Taj odnos se drastično izmenio u kasnijem periodu (2006.god.-2010.god.) u korist adenokarcinoma naspram skvamoznog karcinoma (>40% vs 20%). Zastupljenost krupnoćelijskog i sitnoćelijskog karcinoma u posmatranim vremenskim intervalima je smanjena za nekoliko procenata. Ovim izmenama u procentualnom udelu pojedinih histoloških tipova karcinoma pluća svakako je doprinela i primena imunohistohemijskih metoda bojenja koja je omogućila precizniju diferencijaciju između pojedinih histoloških tipova karcinoma pluća pre svega razlikovanju adenokarcinoma od krupnoćelijskog karcinoma kao i razlikovanju loše diferentovanog adenokarcinoma od skvamoznog karcinoma (238). Posmatrajući pik incidence uočene su razlike među histološkim tipovima. Za skvamozni karcinom pik incidence je bio između 1982. god. i 1986. godine, sitnoćelijski karcinom (1987.god. i 1991.god.) i adenokarcinom (1992.god. i 1996.god.). Imajući u vidu činjenicu da je pušenje jedan od osnovnih etioloških faktora u nastanku karcinoma pluća smatra se da je uočena razlika u procentualnoj zastupljenosti pojedinih histoloških tipova i piku incidence posledica promena u duvanskoj industriji i pušačkim navikama poslednjih decenija. Smanjena količina katrana i nikotina, povećan udio nitrozamina i dubina inhalacije su doprineli da je delovanje štetnih komponenti iz duvanskog dima premešteno iz centralnih delova pluća na periferiju, a samim tim i doprinelo porastu incidence adenokarcinoma (239).

S obzirom na visoku incidencu karcinoma pluća Srbija se nalazi na drugom mestu iza Mađarske u ukupnoj populaciji, kod muškaraca na četvrtom, a kod žena na 11 mestu (238). U Vojvodini je broj novoobolelih i umrlih od karcinoma pluća u stalnom porastu. Za razliku od sredine devedesetih godina XX veka kada je skvamozni karcinom bio dominantan u odnosu na adenokarcinom (1,7:1) početkom XXI veka odnos je izmenjen u korist adenokarcinoma (1,3:1). Stoga proizilazi da je porast broja adenokarcinoma glavni razlog porasta morbiditetne i mortalitetne statistike i na teritoriji Vojvodine (17).

Dok je u zemaljama zapadne hemisfere visoka incidenca adenokarcinoma pluća povezana sa pušenjem u Istočnoj Aziji je među obolelim sve više nepušača, pre svega među ženama. Smatra se da izloženost žena parama kuvanja u neventilisanim kineskim kuhinjama jedan od razloga visoke incidence u ovoj populaciji (240). Pošto genetske promene imaju veliki udio u nastanku karcinoma pluća primena ciljane molekularne terapije, bazirana na genetskoj osnovi, obezbeđuje benefit za oko 15 % obolelih. Stoga molekularno profilisanje tumora treba da bude sastavni deo izveštaja patologa u svakodnevnom radu (241). Kako je molekularno profilisanje tumora u većini zemalja skupo i limitirano za određeni stadijum bolesti sve više se pažnje pridaje analizi histomorfoloških parametara koji mogu da pruže dodatne prognostičke informacije (100).

Implementacija predložene klasifikacije adenokarcinoma pluća iz 2011. godine u brojnim studijama je pokazala veliki prognostički benefit i potencijalnu mogućnost molekularnog profilisanja pacijenata na osnovu histoloških karakteristika, a u cilju personalizovanog pristupa u lečenju obolelih (169,172). Uzimajući u obzir veliki doprinos nove klasifikacije adenokarcinoma pluća SZO je uvrstila i objavila ovu klasifikaciju u novoj knjizi pod nazivom „Klasifikacija tumora pluća, pleure, srca i medijastinuma“ početkom 2015. godine. Kada je reč o novom pristupu u klasifikaciji adenokarcinoma u hirurškim uzorcima izmene su minorne, pre svega se odnose na terminologiju invazivnog adenokarcinoma dok su predloženi kriterijumi vezani za AIS i MIA prihvaćeni u celosti. U novoj klasifikaciji SZO uveden je novi pojam „*Spread Through Air Spaces*“ (STAS). STAS predstavlja aerogeno širenje adenokarcinoma. Manifestuje se prisustvom mikropapila, klastera, plaža i pojedinačnih tumorskih ćelija u vazдушnim prostorima izvan granica tumora, odnosno u okolnom parenhimu pluća. Prisustvo STAT-a je razlog većeg broja recidiva kod limitirane resekcije adenokarcinoma prvog stadijuma i lošije prognoze bez obzira na stadijum bolesti. Kako STAT predstavlja način širenja tumora ne uzima se u obzir prilikom određivanja procentualne zastupljenosti pojedinih histoloških tipova niti se uključuje prilikom određivanju veličine invazije. STAT ima značajnu ulogu u odvajanju AIS i MIA od lepidičnog tipa adenokarcinoma (132).

Predložene izmene u klasifikaciji adenokarcinoma bitno menjaju ulogu patologa, nameću potrebu za novim konceptom patohistološkog izveštaja koji treba da sadrži procentualnu zastupljenost svakog histološkog tipa prisutnog u $\geq 5\%$ tumora. Imajući u vidu da acinarni adenokarcinom sa kribriformnim aranžmanom zastupljenim u više od 10% tumora ima lošiju prognozu potrebno ga je evidentirati u izveštaju kao i STAT, imunohistohemijsku ekspresiju

(TTF-1, napsin A i Ki67) i molekularni profil tumora. Da bi rezultati imunohistohemijske analize i molekularnog testiranja bili relevantni neophodno je da su molekularne i imunohistohemijske laboratorije uključene u programe kontrole i osiguranja kvaliteta rada (100,132).

Broj ispitanika u studijama koje su analizirale značaj nove klasifikacije adenokarcinoma pluća i njenu korelaciju sa EGFR molekularnim statusom od 2011. god. do 2015 god. je različit, od 18 do 5442 bolesnika uključenih u veliku meta analizu (169,172). U naše istraživanje je bilo uključeno 60 bolesnika kod kojih smo molekularnu analizu uradili u biopsijskim i hirurškim uorcima (120 uzoraka).

Iako se beleži sve veći broj obolelih žena od adenokarcinoma pluća, u ukupnoj svetskoj populaciji još uvek je ovo oboljenje češće među muškarcima (4,5). U ovom istraživanju bilo je uključeno 35/60 (58%) muškaraca i 25/60 (42%) žena bez statistički značajne razlike među polovima ($p=0.0679$). Slične rezultate su publikovali i drugi autori (113,187). *Warth* i saradnici su u kohorti 487 bolesnika sa kompletno reseciranim primarnim adenokarcinomom pluća u periodu od 2002. god. do 2008. god. analizirali kliničko-patološke parametre i prognostički značaj nove klasifikacije adenokarcinoma pluća. U ovom istraživanju je bilo 293/487 (60%) muškaraca i 194/487 (40%) žena (113). Suprotno ovim rezultatima publikovane su i studije u kojima je ženska populacija u odnosu na mušku bila zastupljenija (119,143). Odnos broja muškaraca i žena u našem istraživanju (1,4: 1) je približan odnosu koji je zabeležio *Wang* (1,6:1) u meta-analizi 463 reference i 21 studije sa 5442 bolesnika sa dijagnostikovanom karcinomom pluća od kojih je 2468 obolelih od adenokarcinoma (172).

Da od adenokarcinoma pluća oboljevaju osobe u različitoj životnoj dobi potvrdili su i rezultati našeg istraživanja u kome je najmlađi bolesnik imao 43 godine, a najstariji 79 godina i ovaj raspon starosti je sličan rezultatima *Beau-Fallera* u čijem radu su oboleli imali od 42-84 godine (242). Međutim, *Prudence* i *Yochizawa* su zabeležili znatno širi raspon godina s tim da su najmlađi bolesnici u obe studije oboleli u trećoj deceniji života (u rasponu od 29 do 85 god. i 23 do 86 god.) (103,188). Među obolelim od adenokarcinoma pluća manje je mlađih od 50 godina, a broj obolelih se povećava sa starenjem (188,243,244,245). Taj stav su potvrdili i rezultati našeg istraživanja u kome smo imali 7% mlađih od 50 godina, 47% mlađih od 60 godina i 80% mlađih od 65 godina. Prosečna starost bolesnika u našem istraživanju je bila $61,83 \pm 8,08$ godina i slična je rezultatima drugih autora (188,242). Primenom *t*-testa dobijena vrednost *p* ($p=0.0440$) u našem istraživanju je pokazala da žene obolevaju mlađe u odnosu na muškarce.

Pušenje je jedan od najvažnijih faktora rizika u nastanku karcinoma pluća, a stepen rizika zavisi od dužine pušenja, intenziteta pušenja, broja popušanih cigareta i postoji nakon 40 godina apstinencije (6,90,246,247). Anamnestički podatak o pušačkim navikama, odnosno vreme početka uživanja duvana, dužina pušenja, broj i vrsta popušanih cigareta je jedan od važnijih podataka kada se razmatra uticaj delovanja duvanskog dima u nastanku karcinoma pluća. Stoga je u većini objavljenih studija informacija o pušačkim navikama bila poznata za sve ispitanike. Jedna od retkih studija u kojoj nije bio poznat podatak o pušačkim navikama za sve ispitanike jeste studija sa poznatim podacima kod 425/440 (95,59%) ispitanika (188). U našem istraživanju aktivnih pušača je bilo 44/60 (73%), što je značajno viši procenat u odnosu na podatke drugih autora (23%,24%,35%) (119,188,242). Indeks *pack-year* je kod naših ispitanika veći u odnosu na rezultate jedne od navednih studija ($55,9 \pm 4,1$ vs $39,6 \pm 21,45$), odnosno naši bolesnici su više i duže pušili, a samim tim je rizik obolevanja kod njih bio veći (188). Broj bivših pušača je u našem istraživanju 10/60 (17%) i daleko je manji u odnosu na publikovane podatke (49%,32%) (119,188). Međutim, početkom XXI veka sve je više nepušača među obolelim od adenokarcinoma pluća, pre svega žena (119,143,188,242,245). U našem istraživanju svega šest od 60 bolesnika (10%) nije pušilo, od toga su četiri žene, a vrednost ($p=0,044$) dobijena Fišerovim testom je pokazala da postoji statistički značajna razlika u pušačkim navikama između muškaraca i žena. Naši rezultati o pušačkim navikama su najverovatnije posledica lošeg socijalno-ekonomskog statusa, propagiranje loših stilova života putem elektronskih i drugih medija, loših efekata kampanja o zabrani pušenja i nesprovođenja zakonskih odredbi o zabrani pušenja.

Bronhoskopija je invazivna dijagnostička metoda koja se sprovodi na IPBV od 1960.god. (248). Osim što se sprovodi u cilju dijagnostikovanja tumora pluća, određivanja endoskopske proširenosti bolesti i procene operabilnosti tumora dobijeni uzorci se sve češće koriste i za molekularno testiranje (249). Testiranje EGFR molekularnog statusa na IPBV sprovodi se od januara 2015. godine, ali samo za obolele u uznapredovalom stadijumu bolesti (IIIB i IV). Prema *Hajmanoochehri-u* na prisustvo tumora može da ukaže različit bronhoskopski aspekt endobronhijalne sluznice (endobronhijalna masa, abnormalan izgled same sluznice i kompresija disajnih puteva) dijagnoza adenokarcinoma je često postavljena u citološkim uzorcima i na brzozmrznutim *Ex tempore* rezovima pri izvođenju dijagnostičko-terapijske torakotomije prvenstveno zbog činjenice da je adenokarcinom najčešće lokalizovan na periferiji pluća, a samim tim i teže dostupan za bronhoskopiju (246). Senzitivnost i specifičnost bronhoskopije zavisi od endoskopskog nalaza i broja biopsijskih uzorka, bolja je

ukoliko je uzeto tri do pet uzoraka za analizu (251). U literaturi su objavljeni radovi u kojima je analizirana adekvatnost biopsijskih uzoraka za molekularno testiranje, ali bez posebnog osvrta na vrstu tehnike uzorkovanja (250,252). U našem istraživanju transbronhijalna biopsija je sa udelom od 63% bila značajno češća dijagnostička tehnika uzorkovanja u odnosu na bronhobiopsiju i kateter biopsiju. Bronhoskopijom se dobijaju uzorci kod kojih je moguće prilikom prijema odrediti veličinu uzorka koja zavisi od tehničkih performansi upotrebljenog bronhoskopa, stručne osposobljenosti bronhologa, ali i od precizne procene veličine uzorka od strane laboranta na prijemu materijala u Centru za patologiju. S tim u vezi treba raditi na praćenju savremenih trendova prilikom nabavke opreme u bronhološkom kabinetu, kontinuiranoj edukaciji i utreniranosti osoblja zaposlenog u bronhološkom kabinetu i Centru za patologiju.

Lobektomija se primenjuje samostalno ili kao dio multimodalitetnog pristupa udružena sa hemioterapijom ili radioterapijom kako bi se postigla poželjna R0 resekcija tumora. Osnovni preduslov za izvođenje bilo koje hirurške procedure jeste da je tumor pre svega resektabilan, ali i da se bolesnik nalazi u dobrom opštem stanju. Imajući u vidu činjenicu da je kod bolesnika sa urađenom lobektomijom, u odnosu na druge vidove hirurškog lečenja, duži period bez recidiva bolesti i bolje preživljavanje ova metoda je i najčešći vid hirurškog lečenja obolelih od karcinoma pluća u većini publikovanih radova (u rasponu od 50% do 97%) dok su pneumonektomija i segmentektomija daleko ređe (113,188,253,254,255). Rezultati našeg istraživanja u kome je lobektomija (75%) bila najčešća, *wedge* resekcija značajno ređa (2%) su saglasni sa rezultatima ovih autora. Međutim, pneumonektomija je u našem istraživanju bila daleko češća (20%) u odnosu na ove rezultate i ova razlika je najverovatnije posledica stadijuma bolesti bolesnika uključenih u naše istraživanje.

Adenokarcinom pluća je najčešće lokalizovan u desnom gornjem režnju, odnosno desnom plućnom krilu (119,188,254,256). Taj stav su potvrdili i rezultati našeg istraživanja u kome smo evidentirali 40% tumora na datoj anatomske lokalizaciji i odnos između desne i leve strane 1,5:1 u ukupnoj populaciji. Za razliku od odnosa u ukupnoj populaciji i kod muškaraca, adenokarcinom je kod žena češće lokalizovan levo (56%), a uočena razlika je statistički značajna ($p=0.0325$).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je najviše bolesnika bilo u IIB (30%) i IIA (28%) stadijumu bolesti i suprotni su rezultatima drugih autora (181). *Warth* je u analizi 487 bolesnika ove stadijuma evidentirala znatno ređe (IIB-15% i IIA-6%) dok su u analizi 440 bolesnika *Yoshizawa* i saradnici imali daleko manji procenat ovih stadijuma bolesti u svom

istraživanju (IIB-2,5% i IIA-6%) (113,188). Različita distribucija stadijuma bolesti u našem istraživanju u odnosu na ove rezultate je najverovatnije posledica različitih kriterijuma prilikom uključivanja bolesnika u istraživanja, ali i indirektni pokazatelji loše zdravstvene prosvetćenost našeg stanovništva i manjkavosti zdravstvenog sistema usled nedostatka skrining programa u rizičnoj populaciji.

Prema proceduri Centra za patologiju IPBV za uzorkovanje materijala iz hirurški resećiranog tumorskog tkiva, a koja je u skladu sa savremenim svetskim trendovima, nakon hirurške resekcije uzima se više isećaka iz samog tumora vodeći računa da se prikaže njegov odnos sa velikim krvnim sudovima i pleurom, plućni parenhim bez tumora i svi limfni ćvorovi. Na taj naćin je patološki TNM i stadijum bolesti moguće odrediti precizno. Iako je preporuka da se iz tumora većih dimenzija uzima veći broj isećaka rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoji relativno slaba korelacija između broja isećaka sa tumorom i njegove velićine što je potvrđeno Pirsonovim koeficijentom korelacije ($r=0,31$). Broj pregledanih histoloških rezova iz hirurški odstranjenog tumora je analiziran u brojnim studijama (103,113,119,188,257,258). Mada je raspon broja histoloških rezova u našem istraživanju približan rezultatima većine autora, prosećan broj histoloških rezova od $9,4\pm 3,47$ je veći u odnosu na rezultate drugih autora (~ 5) i najpribližniji rezultatima *Yoshizaw-e* ($n=8,6$) i *Suna* ($n=11,5$) kod kojih je bio znaćajno širi raspon pregledanih histoloških rezova (u rasponu od 1 do 35) (188,258). Uzimajući u obzir ćinjenicu da se patolozi uključeni u ovo istraživanje u svakodnevnom radu bave isključivo plućnom patologijom i da primenjuju IATSL/ATS/RS klasifikaciju od njenog predloga (2011. god.) smatramo: da su dobro utrenirani u proceni predominantnog i sekundarnog tipa kao i invazije, da je broj pregledanih histoloških rezova zadovoljavajući s obzirom na broj isećaka uzetih iz tumora, ali da bi zbog kompleksnosti histološke graće adenokarcinoma, kao i znaćaja koji ima njena analiza, trebalo povećati uzorkovanje iz hirurški resećiranog tumorskog tkiva ili pristupiti primeni makrorezova što bi zahtevalo odgovarajuću tehnićku potporu i nabavku nove opreme u Centru za patologiju u narednom periodu.

Adenokarcinom pluća ima heterogenu histološku graću (107,113,258,259). Ovaj stav su potvrdili i rezultati našeg istraživanja. Naime, homogeni (ćist) aranžman u hirurškim uzorcima smo zabeležili u 23% slućajeva, a vrednost p ($p<0,001$) dobijena primenom χ^2 neparametarskog testa je pokazala da je uoćena razlika statistićki znaćajna. Ovi rezultati su najpribližniji rezultatima *Solisa*, koji je ćist aranžman u hiruškim uzorcima evidentirao kod 9/240 (20%) bolesnika, da se solidni i acinarni tip najćeće nalaze u grupi mešanih tumora i

da se mikropapilarni tip retko pojavljuje samostalno (107). Literarni podaci pokazuju da je mešani adenokarcinom najčešće kombinacija dva histološka aranžmana (u rasponu od 37% do 93%), da su tri histološka aranžmana zastupljena u različitom procentu (u rasponu od 6% do 46%) kao i da su tumori sa kompleksnijom histološkom građom (četiri i pet histoloških aranžmana) retki (u rasponu od 0% do 29%) (113,258,259). Ovaj stav su potvrdili i rezultati našeg istraživanja u kome su slučajevi sa dva histološka aranžmana bili najzastupljeniji (57%), sa tri ređi (17%) i sa četiri histološka aranžmana najređi (3%).

Histološki tip zastupljen u najvećem procentu pregledanog tumorskog tkiva predstavlja predominantni histološki tip. Od 2011 godine publikovano je nekoliko studija u kojima je analizirana reproducibilnost u proceni predominantnog tipa, sekundarnog tipa, invazije i odnosa između predominantnog i sekundarnog tipa (260,261). Reproducibilnost u proceni predominantnog tipa zavisi pre svega od kompleksnosti histološke građe adenokarcinoma, broja histoloških rezova i utreniranosti patologa. Jedna od prvih studija te vrste je kohorta sa 100 slučajeva invazivnog karcinoma pluća u kojoj je solidno predominantni tip bio najzastupljeniji (37%), zatim acinarani (35%), lepidični (20%), papilarni (5%) i mikropapilarni (3%). Rezultati ove studije su pokazali značajno slaganje između pet patologa u određivanju predominantnog tipa ($k=0.44-0.72$) pri čemu su papilarni i mikropapilarni tipovi bili najproblematičniji za određivanje. Koeficijent korelacije u određivanju procentualne zastupljenosti pojedinih tipova invazivnog adenokarcinoma je veći kada su uzorke analizirali plućni patolozi iz iste ustanove u odnosu na plućne patologe iz različitih ustanova i patologe koji se u svakodnevnom radu ne bave plućnom patologijom (0,51 vs 0,44 vs 0,33) (260). Slične podatke je publikovao i *Tunnssseisen* sa saradnicima u čijoj je studiji učestvovalo 26 patologa. Reproducibilnost je kod tipičnih slučajeva iznosila ($k=0,77$), teških ($k=0,38$), predominantnog tipa ($k=0,32$), sekundarnog ($k=0,26$) i kombinovani (predominatni/sekundarni) ($k=0,26$). Najbolja reproducibilnost je evidentirana u solidnom ($k=0,65$) i mikropapilarnom ($k=0,35$) tipu, značajno manja u lepidičnom ($k=0,28$), papilarnom ($k=0,2$) i acinarnom ($k=0,08$) tipu. Najčešći problem u ovoj studiji je razlikovanje lepidičnog i acinarnog, papilarnog i lepidičnog te papilarnog i mikropapilarnog tipa. Reproducibilnost u određivanju invazije je varijabilna, bolja je u tipičnim slučajevima u odnosu na teške slučajeve ($k=0,55$ vs $k=0,08$) (261). Bez obzira da li je reč o određivanju prisustva invazije, predominantnog tipa, reproducibilnost i koeficijent korelacije se povećava edukacijom. Prilikom određivanja predominantnog tipa, sekundarnog tipa i imunohistohemijske TTF-1 ekspresije u našem istraživanju postojao je visok stepen slaganja između dva patologa stoga

nije bilo potrebe za mišljenjem trećeg patologa. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je acinarni tip bio dominantan kod najvećeg broja bolesnika (27/60) i u saglasnosti su sa rezultatima *Solisa* koji je ovaj tip takođe evidentirao kod najvećeg broja ispitanika, ali sa značajno većim procentualnim udelom u odnosu na rezultate našeg istraživanja (92% vs 45%). Suprotno navedenim rezultatima drugi autori su ovaj tip kao dominantan evidentirali u značajno manjem procentu (107,188). Zastupljenost solidno dominantnog tipa u publikovanim studijama je varijabilna, kreće se od 9% do 20% (107,117,188,257,258). Rezultati našeg istraživanja u kome smo ovaj tip kao dominantan evidentirali kod 26/60 (43%) bolesnika se značajno razlikuju u odnosu na rezultate ovih studija. Mikropapilarno dominantni tip je redak, u većini studija je evidentiran u oko 5% analiziranih invazivnih adenokarcinoma (117,188,257). Suprotno ovim rezultatima *Sun* je u analizi 136 slučajeva adenokarcinoma mikropapilarni tip evidentirao u većem procentualnom udelu (16%) (258). Rezultati našeg istraživanja (4/60;7%) su podržali tvrdnju da se ovaj tip kao dominantan pojavljuje u manjem procentu i da se nalazi uglavnom u kombinaciji sa drugim histološkim tipovima. Papilarno dominantni tip smo u našem istraživanju evidentirali samo u dva slučaja (2/60; 3%) i ovi rezultati se razlikuju od rezultata drugih autora u kojima je zastupljenost ovog tipa veća (12% i 41%) (103,188).

Nakon što smo odredili dominantni tip u hirurškim uzorcima analizirali smo povezanost između dominantnog tipa sa karakteristikama bolesnika uključenih u istraživanje. Acinarno dominantni tip je češći kod muškaraca (103,188,257). *Yoshizawa* je analizirao prognostički značaj nove klasifikacije kod 514 operisanih bolesnika sa dijagnostikovanim adenokarcinomom pluća u I stadijumu bolesti. U ovoj studiji je od 232 bolesnika sa acinarno dominantnim tipom bio 161 muškarac i 71 žena. U istoj studiji je evidentiran veći broj muškaraca i u solidno dominantnom tipu 67/38 (57%) (257). Rezultati našeg istraživanja su slični rezultatima ove studije. Da postoji statistički značajna jednakost u raspodeli dominantnih tipova po polu (u dva najfrekventnija dominantna tipa) potvrdili su i rezultati našeg istraživanja odnosno vrednost p ($p=0,608$) dobijena χ^2 neparametarskim testom. Prema literaturnim podacima najviša i najniža prosečna starost je evidentirana u različitim dominantnim tipovima (119,103,188). Rezultati našeg istraživanja u kojima je najviša prosečna starost od 77 god. evidentirana u mikropapilarnom, a najniža u lepidičnom (58 god.) dominantnom tipu su saglasni sa rezultatima ovih autora.

Kod svih bolesnika smo posmatrali odnos između pušačkih navika i dominantnog tipa. Najviše pušača u našem istraživanju je imalo acinarno i solidno dominantni tip (22/44 i

18/44), bivših pušača takođe ova dva tipa (acinarni kod 3/6 i solidni kod 3/10), među nepušačima najviše je bilo onih sa acinarno predominantnim tipom (3/6) dok je po jedan bolesnik imao lepidično, mikropapilarno i solidno predominantni tip. Ovi rezultati su saglasni rezultatima drugih autora (103,119,257,267).

Posmatrajući odnos predominantnog tipa i prosečne veličine tumora rezultati ovog istraživanja su pokazali da je najmanja prosečna veličina evidentirana kod acinarno predominantnog tipa (48,7 mm), da je lepidično predominantni tip manjih dimenzija (55 mm) u odnosu na acinarni dok su vrednosti solidnog (50 mm), papilarnog (55,7 mm) i mikropapilarnog (82,2 mm) tipa veće. Slične rezultate su publikovali i drugi autori (103,113,119,188). S obzirom na naše rezultate možemo zaključiti da su predominantni tipovi sa lošom prognozom (solidni i mikropapilarni) značajno većih dimenzija. Posmatrajući rezultate prosečne veličine lepidično predominantnog tipa u odnosu na rezultate ovih autora nalazimo da je u našem istraživanju ova vrednost značajno veća s tim da je limitirajući faktor našeg istraživanja mala zastupljenost ovog tipa u celokupnom uzorku.

U svim slučajevima je određen patološki stadijum tumora (pT) i raspodela predominantnih tipova prema ovom stadijumu. U rezultatima našeg istraživanja vrednost p ($p=0.1977$) dobijena primenom neparametarskog Fišerovog testa je pokazala da su predominantni tipovi jednako raspoređeni u svim pT stadijumima. Ovaj stav su potvrdili i rezultati *Warth* s tim da je za razliku od naših rezultata gde smo oba slučaja papilarno predominantnog tipa imali u pT2b stadijumu ovaj tip u istom stadijumu u ovoj studiji je bio značajno ređi (2/23) (113). Posmatrajući raspodelu predominantnih tipova po stadijumu bolesti rezultati našeg istraživanja su pokazali da se svi papilarno i lepidično predominantni tipovi nalaze u IIA stadijumu dok je mikropapilarno predominantni tip raspoređen u višim stadijumima bolesti (IIB i IIIA). Najfrekventniji predominantni tipovi su podjednako raspoređeni u svim stadijumima što je potvrđeno Fišerovim neparametarskim testom ($p=0.571$). Ovi rezultati su saglasni rezultatima kohorte u koju su bili uključeni ispitanici u svim stadijumima bolesti (113).

Prognostički značaj IASLC/ATS/ERS klasifikacije adenokarcinoma pluća je bio predmet analize *Prudenc*-ove kohorte sa 210 bolesnika operisanih od adenokarcinoma u stadijumu I II i III koji su na osnovu sličnog petogodišnjeg preživljavanja ispitanike podelili u IV grupe. Prvu grupu su činili AIS, MIA i invazivni adenokarcinom sa lepidično predominantnim tipom, drugu grupu acinarni i papilarno predominantni tip, treću grupu mikropapilarni i solidno predominantni tip dok su u četvrtu grupu svrstani invazivni mucinozni i koloidni

adenokarcinom. Od svih grupa najzastupljenija je bila grupa sa umerenom prognozom (52%) dok je u grupi sa dobrom prognozom bilo najmanje bolesnika (5%) (103). Rezultati našeg istraživanja se razlikuju od rezultata ove studije. U našem istraživanju najzastupljenija je bila grupa sa lošom prognozom u kojoj se nalaze solidni i mikropapilarni predominantni tip (50%) dok je u grupi sa dobrom prognozom kao i u navedenom istraživanju bilo najmanje bolesnika (2%). Mada u našem istraživanju nije analiziran prognostički značaj nove klasifikacije adenokarcinoma pluća pretpostavka je, na osnovu histološke građe, ali i na osnovu drugih posmatranih karaktera prognoza bolesti kod naših bolesnika loša.

Histološki tip koji se prema procentualnom udelu nalazi iza predominantnog je određen kao sekundarni tip. Svi histološki aranžmani mogu da budu sekundarni, njihova distribucija nije uvek identična distribuciji predominantnih tipova i često se nalazi u metastatski izmenjenim limfnim čvorovima ili drugim metastazama (119). Ovaj stav su potvrdili i rezultati našeg istraživanja.

TTF-1 je trenutno najčešće korišten pneumocitni marker u diferencijaciji invazivnog adenokarcinoma pluća od drugih primarnih i metastatskih karcinoma. Više od 75% adenokarcinoma pluća pokazuje pozitivnu TTF-1 ekspresiju. Pojedini autori sugerišu da TTF-1 pozitivni i TTF-1 negativni adenokarcinomi imaju različitu patogenezu te da ovaj marker treba da se koristi ne samo u dijagnostičke svrhe nego i kao prognostički marker (142,143,262). Opisane su različite metode evaluacije imunohistohemijske ekspresije TTF-1. *Kadota* razlikuje: tri skora 0 (nema ekspresije), 1 (blaga ekspresija), 2 (ekspresija srednjeg stepena), 3 (intenzivna ekspresija) u najmanje 50% tumorskog tkiva dok drugi autori smatraju da bilo koja pozitivnost jedara tumorskih ćelija kvalifikuje tumor kao TTF-1 pozitivan (106,140). Mi smo u ovom istraživanju TTF-1 ekspresiju odredili kao semikvantitativni scoring sistem koji se bazirao na određivanju procenta obojenih ćelija i intenziteta bojenja pri čemu smo smatrali da su TTF-1 negativni tumori oni koji imaju skor 0, odnosno ne pokazuju nuklearnu ekspresiju TTF-1. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da postoji statistički značajna razlika između broja TTF-1 negativnih (8/60; 13%) i TTF-1 (52/60; 87%) pozitivnih adenokarcinoma ($p < 0.001$), ali ne i u njihovoj raspodeli prema polovima ($p = 0.1231$), prosečnoj starosti i prosečnoj veličini ($p = 0, 21$) i u skladu su sa rezultatima drugih autora. *Kadota* je u analizi 452 tumora zabeležio TTF-1 ekspresiju kod 418 (92%) bolesnika od kojih je 263/285 (92%) žena i 155/167 (92%) muškaraca (106). U približno sličnoj studiji, kada je reč o broju ispitanika, nađena je pozitivnu TTF-1 ekspresija kod 443/496 (89%) ispitanika; kod 199 od 227 (87,66%) muškaraca i 244/269 (90, 70%) žena (143). U pojedinim studijama

je zabeležena češća ekspresija TTF-1 kod nepušača (142,143). Suprotno ovim rezultatima u našem istraživanju smo pokazali da ne postoji statistički značajna razlika između bolesnika sa TTF-1 negativnim i TTF-1 pozitivnim adenokarcinoma u njihovoj raspodeli prema pušačkim navikama ($p=0.6488$) koje su slične studiji *Kadote*, gde je bilo 67/418 (16%) nepušača nasuprot aktivnih ili bivših pušača 351/418 (84%). Kada smo posmatrali distribuciju TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma prema predominantnim tipovima našli smo da su naši rezultati približni rezultatima ovog autora, u acinarno predominantnom tipu (89% vs 94%), papilarnom (100% vs 98%), mikropapilarnom (100% vs 93%), solidnom (85% vs 86%), ali se značajno razlikuju kod lepidičnog tipa s tim da smo imali samo jedan slučaj koji je bio TTF-1 negativan dok su kod *Kadote* svi lepidični bili TTF-1 pozitivni (112). Vrednost p ($p=0,633$) dobijena χ^2 neparametrim testom je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli TTF-1 skora u dva najfrekventnija predominantna tipa (acinarni i solidni) koji pripadaju različitim prognostičkim grupama čime smo potvrdili stavove drugih autora koji navodi da ne postoji klinički značajna razlika između slabo i intenzivno pozitivnih TTF-1 adenokarcinoma (143).

Predominantni tip u primarnom tumoru određuje ishod pN2 bolesti, ali i predominantni tip u limfogenim metastazama. Subtipizacija bazirana na novoj klasifikaciji pruža važne prognostičke informacije i omogućava potencijalnu molekularnu korelaciju i treba da obezbedi bolji personalizovani tretman obolelim od adenokarcinoma pluća. Jedna od prvih studija u kojoj je proučavan prognostički značaj nove klasifikacije adenokarcinoma pluća je velika kohorta 487 bolesnika različitih stadijuma bolesti, 141 su bili u III stadijumu sa pN2 metastazama u kojima su nađeni svi subtipovi: lepidični 2 (1,4%), acinarni 57 (40,4%), solidni 53 (37,6%) i papilarni 8 (14,9%) (113). Ovi rezultati se razlikuju značajno u odnosu na naše gde smo imali samo dva predominantna tipa (acinarni i solidni) u limfogenim metastazama. Slično istraživanje su sprovedi i drugi autori (119,263). Kada je acinarni tip bio dominantan u primarnom tumoru bio je dominantan i u metastazama kod 9/11(82%) bolesnika suprotno rezultatima *Prudencia* (11/26; 42%). Kada je acinarni tip bio dominantan u primarnom tumoru, a u metastazama solidni imali smo kod 2/11(18%), bolesnika dok je ta kombinacija u ovoj studiji bila zastupljenija (7/26; 27%). Iako je poznato da mikropapilarno predominantni tip u primarnom ima veći metastatski potencijal u odnosu na druge tipove mi smo mikropapilarni tip imali u primarnom kod dva bolesnika kod kojih je u metastazama nađen acinarni tip suprotno rezultatima navedene studije u kojoj je kod 13 bolesnika dominantan mikropapilarni u primarnom, ali i u metastazama (13/13; 100%)

(119). *Sica* je komparirao histološku građu između primarnog adenokarcinoma pluća i metastaza iz regionalnih limfnih čvorova (n=66) i mozga (n=7) kod 73 bolesnika. U ovoj studiji svi primarni adenokarcinomi i metastaze su bili mešovite histološke građe. U primarnom tumoru su bili zastupljeni svi tipovi osim lepidičnog sa sledećim udelom: acinarni (48%), solidni (19%), papilarni (19%) i mikropapilarni (14%). Sličnu distribuciju dominantnih tipova je zabeležio i u metastazama: acinarni (42%), papilarni (23%), mikropapilarni (44%) i solidni (40%) te je zabeležen visok stepen slaganja između dominantnih tipova u primarnom i metastazama: acinarni (54%), papilarni (36%); mikropapilarni (100%) i solidni (86%). Iz navedenih rezultata proizilazi da prisustvo solidnog i mikropapilarnog tipa u primarnom adenokarcinomu, bez obzira na procentualnu zastupljenost, ukazuje na agresivniji fenotip tumora (263).

Prudence je analizirao korelaciju mutacionog statusa i preživljavanja sa dominantnim histološkim tipom na osnovu kriterijuma nove IASLC/ATS/ERS klasifikacije adenokarcinoma pluća kod pacijenata u III stadijumu sa pozitivnim N2 limfnim čvorovima. Kod svih 69 bolesnika određen je dominantni tip u primarnom tumoru i u metastazama. Kod dva bolesnika sa dominantnim solidnim i sekundarnim mikropapilarnim u limfogenim metastazama je nađena mikropapilarna komponenta. Slična je pojava zabeležena i kod osam bolesnika sa dominantnim acinarnim i sekundarnim mikropapilarnim u primarnom i kod četiri bolesnika sa dominantnim papilarnim i sekundarnim mikropapilarnim u primarnom tumoru. Kod šest bolesnika kada je dominantni u primarnom bio acinarni, a solidni sekundarni nađen je solidni u metastazama. U jednom slučaju solidni je nađen u metastazama, ali ne i u primarnom tumoru koji je bio prečnika 40 mm i bio je sagrađen od acinarnog (80%) i papilarnog tipa (20%). U tom slučaju su uzeta tri isečka za standardnu obradu. Situacija kada se neki tip nađe u metastazama, ali ne i u primarnom tumoru može da bude posledica malog broja isečaka uzetih iz primarnog tumora (119). Analizirajući odnos između dominantnog tipa u metastazama i sekundarnog tipa u primarnom tumoru u našem istraživanju smo došli do sličnih rezultata. Kada je acinarni bio sekundaran u primarnom nađen je u metastatskim limfnim čvorovima kod tri bolesnika dok je u slučajevima kada je solidni bio sekundarni u primarnom nađen je u metastazama kod dva bolesnika. Na osnovu ovih rezultata možemo istaći da postoje različiti metastatski potencijali pojedinih tipova adenokarcinoma odnosno da acinarni tip ima intermedijerni metastatski potencijal koji je velik u mikropapilarnom i solidnom tipu.

Količina tumorskog tkiva dobijena endobronhijalnom biopsijom je relativno mala jer se u dobijenom materijalu nalaze i druge ćelije (inflamacije, sluznice bronha i alveolarno tkivo). Količina dobijenog tumorskog tkiva zavisi od histološkog tipa, endoskopskog nalaza, ali i od tehnike uzorkovanja (245,250). S obzirom da se biopsijski uzorci ukalupljeni u parafin seku na više histoloških rezova i da se tumorsko tkivo troši neophodno je imati na umu da je to često i jedini dostupan materijal za molekularno testiranje te je potrošnju neophodno svesti na minimum. Prosečan broj histoloških rezova u našem istraživanju je iznosio $16,30 \pm 6,63$ (u rasponu od 4 do 44) .

Broj biopsijskih fragmenata u publikovanim radovima je različit. *Coghlin* je u analizi 100 endobronhijalnih biopsija evidentirao prosečno 3,3 biopsijskih fragmenta (u rasponu od 1-6) (250). U velikoj studiji sa uključenih 2211 bolesnika u periodu od 2009. god. do 2011. godine karcinom pluća je dijagnostikovao kod 452 bolesnika, od kojih je dijagnoza adenokarcinoma postavljena kod 108/452 bolesnika. Prosečan broj biopsijskih fragmenata u ovoj studiji je bio četiri (u rasponu od 1 do 7), od kojih je 92,6% biopsija bilo sa tri do pet fragmenata (245). Mi smo u ovom istraživanju evidentirali prosečno 1,96 biopsijskih fragmenata (u rasponu od 1 do 7) od kojih je 1,5 fragmenata bilo sa tumorom što je značajno manji broj u odnosu na rezultate ovih autora.

Nalaz EGFR mutacija može da budu negativan i ukoliko je tumor mutiran. U ovom slučaju dobijeni nalaz se smatra lažno negativnim i najčešće je posledica malog broja ćelija tumora u uzorku odnosno ispod nivoa detekcije individualnim testovima (264). Većina biopsijskih uzoraka sadrži više od 100 ćelija tumora. Taj stav podržava i manja serija u kojoj je od 108 biopsijskih uzoraka 97 (89,8%) bilo sa ≥ 100 ćelija, odnosno u 11 (10,2%) uzoraka sa manje od 100 ćelija (245). Suprotne rezultate je zabeležio *Yang* koji je u svojoj analizi imao 73/99 (74%) uzoraka sa manje od 100 ćelija. U ovoj studiji je određen i EGFR mutacioni status u 79/99 (80%) uzoraka. S obzirom na broj ćelija tumora ovi autori su sve uzorke podelili u četiri grupe: I (0-9), II (10-49), III (50-99) i IV (>100). Najviše EGFR mutacija je bilo u prvoj grupi (29/79;35%), zatim II (20/79-26%) i IV (20/79; 26%) dok je u III grupi bilo najmanje EGFR mutiranih adenokarcinoma (10/79; 12%) (265). U našem istraživanju zastupljeniji su bili uzorci sa više od 100 ćelija 45 (75%) čime smo potvrdili prvobitno navedeni stav da se u većini dijagnostičkih biopsijskih uzoraka nalazi više od 100 ćelija tumora.

Postoje različite metode morfometrijske analize biopsijskih uzoraka. *Scarpino* je u analizi 120 sitnih biopsija koristila digitalizovane slajdove na kojima je manualno određeno biopsijsko područje, područje aree tumora, broj tumorskih ćelija i ukupan broj ćelija u biopsijskom

uzorku. Iz dobijenih podataka je određen procenat tumorskog tkiva i procenat tumorskih ćelija (252). Mi smo u ovom istraživanju procenat volumenske gustine tumorskog tkiva određivali upotrebom kompjuterskog programa *Image J* sa instaliranim plugin-om; (*Plugins*) za analizu broja pogodaka (*COST* i *Analyze*). Procenat tumorskog tkiva zavisi od vrste ispitivanog materijala i načina na koji su uzorci dobijeni za analizu. Ovaj stav je potvrdila manja serija analize EGFR molekularnog statusa kod 146 slučajeva od kojih je bilo: sitnih biopsija (n=55) od kojih iglenih kor biopsija sa različitih anatomskih mesta 50 (pluća 29, limfni čvorovi 8, kosti 7, jetra 4, abdominalni zid i paravertebralno vezivo po jedan uzorak) i 5 bronhijalnih biopsija. U svim uzorcima je određen procenat tumorskog tkiva. Nađena je statistički značajna razlika kada je poređen procenat tumorskog tkiva u hirurškim i biopsijskim uzorcima ($p < 0.0001$), hirurškim i citološkim uzorcima ($p = 0.009$), ali ne i kada su poređene vrednosti između biopsijskih i citoloških uzoraka ($p = 0.53$) (249). Rezultati našeg istraživanja su potvrdili ovaj stav. Prosečna vrednost procenta volumenske gustine tumorskog tkiva u svim biopsijskim uzorcima u našem istraživanju je bila 24,88% najveća u uzorcima dobijenim bronhobiopsijom (31,22%) u odnosu na uzorke dobijene kateter biopsijom (21,80%) i transbronhijalnom biopsijom (21,63%), ali vrednost p ($p = 0.36$) dobijena metodom analize varijanski (ANOVA) je pokazala da uočena razlika nije statistički značajna, kao ni u slučaju kada smo poredili odnos između procenta volumenske gustine tumorskog tkiva sa predominantnim tipom ($p = 0.8563$). Međutim, vrednost p ($p < 0,001$) dobijena ANOVA analizom je pokazala da postoji statistički značajna razlika kada smo poredili grupe ćelija formirane na osnovu broja očuvanih ćelija tumora i srednje vrednosti procenta volumenske gustine tumorskog tkiva koja se statistički značajno razlikuju u grupi V (201-500 ćelija tumora) i grupi VI (501-1000 ćelija tumora) u odnosu na grupe u kojima je bilo manje od 200 ćelija tumora. Posmatrajući ukupan broj biopsijskih uzoraka, neovisno o tipu biopsije i predominantnom tipu, a s obzirom na procenat volumenske gustine tumorskog tkiva pri postavljenoj granici od 10% zabeležili smo manji broj uzoraka sa manje od 10% tumorskih ćelija (32%), ali je taj procenat daleko veći u odnosu na rezultate *Zu-a* koji je manje od 10% tumorskog tkiva evidentirao u 4,7% slučajeva (245).

Kao što je poznato više od 70% adenokarcinoma pluća ima mešanu histološku građu (109, 119,125,309). U ovom istraživanju smo, primenom χ^2 neparametrickog i Fišerovog dvostranog testa, poredili odnos broja čistih i mešanih tumora u biopsijskim i hirurškim uzorcima, distribuciju i poklapanje predominantnih tipova u biopsijskim i hirurškim uzorcima. Uočena razlika u prvoj kategoriji poređenja je statistički značajna ($p < 0,001$) odnosno histološka građa

adenokarcinoma pluća u hirurškim uzorcima je kompleksnija u odnosu na kompleksnost histološke građe u biopsijskim uzorcima. Poredeći raspodelu predominantnih tipova u biopsijskim uzorcima u odnosu na hirurške uzorke našli smo da uočena razlika nije statistički značajna ($p=0,65583$) odnosno da se svi tipovi podjednako pojavljuju nezavisno da li je analiziran biopsijski ili hirurški uzorak. Pored navedenog uočili smo i da postoji poklapanje predominantnih tipova u biopsijskim i hirurškim uzorcima kod 80% bolesnika. Na osnovu ovih rezultata nalazimo da predominantni tip u biopsijskom uzorku u velikoj meri može da ukaže da na histološki profil adenokarcinoma u hirurškom uzorku.

U detekciji mutacija, primenom savremenih molekularnih tehnika, mogu da se koriste biopsijski i citološki uzorci ravnopravno sa hirurškim uzorcima čime se otklanja potreba za invazivnim dijagnostičkim procedurama (142,249,266). Veliki problem u plućnoj onkologiji jeste niska celularnost biopsijskih i citoloških uzoraka. Procentualna zastupljenost tumorske ćelijske populacije se može povećati u citološkom uzorku selektivnim struganjem sa pločice ili mikrodisekcijom tumora u parafinskom kalupu biopsijskog uzorka čime je redukovano broj ćelija zapaljenja i stromalnih ćelija (249,266). Uzorci sa malim brojem tumorskih ćelija često su adekvatni za postavljanje dijagnoze bolesti, ali ne i za molekularno testiranje. Insuficijentnost biopsijskih uzoraka za molekularno testiranje može da bude posledica: male veličine uzorka, disperzije tumorskih ćelija zbog nekroze tumora, oštećenja samog uzorka, kontaminacije tumorskog tkiva sa ćelijama krvi ili ćelijama sluznice bronha (245,252). Međutim, slaba amplifikacija DNK može da bude posledica i degradacije samih ćelija tumora koja je indukovana primenom različitih hemijskih sredstava upotrebljenih u procesu fiksacije (267).

Da se koncentracija izolovane DNK ne razlikuje kod bolesnika sa *wt* EGFR i mutiranim EGFR. potvrdili su naši rezultati i rezultati *Krawczyk* koji je u analizi EGFR mutacionog statusa kod 2450 bolesnika evidentirao slične vrednosti između *wt* EGFR i mutiranih EGFR karcinoma pluća ($57,4\pm 228,18$ vs $51\pm 202,93$ ng/ μ l; $p=0,54$) (142). Koristeći t-test mi smo poredili srednje vrednosti koncentracije izolovane DNK u hirurškim i biopsijskim uzorcima kod pacijenata sa *wt* EGFR i mutiranim EGFR tumorom i u svim slučajevima je ustanovljeno, sa rizikom od 5%, da nema statistički značajne razlike među poređenim vrednostima ($p=0,132$ i $p=0,641$).

Podaci o koncentraciji izolovane DNK u endobronhijalnim biopsijskim uzorcima se razlikuju. *Krawczyk* je od 2450 analiziranih uzoraka imao 512 (21%) uzoraka dobijenih endobronhijalnih biopsijom sa prosečno $37,3\pm 106,2$ ng/ μ l se razlikuju od rezultata *Scarpino*

koji su bili nižih vrednosti kod koje nije uočena statistički značajna razlika između uzoraka dobijenih transtorakalnom punkcijom i bronhobiopsijom (8,0 ng/ μ l vs 9,2 ng/ μ l) (142,252). Za razliku od poslednje studije mi smo ustanovili da koncentracija izolovane DNK zavisi od tipa biopsije i da postoji statistički značajna razlika između uzoraka dobijenih bronhobiopsijom i kateter biopsijom ($p=0,055$) kao i da uočena razlika između koncentracije izolovane DNK i predominantnog histološkog tipa nije statistički značajna ($p=0,237$). Broj insuficijentnih uzoraka u kojima je analiziran molekularni EGFR status zavisi od kvaliteta analiziranog materijala. *Khode* je u analizi 56 uzorka parafinskih blokova tumorskog tkiva insuficijentnu količinu ekstrahovane DNK evidentirao kod 6 (11%) slučajeva. Ovaj autor preporučuje da se u takvim slučajevima ponovi uzorkovanje materijala za molekularno testiranje (264). Iako krv i nekroza mogu da budu limitirajući faktori za molekularno testiranje u našem istraživanju nisu bili faktori isključivanja, a procenat dobijenih invalidnih rezultata od 10% je u skladu rezultatima predhodne studije. Naime, nekrozu smo evidentirali u dva slučaja sa udelima od 20% i 40%, ali su dobijeni rezultati bili validni. Za razliku od nekroze krv smo našli u značajno većem broju biopsijskih uzoraka (20/60) od kojih su u dva slučaja dobijeni invalidni rezultati. Kako je krv (sa udelom od 32%) nađena i u jednom od tri EGFR mutirana slučaja njeno prisustvo u manjem procentu ne smatramo apsolutnim limitirajućim faktorom za isključivanje takvih uzoraka iz molekularnog testiranja pod uslovom da se koriste visoko senzitivni testovi i saglasni smo sa stavom da momenat fiksacije značajno utiče na rezultate molekularnog testiranja. Zahvaljujući primeni visoko senzitivnih testova za molekularnu analizu EGFR mutacije je moguće detektovati i u uzorcima sa manje od 100 ćelija tumora. Ovaj stav su podržali rezultati jedne od novijih studija iz 2015. godine u kojoj je u 73/99 (74%) slučajeva u biopsijskom uzorku bilo manje od 100 ćelija tumora. EGFR mutacioni status je bio pozitivan u 59 slučajeva od kojih je u 30 (51%) evidentirano manje od 100 ćelija tumora (265). Ukoliko je dobra amplifikacija pozitivne unutrašnje kontrole ferekvencija mutacija ne zavisi od procenta tumorskih ćelija u analiziranom uzorku. Taj stav je potvrdio *Krawczyk* koji je u analizi 2079 uzoraka koji su imali ≥ 20 tumorskih ćelija mutacije detektovao u 191 (9,2%) uzoraka, odnosno u 30 od 371 uzorka sa < 20 tumorskih ćelija u 30 (8,1%) uzoraka (142). Ukupan broj i procenat tumorskih ćelija nije presudan faktor u određivanju adekvatnosti uzorka za molekularno EGFR testiranja. Novodizajnirane i visokosenzitivne tehnike za određivanje EGFR mutacionog statusa obezbeđuju dovoljan broj kopija EGFR mutiranih gena i kada je broj ćelija tumora u analiziranom uzorku mali. *Scarpino* u analizi 120 biopsijskih uzoraka od kojih je 59 bilo u prvoj grupi ($<20\%$ tumorskih ćelija) i 61 u drugoj grupi ($>20\%$ tumorskih ćelija) detektuje EGFR mutacije kod 11 (19%)

slučajeva iz prve grupe i 15 (25%) slučajeva iz druge grupe. Uočena razlika između EGFR mutiranih i *wt* EGFR u odnosu na broj ćelija nije statistički značajna ($p > 0,05$) (252). Suprotno ovim rezultatima, kada je granica poređenja 20%, *Paliogiannis* je pri granici poređenja od 50% tumorskih ćelija zabeležio statistički značajnu razliku u broju detektovanih mutacija između dve grupe. U ovoj studiji je u prvoj grupi (>50% tumorskih ćelija) od 450 uzoraka 57 (12,7%) mutiranih dok je u drugoj grupi (<50% tumorskih ćelija) bilo 65 uzoraka od kojih su 2 (3,1%) mutirana. Iako je srednji procenat tumorskih ćelija u biopsijskim uzorcima 50,3% (20%-90%) manji u odnosu na hirurške uzorke 63,1% (40%-90%) ovaj autor nije evidentirao statistički značajnu razliku između EGFR mutiracija u biopsijskim i hirurškim uzorcima (49/429; 11,4% vs 10/86; 11,6%) (244). Rezultati našeg istraživanja se razlikuju od rezultata ovih autora. U našem istraživanju svi slučajevi sa EGFR mutacijom su imali manje od 20% volumenske gustine tumorskog tkiva čime smo doprineli shvatanju da je relevantan EGFR mutacioni status moguće odrediti i u uzorcima sa malim brojem ćelija pod uslovom da je tumor mutiran i da su primenjeni visoko senzitivni testovi za molekularnu analizu.

Hirurški resecirani uzorci predstavljaju zlatni standard za dobijanje kvalitetnog tumorskog tkiva za analizu EGFR mutacionog statusa zbog većeg procenta tumorskog tkiva, veće koncentracije izolovane DNK, manjeg procenta invalidnih rezultata u odnosu na biopsijske i citološke uzorke (268). Takav stav su potvrdili i rezultati našeg istraživanja u kome je prosečna koncentracija izolovane DNK u hirurškim uzorcima (28,317 ng/μl; u rasponu od 0,584 do 110 ng/μl) veća u odnosu na koncentraciju izolovane DNK dobijenu u biopsijskim uzorcima (5,805 ng/μl; u rasponu od 0,375 do 19,2 ng/μl), broj neuspešnih izolacija manji [1/60 (1,7%) vs 6/60 (10%)] su u skladu sa ovim rezultatima.

Diskrepanca EGFR mutacionog statusa između citoloških, biopsijskih i hirurških uzoraka, bez obzira da li su uzeti sa istog ili različitog mesta kod istog bolesnika je retka. Ona može da bude posledica različitog klona i tumorske heterogenosti, greške prilikom selekcije uzoraka odnosno uzimanje uzoraka sa malim sadržajem tumora i bogatom limfocitnom pozadinom ukoliko je reč o citološkim uzorcima, pojave novih mutacija za vreme razvoja metastaza ili primenjene onkološke terapije (296,321). Taj stav je potvrdio i *Khod* analizirajući 37 uparenih citoloških i biopsijskih uzoraka uzetih sa istog mesta u razmaku od mesec dana. Kod jednog bolesnika (1/37; 2,7%) dobijen je *wt* EGFR u citološkom uzorku dok je u hirurškom uzorku nađena mutacija EGFR na egzonu 18. Isti autor je analizirajući uzorke dobijene sa različitih mesta evidentirao diskrepancu u EGFR mutacionom statusu kod 4/23 bolesnika. Kod dva bolesnika je uparen citološki uzorak dobijen iz primarnog tumora sa hirurškim uzorkom iz

metastaze, dok su kod druga dva bolesnika upareni biopsijski i citološki uzorci iz metastaza (264). U našem istraživanju smo uparili nalaz EGFR mutacionog statusa u biopsijskim i hirurškim uzorcima, dobijenim sa istog anatomskog mesta, kod 60 bolesnika. Kod jednog bolesnika EGFR mutacija je evidentirana u hirurškom uzorku, ali ne i u biopsijskom uzorku. Diskrepanca je u ovom slučaju najverovatnije posledica potrošnje tumorskog tkiva prilikom dijagnostikovanja bolesti.

Jedna od poslednjih velikih studija u kojoj je prikazana globalna mapa incidenca EGFR mutacija je meta analiza objavljena u avgustu 2015. godine. Podaci obrađeni u ovoj analizi su prikupljeni pretragom četiri velike baze podataka MEDLINE, PubMed, BIOSIS i Embase. Ukupno je analizirano 151 studija sa 33162 bolesnika sa dijagnostikovanim nemikrocelularnim karcinomom pluća od kojih je 9749 bilo sa pozitivnim EGFR mutacijama. Studije sa manje od 100 ispitanika su uključene u analizu samo za zemlje sa oskudnim podacima o EGFR mutacionom statusu. Prema rezultatima ove analize prosečno je najviše studija bilo iz Azije (87), Evrope (39), a najmanje iz Afrike (1). Najniža procentualna vrednost ranga frekvencije EGFR mutacija je zabeležena u studijama iz severne Amerike (3%) i Evrope (6%) dok je najviša vrednost ranga zabeležena u studijama iz Azije (76%) i Severne Amerike (67%). Najveća prosečna vrednost frekvencije EGFR mutacija je evidentirana u Aziji (47%), a najniža u Okeaniji (12%) (270). Poredeći podatke iz ove studije sa podacima studije iz 2013. godine uočavamo da je evidentiran rast frekvence EGFR mutacija u Evropi. Naime, u obe studije su analizirani podaci iz 19 zemalja. Frekvencija EGFR mutacija je porasla sa 13,8% (u rasponu 5% do 37%) na 15% (u rasponu 6% do 41%) s tim da se u obe studije ne nalaze podaci sa teritorije Srbije (175). U prvoj većoj studiji analize EGFR mutacionog statusa bolesnika sa teritorije Srbije EGFR mutacije su evidentirane kod 42/360 (11,7%) bolesnika sa dijagnostikovanim adenokarcinomom pluća (271). Posmatrajući rezultate EGFR mutacionog statusa u evropskim studijama slične rezultate je pokazala analiza EGFR mutacionog statusa bolesnika sa Sardinije (11,5%) (244). Međutim, publikovane su i studije sa nižom frekvencijom EGFR mutacija u odnosu na rezultate ovih autora (272).

Molekularno testiranje je pouzdano u primarnom tumoru tako i u metastazama (142). *Krawczyk* je i u ranijim radovima analizirao EGFR mutacioni status u primarnom tumoru i metastazama iz mozga te zabeležio sličnu frekvenciju EGFR mutacija. U ovoj studiji je frekvencija EGFR mutacija neznatno veća (9/143; 6,3%) u odnosu na rezultate našeg istraživanja (5%) (268). Razlike između frekvencija EGFR mutacija u našem istraživanju su

najverovatnije posledica etničkih razlika među ispitanicima, različitih kriterijuma u odabiru pacijenata za EGFR testiranje, kao i pušačkih navika.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su EGFR mutacije češće kod žena i u skladu su sa rezultatima većine objavljenih studija na svim kontinentima (175,244,271). Iako je *Paliogiannis* u svom istraživanju imao gotovo dvostruko više muškaraca u odnosu na žene mutacije su bile detektovane češće kod žena (35/158; 22,2%) u odnosu na muškarce (24/357; 6,7%) (244). Da postoji statistički značajna povezanost između EGFR mutacionog statusa i ženskog pola došli su *Zarić* i saradnici u jednoj od prvih studija analize mutacionog statusa EGFR gena u adenokarcinomu pluća na teritoriji Srbije. U ovoj prospektivnoj nerandomiziranoj studiji sprovedenoj na IPBV i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (od januara 2012. do novembra 2013. godine) je bilo uključeno 360 bolesnika, 244 (67,8%) muškaraca i 116 (32,2%) žena. EGFR mutacije su detektovane kod 11,7% bolesnika, uz statistički značajnu povezanost između EGFR mutacionog statusa i ženskog pola (271). Iako su mutacije češće kod žena pol ne treba da bude faktor isključivanja iz molekularnog testiranja što su potvrdili i rezultati našeg istraživanja u kome smo EGFR mutacije detektovali i kod jednog muškarca, od ukupno tri bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom.

U objavljenim studijama je analizirana povezanost EGFR molekularnog statusa sa prosečnom starosti bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom pri čemu je rang starosne dobi u kojoj su detektovane EGFR mutacije različiti, ali je prosečna starost slična (61,5 vs 61 godina) (175,271). Frekvencija EGFR mutacija raste sa godinama. Ovaj stav je podržala studija *Zhanga* i saradnika koji su evidentirali najnižu frekvenciju EGFR mutacija u grupi bolesnika mlađih od 54 godine (66,9%), veću u grupi od 54 do 61 godina (76,6%) dok je najviša kod starijih od 61 godinu (85,5%) ($p=0.004$) (273). Slična distribucija bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom u odnosu na starosnu dob bila je i u studiji 257 bolesnika višeg stadijuma bolesti gde je EGFR mutacioni status bio određen kod 165 bolesnika od kojih je 33 (47%) mlađih od 60 godina, a 36 (53%) starijih (244). Prosečna starost ispitanika u našem istraživanju je bila 63 godine. Od tri slučaja sa pozitivnim EGFR mutiranim adenokarcinom pluća od tri bolesnika dva su bila starija od 60 godina čime smo podržali tvrdnje ovih autora.

Odnos između pušačkih navika i EGFR mutacija je bio predmet analize brojnih studija (87,244,271,273). *Campos-Parra* je u retrospektivnoj studiji analizirao odnos nove klasifikacije adenokarcinoma pluća i EGFR mutacioni status u bolesnika sa proširenom stadijumu bolesti (IIIB i IV) u periodu od 2007. do 2010. godine. Od 257 bolesnika pušača je bilo 158 (59,7%), a razlika između pušačkih navika nije statistički značajna ($p=0,356$).

Međutim, od 69 bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom nepušača je bilo 52 (75,4%), a pušača 17 (24,6%) i uočena razlika je statistička značajna (87). Visok procenat EGFR mutiranih adenokarcinoma u kategoriji nepušača su zabeležili i drugi autori (244,273). Suprotno ovim rezultatima Zarić u svojoj studiji od 360 bolesnika sa pozitivnim EGFR mutacionim statusom zabeležio više aktivnih 204 (57,0%) i bivših pušača 77 (21,5%) u odnosu na nepušače 77 (21,5%) sa statistički značajnom vezom između pozitivnog EGFR mutacionog statusa i pušenja ($p < 0.001$) (271). Slično ovim rezultatima u našem istraživanju EGFR mutacije su bile češće kod pušača (2/3). Međutim, treba napomenuti da je vrednost *pack/years* kod jednog od pušača sa EGFR mutiranim adenokarcinomom iznosila 2,5. Uočene razlike i sličnosti u odnosu na rezultate ovih studija su najverovatnije posledica različitog stila života među ispitanicima, njihovog ekonomskog standarda kao i geografskih regiona iz kojih potiču publikovani rezultati.

Od 2011 godine su publikovane studije u kojima je analizirana povezanost između predominantnog histološkog tipa i EGFR mutacija, a dobijeni rezultati su kontradiktorni. (87,100,119,258,273). Za razliku od *Campos-Parre* koji nije uočio povezanost između EGFR mutacionog statusa i predominantnog tipa *Zhang* i saradnici su u analizi 349 adenokarcinoma pluća zabeležili da su EGFR mutacije bile najzastupljenije u acinarno predominantnom tipu (75%) (87,273). Suprotno ovim rezultatima *Prudence* je u analizi 69 adenokarcinoma detektovao EGFR mutacije u 25% slučajeva gde su bili zastupljeni svi predominantni tipovi adenokarcinoma i jedan koloidni adenokarcinom. U ovoj studiji EGFR mutacije su bile najfrekventnije u mikropapilarno predominantnom tipu (58%) (119). Iako je učestalost EGFR mutacija u mikropapilarno predominantnom tipu u studiji *Sun-a* (31%) manja u odnosu na rezultate *Prudenc*-ove studije ovaj autor zaključuje da postoji značajna razlika u EGFR mutacionom statusu između bolesnika sa mikropapilarno predominantnim tipom u odnosu na druge tipove ($p = 0.0026$). Isti autori nalaze da su EGFR mutacije retke u solidno predominantnom tipu (1/24; 4% vs 1/39; 2,6%) (258). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su mutacije najfrekventnije u solidno predominantnom tipu (2/3), ali i da su nađene u acinarno predominantnom tipu kod jednog od tri bolesnika sa EGFR mutiranim adenokarcinomom. Različiti rezultati odnosa između predominantnog histološkog tipa i EGFR mutacija mogu da budu posledica malog broja bolesnika uključenih u naše istraživanje, etničkih razlika među ispitanicima ovih studija i našeg istraživanja s tim da naše istraživanje ima nekoliko limitirajućih faktora: bilo je retrospektivnog karaktera, urađeno je u jednoj instituciji i bio je uključen mali broj bolesnika.

U publikovanim radovima je prikazan odnos između stadijuma bolesti i EGFR mutacija (143,181). Od 2298 bolesnika sa dijagnostikovanim adenokarcinomom pluća u periodu od 2004. do 2009. godine u studiji *Sun* 896 (39%) bolesnika je bilo u višem stadijumu bolesti. Mutacioni EGFR status je bio poznat kod 496 bolesnika od kojih je 407 bilo u stadijumu IIIB/IV, a 89 sa recidivom bolesti. EGFR mutacije su bile pozitivne kod 291 (58,66%) (143). Sličnu raspodelu prema stadijumu bolesti prikazali su i drugi autori. Zarić i saradnici su prospektivnoj nerandomiziranoj studiji je analiziran EGFR mutacioni status kod 92 bolesnika u IIIB (25,6%) i 268 bolesnika u IV (74,4%) stadijumu bolesti i utvrđena je statistički značajna povezanost između T statusa u TNM klasifikaciji i EGFR mutacija ($p=0,019$) (271). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je stadijum bolesti u kome se nalaze bolesnici sa mutiranim adenokarcinom značajno niži (IIA-1/3 i IIB-2/3) u odnosu na rezultate ovih autora. S obzirom da se po jedan slučaj EGFR mutiranog adenokarcinoma nalazio u stadijumu pT2a, pT2b i pT3 nije bilo moguće analizirati udruženost između EGFR mutacionog statusa i pT stadijuma. Uočene razlike u odnosu na rezultate drugih autora su posledica različitih inkluzivnih kriterijuma prilikom dizajniranja istraživanja.

Primenom Cobas® EGFR *Mutation Test* postoji mogućnost detekcije više tipova mutacija. Delecije na egzonu 19 su najčešće mutacije na EGFR genu, nalaze se u oko 50% do 60% bolesnika sa pozitivnim EGFR mutacionim statusom (87,175,264,271,273). Međutim u našem istraživanju ovaj tip mutacija nismo detektovali. Za razliku od rezultata ovih autora gde su mutacije na egzonu 21 (L858R) bile česte (~40%) u našem istraživanju su bile značajno češće (kod dva od tri bolesnika sa mutiranim EGFR adenokarcinomom). Prosečna incidencija mutacija na egzonu 20 kod bele rase i azijata je 9%, češće su kod nepušača, ali nije uočena statistički značajna razlika u raspodeli prema starosti, polu, etničkoj pripadnosti i stadijumu bolesti. Insercije na egzonu 20 predstavljaju kombinaciju insercije na kratkom kraku ili duplikacije od 3 do 21 *base pairs*-bp, predominantno između kodona 767 i 774 (274). Nižu frekvenciju mutacija na egzonu 20 u odnosu na ovu studiju zabeležili su drugi autori. *Campos- Parra* je na egzonu 20 evidentirao dva tipa mutacija [S768I (2.6%) i T790M (6.5%)] dok je *Zhang* insercije na egzonu 20 imao kod 10/253 (4%) bolesnika sa pozitivnim EGFR mutacijama (87,273). Suprotno ovim rezultatima kod drugih autora frekvencija mutacija na egzonu 20 je viša [3/29 (10.34%)], a razlikuje se i tip mutacija (GG779F, S768I, T790M) (175). U našem istraživanju insercije na egzonu 20 smo evidentirali kod jednog od tri bolesnika sa pozitivnim EGFR mutacionim statusom. Mutacije na egzonu 18 su prisutne u manje od 10% EGFR mutiranih adenokarcinoma (87,175,273). U studiji 29 bolesnika sa

EGFR mutiranim nemikrocelularnim karcinomom pluća zabeležen samo jedan slučaj mutacija na egzonu 18 (G717C) (226). Sličan procentualni udio mutacija na ovom egzonu (3%) zabeležili su i drugi autori, ali za razliku od prethodno navedenih rezultata u pitanju su bile mutacije tipa G719X (273). Mutacije na ovom egzonu nismo evidentirali u našem istraživanju. U analizi EGFR molekularnog statusa kod 291 bolesnika sa dijagnostikovanim adenokarcinomom pluća EGFR po jedan tip mutacija je bio kod 259/291 (89%) bolesnika. U istom istraživanju duple i triple mutacije su bile kod 32/291 (11%) bolesnika (143). Slični su i rezultati studije u kojoj su evidentirane 31 EGFR mutacija kod 29 bolesnika odnosno kod dva bolesnika mutacije su bile duple. U jednom slučaju T790M (egzon 20) i L858R (egzon 21), a u drugom G719C (egzon 18) i S768 (egzon 20) (175). U našem istraživanju duple ili triple mutacije nismo evidentirali. Razlike u distribuciji tipova EGFR mutacija u našem istraživanju u odnosu na ove rezultate su najverovatnije posledica malog procentualnog udela EGFR mutiranih adenokarcinoma pluća u našem uzorku što je ujedno sa brojem ukupno analiziranih slučajeva limitirajući faktor našeg istraživanja.

Udruženost pozitivne TTF-1 ekspresije i pozitivnog EGFR mutacionog statusa ima klinički i biološki značaj, predstavlja prediktor ukupnog preživljavanja [*overall survival*-(OS)] i vreme do progresije bolesti [*progression free-survival* (PFS)] (146). Bolesnici sa EGFR mutiranim i TTF-1 pozitivnim adenokarcinomom imaju duže OS u odnosu na bolesnike sa EGFR mutiranim i TTF-1 negativnim adenokarcinomom (27,4 vs 11,8 meseci; $p=0,001$) i duži PFS (8,7 vs 5,7 meseci) (143). Stoga, TTF-1 ekspresija treba da bude sastavni dio patološkog izveštaja kada god je to moguće. Neki autori preporučuje da hemioterapija bude inicijalna terapija u IV stadijumu bolesti kod bolesnika sa TTF-1 pozitivnom ekspresijom (140). Korelaciju između TTF-1 ekspresije i EGFR mutacionog statusa je moguće analizirati u tkivnim uzorcima i ćelijskim blokovima izrađenim od citološkog materijala (cito-blok) (275,143). Iako je inicijalna dijagnoza invazivnog adenokarcinoma u ovom istraživanju postavljena u biopsijskim uzorcima odnos između TTF-1 ekspresije i EGFR mutacionog statusa smo analizirali u hirurškim uzorcima isključivo zbog veće količine tumorskog kiva. Naši rezultati su pokazali da postoji visok stepen korelacije između EGFR mutacionog statusa i TTF-1 pozitivne ekspresije slično rezultatima drugih autora (140,143,275,276). *Shanzhi* je analizirao EGFR mutacioni status i TTF-1 ekspresiju kod 664 bolesnika od kojih je TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma bilo 636, 18 tumora sa TTF-1 ekspresijom koja je označena kao delimično pozitivna (+/-) i 10 sa TTF-1 negativnim adenokarcinomom. Od poslednjih 10 slučajeva u jednom (10%) je evidentirano prisustvo EGFR mutacije (276). Rezultati našeg

istraživanja su saglasni rezultatima ovih autora. U našem istraživanju TTF-1 ekspresija je evidentirana kod 52/60 (87%) bolesnika, a pozitivni EGFR mutacioni status kod 3/60 (5%) od kojih je TTF-1 ekspresija bila pozitivna kod dva bolesnika, odnosno intenzivna u $\geq 50\%$ tumorskog tkiva (skor 4), a u jednom slučaju adenokarcinom je bio TTF-1 negativan stoga smatramo da TTF-1 negativni rezultati ne treba da budu faktor na osnovu koga će bolesnici biti isključeni iz molekularnog testiranja.

7. ZAKLJUČCI

- 1) Histopatološka građa adenokarcinoma pluća u hirurškim uzorcima je heterogenija u odnosu na biopsijske uzorke (77% vs 18%) i ta razlika je statistički značajna ($p < 0,001$).
- 2) Acinarno predominantni tip je najzastupljeniji predominantni tip u hirurškim i biopsijskim uzorcima bez statistički značajne razlike u raspodeli predominantnih tipova u njima ($p = 0,65883$).
- 3) Predominantni tip u primarnom invazivnom adenokarcinomu pluća određuje predominantni tip u limfogenim metastazama.
- 4) EGFR mutacije tipa insercija na egzonu 21 i L858R mutacija na egzonu 20 su detektovane kod tri od 60 (5%) bolesnika u pet od 120 uzoraka (tri hirurška i dva biopsijska uzorka), češće kod žena, starijih od 60 godina, pušača i u solidno predominantnom tipu.
- 5) Ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji izolovane DNK između EGFR mutiranih i *wt* EGFR adenokarcinoma u biopsijskim ($p = 0,132$) i hirurškim uzorcima ($p = 0,641$).
- 6) Procenat invalidnih rezultata prilikom određivanja EGFR mutacionog statusa u invazivnom adenokarcinomu je veći u biopsijskim uzorcima u odnosu na hirurške uzorke (10% vs 1,7%).
- 7) Postoji statistički značajna razlika između broja TTF-1 pozitivnih (52; 87%) i TTF-1 negativnih (8; 13%) adenokarcinoma ($p < 0,001$), ali ne i u raspodeli ovih bolesnika prema polovima ($p = 0,1231$), prosečnoj starosti, pušačkim navikama ($p = 0,6488$) i prosečnoj veličini tumora ($p = 0,21$).
- 8) Postoji pozitivna korelacija između TTF-1 pozitivne ekspresije i EGFR mutacionog statusa stoga TTF-1 pozitivna ekspresija može da bude prediktor pozitivnog EGFR mutacionog statusa u invazivnom adenokarcinomu pluća.
- 9) Bronhoskopska biopsija je reprezentativni uzorak za određivanje EGFR mutacionog statusa zato što:

- većina dijagnostičkih biopsijskih uzoraka ima više od 100 očuvanih tumorskih ćelija, nema razlike u raspodeli predominantnih tipova u odnosu na hirurške uzorke,
- EGFR mutacije se detektuju u uzorcima sa manje od 100 tumorskih ćelija i manje od 20% volumenske gustine tumorskog tkiva,
- razlika između koncentracije izolovane DNK u EGFR mutiranim i *wt* EGFR adenokarcinomima u biopsijskim i hirurškim uzorcima nije statistički značajna ($p=0,132$ i $p=0,641$).

8. LITERATURA

1. Adler I. Primary malignant growths of the lungs and bronchi. New York: Longmans, Green; 1912.
2. International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2012; Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr> Accessed February 12, 2013.
3. Henley JS, Richards TB, Underwood MJ, Ehemann CR, Plescia M, Timothy A, et al. Lung cancer incidence trends among men and women United States, 2005-2009. *MMWR*. 2014 Jan 10;63(1):1-5.
4. El-Basmy A. Profile of lung cancer in Kuwait. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(10):6181-4.
5. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
6. Alberg AJ, Ford JG and Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2007;132(3 Suppl):29S-55S.
7. Lewis DR, Chen HS Lewis DR, Chen HS, Feurer EJ. SEER Cancer statistics review, 1975-2008. Bethesda, MD National Cancer Institute; 2010. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/. Accessed October 20, 2013.
8. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*. 2004 Jul 1; 101(1):3-27.
9. Pfannschmidt J, Muley T, Hoffmann H, Bulzebruck H, Dienemann H. Prognosis after complete surgical resection for non-small cell lung cancer based on the staging classification. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006 Nov 24;131(47):2643-8.
10. Trends to tobacco use. American lung association research and program services epidemiology and statistics unit. 2010 February. Available at: <http://www.lungusa.org/finding-cures/our-research/trend-reports/Tobacco-Trend-Report.pdf> (accessed on June 14, 2010).
11. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014. Jan-Feb;64(1):9-29.
12. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber HJ, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403.
13. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol*. 2012;23(4):1044-52.
14. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C and Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(3):792-800.
15. Bosetti C, Malvezzi M, Rosso T, Bertuccio P, Gallus S, Chatenoud L, et al. Lung cancer mortality in European women: trends and predictions. *Lung Cancer*. 2012 Dec;78(3):171-8.
16. Zdravstveno-statistički godišnjak Republike. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ Srbije; 2014.
17. Đorđević M, Mitrović N. Maligna oboljenja u Srbiji krajem XX veka (istine i zablude). Beograd: Institut za onkologiju i radiologiju Srbije; 1995. p. 85.
18. Petrović V, Miladinov-Mikov M, Dugandžija T. Topographical analyses of lung cancer incidence and mortality in Vojvodina. 2010 Oct;18(3):71-4.
19. Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers-a review. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(9):1299-311.
20. Mallikarjun S, Rao A, Rajesh G, Shenoy R, Bh MP. Role of tobacco warning labels in informing smokers about risks of smoking among bus drivers in Mangalore, India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(19):8265-70.
21. Vojvođanski godišnjak 2012. Novi Sad: Vojvođanska akademija nauka i umetnosti; 2012.
22. Centers for disease control and prevention (CDC). Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and economic costs-United States, 1995-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002 Apr 12;51(14):300-3.
23. Cancer in Finland 2008 and 2009: Cancer Statistics of the National Institute for Health and Welfare (THL). Available from: http://cancer-fi-bin.directo.fi/@Bin/dd5ff58ee887b1fccaafb85dbd31b675f/1455042618/application/pdf/70942478/SR_2008-2009_030112.pdf.
24. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011 Aug 4;365:395-409.
25. Tockman MS, Mulshine JL. Sputum screening by quantitative microscopy: a new dawn for detection of lung cancer? *Mayo Clin Proc*. 1997 Aug;72(8):788-90.
26. Manser R, Lethaby A, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson MJ, et al. Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jun 21;6:CD001991.

27. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Neal D, Prentice R, Lopez A, et al. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med*. 2013 Jan 24;368:351-64.
28. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. *Robins&Cotran pathologic basis of diseases*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
29. Inamura K, Ninomiya H, Nomura K, Tsuchiya E, Satoh Y, Okumura S, et al. Combined effects of asbestos and cigarette smoke on the development of lung adenocarcinoma: different carcinogens may cause different genomic changes. *Oncol Rep*. 2014 Aug;32(2):475-82.
30. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2000 Jun 15;60(12):3155-9.
31. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet*. 2008 May;40(5): 616-22.
32. Wei C, Han Y, Spitz MR, Wu X, Chancoco H, Akiva P, et al. A case-control study of a sex-specific association between a 15q25 variant and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Dec;20(12):2603-9.
33. Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML, et al. Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Jun 5;150B(4):453-66.
34. Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2009 Jan;124(1):36-45.
35. Dasgupta P, Kinkade R, Joshi B, Decook C, Haura E, Chellappan S. Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Apr 18;103(16):6332-7.
36. Dasgupta P, Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story. *Cell Cycle*. 2006 Oct;5(20):2324-8.
37. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:597-613.
38. Fehringer G, Liu G, Pintilie M, Sykes J, Cheng D, Liu N, et al. Association of the 15q25 and 5p15 lung cancer susceptibility regions with gene expression in lung tumor tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jul; 21(7):1097-104.
39. Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet*. 2010 May;42(5):436-40.
40. Dželetović A, Dimitrijević-Tanasković L. Mladi i duvan-rezultati globalnog istraživanja u Srbiji. *Glasnik Zavoda za zaštitu zdravlja Srbije*. 2007;79:20-4.
41. Jocić I, Jocić J, Macanović G. Učestalost upotrebe duvana među učenicima srednjih škola u Čupriji. *PONS-medicinski časopis*. 2012;9(4):138-44.
42. Christophi CA, Kolokotroni O, Alpert HR, Warren CW, Jones NR, Demokritou P, et al. Prevalence and social environment of cigarette smoking in Cyprus youth. *BMC Public Health*. 2008;8:190.
43. European commission. Health&consumer protection, directorate-general. Available from: http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/Tobacco/Documents/gp_smoke_en.pdf.
44. Hirayama Takeshi. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Bull World Health Organ* [serial on the Internet]. 2000 July [cited 2014 Nov 15];78(7):940-2. Available from: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0042-96862000000700013&lnP=8.
45. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol*. 2005;23(14):3175-85.
46. Prabhat J, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostron B, Thun M, Anderson RN, et al. 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *N Engl J Med*. 2013 Jan 24;368:341-50.
47. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004;328:1519.
48. Shen M, Rothman N, Berndt S, He X, Yeager M, Welch R, et al. Polymorphisms in folate metabolic genes and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*. 2005 Sep; 49(3):299-309.
49. Wei Q, Shen H, Wang LE, Duphorne CM, Pillow PC, Guo Z, et al. Association between low dietary folate intake and suboptimal cellular DNA repair capacity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Oct;12(10):963-9.
50. Palozza P, Simone RE, Catalano A, Mele MC. Tomato lycopene and lung cancer prevention: from experimental to human studies. *Cancers (Basel)*. 2011 Jun;3(2):2333-57.
51. Palaniappan U, Jacobs Starkey L, O'Loughlin J, Gray-Donald K. Fruit and vegetable consumption is lower and saturated fat intake is higher among Canadians reporting smoking. *J Nutr*. 2001 Jul;131(7):1952-8.
52. Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Hellövaara M, Teppo L, Pukkala E, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*. 1997 Aug 1;146 (3):223-30.
53. Voorrips L, Goldbohm A, Brants H, van Poppel GA, Sturmans F, Hermus RJ, et al. A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Apr;9(4):357-65.

54. Johansson M, Relton C, Ueland PM, Vollset SE, Middtun O, Nygård O, et al. Serum B vitamin levels and risk of lung cancer. *JAMA*. 2010 Jun 16;303(23):2377-85.
55. Vardavas CI, Linardakis MK, Hatzis CM, Malliaraki N, Saris WHM, Kafatos AG. Smoking status in relation to serum folate and dietary vitamin intake. *Tob Induc Dis*. 2008 Sep 9;4(1):8.
56. Shen H, Wei Q, Pillow PC, Amos CI, Hong WK, Spitz MR. Dietary folate intake and lung cancer risk in former smokers: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Oct;12(10):980-6.
57. Dai WM, Yang B, Chu XY, Wang YQ, Zhao M, Chen L, et al. Association between folate intake, serum folate levels and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chin Med J*. 2013;126(10):1957-64.
58. Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, van den Brandt PA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2005 Sep;82(3):657-67.
59. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*. 2001;85(11):1700-5.
60. Kohl HW, LaPorte RE, Blair SN. Physical activity and cancer. An epidemiological perspective. *Sports Med*. 1988;6:222-37.
61. Tardon A, Lee WJ, Delgado-Rodriguez M, Dosemeci M, Albanes D, Hoover R, et al. Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Cause Control*. 2005 May;16(4): 389-97.
62. Alfano CM, Klesges RC, Murray DM, Bowen DJ, McTiernan A, Vander Weg MW, et al. Physical activity in relation to all-site and lung cancer incidence and mortality in current and former smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Dec;13(12):2233-41.
63. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J Med Toxicol*. 2012 Jun;8(2):166-75.
64. United States environmental protection agency particulate matter national ambient air quality standards: scope and methods plan for health risk and exposure assessment. Published on February 2009 [cited April 14, 2014]. Available from: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100FLWP.PDF?Dockey=P100FLWP.PDF> .[Ref list] AZ4.
65. Stojiljković DB. Uticaj preoperativnih faktora i primenjene operative procedure na incidencu i mogućnosti lečenja recidiva nesitnoćelijskog karcinoma pluća [dissertation]. Beograd: Medicinski fakultet; 2014.
66. Cao J, Yang C, Li J, Chen R, Chen B, Gu D, Kan H. Association between long-term exposure to outdoor air pollution and mortality in China: a cohort study. *J Hazard Mater*. 2011 Feb 28;186(2-3):1594-600.
67. Dong GH, Zhang P, Sun B, Zhang L, Chen X, Ma N, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and respiratory disease mortality in Shenyang, China: a 12-year population-based retrospective cohort study. *Respiration*. 2012;84(5):360-8.
68. Bimbaum LS, Schroeder JC, Tilson HA. A repeat call for the banning of asbestos. *Environ Health Perspect*. 2010 Jul;118(7):A280.
69. Kazan-Allen L. Asbestos: the human cost of corporate greed. European United Left/Nordic Green Left. 2006. Available from: http://ibasecretariat.org/human_cost_corp_greed_en.pdf.
70. Trichopoulos D, Li FP, Hunter DJ. What causes cancer? *Sci Am*. 1996 Sept;275(3):50-7.
71. Boice JD, Lubin JH. Occupational and environmental radiation and cancer. *Cancer Cause Control*. 1997. May;8(3):309-22.
72. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res*. 2006 Sep 28;608(2):157-62.
73. Milan H. Rančić. Karcinom pluća-epidemiologija i pregled terapijskih modaliteta. *Acta Fac Med Naiss*. 2002;19(1):5-11.
74. Darby S, Hill D, A Auvinen, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochino F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005 Jan;330:223.
75. Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, R. William Field WR, et al. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology*. 2005 Mar;16(2):137-45.
76. Spain D. The association of terminal bronchiolar carcinoma with chronic interstitial inflammation and fibrosis of the lungs. *Am Rev Tuberc*. 1957 Oct;76(4):559-66.
77. Denholm R, Schüz J, Straif K, Stücker I, Jöckel KH, Brenner DR, et al. Is previous respiratory disease a risk factor for lung cancer? *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Sep 1;190(5):549-59.
78. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböller H, Rosenberger A, McCormack V, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol*. 2012 Oct 1;176(7):573-85.
79. Hemminki K, Liu X, Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Effect of autoimmune diseases on risk and survival in histology-specific lung cancer. *Eur Respir J*. 2012 Dec;40(6):1489-95.
80. Lee JY, Jeon I, Lee JM, Yoon JM, Park SM. Diabetes mellitus as an independent risk factor for lung cancer: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer*. 2013 Jul;49(10):2411-23.
81. Klein F, Kotb AWF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 Jul;65(1):13-8.
82. Kirk GD, Merlo C, O' Driscoll P, Mehta SH, Galai N, Vlahov D, et al. HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clin Infect Dis*. 2007 Jul;45(1):103-10.

83. van Eggermond AM, Schaapveld M, Lugtenburg PJ, Krol AD, de Boer JP, Zijlstra JM, et al. Risk of multiple primary malignancies following treatment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):319-27.
84. Kharazmi E, Fallah M, Sundquist K, Hemminki K. Familial risk of early and late onset cancer: nationwide prospective cohort study. *BMJ*. 2012 Dec 20;345:e8076.
85. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6p23-25. *Am J Human Genet*. 2004 Sep;75(3):460-74.
86. Li X, Hemminki K. Inherited predisposition to early onset lung cancer according to histological type. *Int J Cancer*. 2004 Nov;112(3):451-7.
87. Campos-Parra AD, Avilés A, Contreras-Reyes S, Rojas-Marín CE, Sánchez-Reyes R, Borbolla-Escoboza RJ, et al. Relevance of the novel IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in advanced disease. *Eur Respir J*. 2014 May;43(5):1439-47.
88. Arun BJ, Antin G, Vidyasagar B. Role of fiberoptic bronchoscopy in suspected cases of lung cancer. *Int J Evid Based Healthc*. 2014 Nov;1(12):1494-502.
89. Hajmanoochehri F, Mohammadi N, Zohal MA, Sodagar A, Ebtehaj M. Epidemiological and clinicopathological characteristics of lung cancer in a teaching hospital in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(6):2495-500.
90. Dey A, Biswas D, Saha SK, Kundu S, Kundu S, Sengupta A. Comparison study of clinicoradiological profile of primary lung cancer cases: an Eastern India experience. *Indian J Cancer*. 2012 Jan-Mar;49(1):89-95.
91. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2007 Sep;132(3 Suppl):149S-60S.
92. McClelland MT. Paraneoplastic syndromes related to lung cancer. *Clin J Oncol Nurs*. 2010 Jun;14(3):357-64.
93. Travis WD, Brambilla E, Muller Hermelink HK, Haris CC. *Tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC Press; 2004.
94. Travis WD. Reporting lung cancer pathological specimens. Impact of the anticipated 7th Edition TNM Classification based on recommendation of the IASLC Staging Committee. *Histopathology*. 2009 Jan;54(1):3-11.
95. Vallières E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009 Sep; 4(9):1049-59.
96. Kreyberg L. Histological lung cancer types. *APMIS*. 1962;157:1-93.
97. Sakao Y, Miyamoto H, Oh S, Takahashi N, Inagaki T, Miyasaka Y, et al. The impact of cigarette smoking on prognosis in small adenocarcinomas of the lung: the association between histologic subtype and smoking status. *J Thorac Oncol*. 2008 Sep;3(9):958-62.
98. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1995. Jun 15;75(12):2844-52.
99. Travis WD, Brambilla E, Rami-Porta R, Vallières E, Tsuboi M, Rusch V, et al. Visceral pleural invasion: pathologic criteria and use of elastic stains: proposal for the 7th edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2008 Dec;3(12):1384-90.
100. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-85.
101. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947-57.
102. Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, et al. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO Mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol*. 2008 Jun;32(6):810-27.
103. Prudence R, Zoe W, Gavin W, Marissa D, Matthew C, Richard W. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival? A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *Thorac Oncol*. 2011 Sep;6(9):1496-504.
104. Kitamura H, Kameda Y, Ito T, Hayashi H. Atypical adenomatous hyperplasia of the lung. Implications for the pathogenesis of peripheral lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 1999. May;111(5):610-22.
105. Xu L, Tavora F, Battafarano R, Burke A. Adenocarcinoma with prominent lepidic spread: retrospective review applying new classification of the American Thoracic Society. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):273-82.
106. Kadota K, Nitadori JI, Sarkaria IS, Sima CS, Jia X, Yoshizawa A, et al. Thyroid transcription factor-1 expression is an independent predictor of recurrence and correlates with the IASLC/ATS/ERS histologic classification in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Cancer*. 2013 May;119(5):931-8.
107. Solis LM, Behrens C, Raso MG, Lin HY, Kadara H, Yuan P, et al. Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome. *Cancer*. 2012 Nov;118(11):2889-99.

108. Yoshizawa A, Motoi N, Riely G, Sima CS, Gerald WL, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. 2011. May;24(5):653-64.
109. Suda K, Sato K, Shimizu S, Tomizawa K, Takemoto T, Iwasaki T, et al. Prognostic implication of predominant histologic subtypes of lymph node metastases in surgically resected lung adenocarcinoma. *BioMed Res Int*. 2014;2014:645681.
110. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinoma based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *Am Surg Pathol*. 2010 Aug;34(8):1155-62.
111. Goldstraw P. International association for the study of lung cancer staging manual in thoracic oncology. Orange Park, FL: Editorial Rx Press; 2009.
112. Sakurai H, Maeshima A, Watanabe S, Suzuki K, Tsuchiya R, Maeshima AM, et al. Grade of stromal invasion in small adenocarcinoma of the lung: histopathological minimal invasion and prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2004 Feb;28(2):198-206.
113. Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol*. 2012 May;30(13):1438-46.
114. Sterlacci W, Savic S, Schmid T, Oberaigner W, Auberger J, Fiegl M, et al. Tissue-sparing application of the newly proposed IASLC/ATS/ERS classification of adenocarcinoma of the lung shows practical diagnostic and prognostic impact. *Am J Clin Pathol*. 2012 Jun;137(6):946-56.
115. Woo T, Okudela K, Mitsui H, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, et al. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. *Pathol Int*. 2012 Dec;62(12):785-91.
116. Yousem SA, Beasley MB. Bronchioloalveolar carcinoma: a review of current concepts and evolving issues. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Jul;131(7):1027-32.
117. Hu H, Pan Y, Li Y, Wang L, Wang R, Zhang Y et al. Oncogenic mutations are associated with histological subtypes but do not have an independent prognostic value in lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014 Aug 13;7:1423-37.
118. Timoty C, Do H, Sundararajan V, Moore MM, Conron M, Wright GM, et al. The clinical relevance of pathologic subtypes in metastatic lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2014 May;9(5):654-63.
119. Russell PA, Barnett SA, Walkiewicz M, Wainer Z, Conron M, Wright GM, et al. Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol*. 2013 Apr;8(4):461-8.
120. Takuwa T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, et al. Characteristic immunophenotype of solid subtype component in lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncology*. 2012 Nov;19(12):3943-52.
121. Silver SA, Askin FB. True papillary carcinoma of the lung: a distinct clinicopathologic entity. *Am J Surg Pathol*. 1997 Jan;21(1):43-51.
122. Ohe M, Yokose T, Sakuma Y, Osanai S, Hasegawa C, Washimi K, et al. Stromal micropapillary pattern predominant lung adenocarcinoma a report of two cases. *Diagn Pathol*. 2011 Sep 29;6:92.
123. Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Shirakusa T, Tsuchiya E, et al. Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathologic marker for a significantly poor prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jan;27(1):101-9.
124. Kawakami T, Nabeshima K, Makimoto Y, Hamasaki M, Iwasaki A, Shirakusa T, et al. Micropapillary pattern and grade of stromal invasion in pT1 adenocarcinoma of the lung: usefulness as prognostic factors. *Modern Pathol*. 2007 May;20(5):514-21.
125. Furukawa M, Toyooka S, Ichimura K, Yamamoto H, Soh J, Hashida S, et al. Genetic alterations in lung adenocarcinoma with a micropapillary component. *Mol Clin Oncol*. 2016;4(2):195-200.
126. Lin DM, Ma Y, Liu XY, Zheng S, Xue LY, Liu XY, et al. Prognostic significance of micropapillary pattern in pulmonary adenocarcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2006 Mar;35(3):151-4.
127. Pongrac I. Atlas pulomološke citologije. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
128. Bokun R, Tatomirović Ž, Vukašinović-Bokun Z. Medicinska citologija. Beograd: FineGraf; 2006.
129. Koss L, Melamed M. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2005.
130. Pendharkar S, Tremblay T. Guidance on how to identify the cause-a diagnostic approach to pleural effusion. *J Respir Dis*. 2007 Dec;28(12):565-82.
131. Gaur D, Chauhan N, Kusum A, Pathak VP. Pleural fluid analysis-role in diagnosing pleural malignancy. *J Cytol*. 2007 Jan;24(4):183-8.
132. Trevis W, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson A. WHO Classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC; 2015.
133. Idowu MO, Powers CN. Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics-a review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010 Mar;3(4):367-85.
134. Thivolet-Bejui F. Cytopathological pitfalls in bronchopulmonary tumors. *Diagn Cytopathol*. 1997 Dec;17(6):412-6.

135. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 2011 Oct;24(10):1348-59.
136. Lee J, Kim S, Shima HS, Napsin A is an independent prognostic factor in surgically resected adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2012 Jul;77(1):156-61.
137. Graziano SL, Gu L, Wang X, Tatum AH, Vollmer RT, Strauss GM, et al. Prognostic significance of mucin and p53 expression in stage IB non-small cell lung cancer: A laboratory companion study to CALGB 9633. *J Thorac Oncol.* 2010 Jun;5(6):810-7.
138. Chung K, Huang Y, Chang YL, Yu CJ, Yang CH, Chang YC, et al. Clinical significance of thyroid transcription factor-1 in advanced lung adenocarcinoma under epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment. *Chest.* 2012 Feb;141(2):420-8.
139. Katoh R, Kawaoi A, Miyagi E, Li X, Suzuki K, Nakamura Y, et al. Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2000 May;13(5):570-6.
140. Somaiah N, Fidler MJ, Garrett-Mayer E, Wahlquist A, Shirai, K, Buckingham L, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations are exceptionally rare in thyroid transcription factor (TTF-1)-negative adenocarcinomas of the lung. *Oncoscience.* 2014 Aug 7;1(8):522-8.
141. Gahr S, Stoehr R, Geissinger E, Ficker JH, Brueckl WM, Gschwendtner A, et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br J Cancer.* 2013 Oct 1;109(7):1821-8.
142. Krawczyk P, Ramlau R, Chorostowska-Wynimko J, Powrózek T, Lewandowska MA, Limon J, et al. The efficacy of EGFR gene mutation testing in various samples from non-small cell lung cancer patients: a multicenter retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015 Jan;141(1):61-8.
143. Sun PL, Seol H, Lee HJ, Yoo SB, Kim H, Xu X, et al. High incidence of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features. *J Thorac Oncol.* 2012 Feb;7(2):323-30.
144. Xu Y, Liu B, Shi QL, Huang PL, Zhou XJ, Ma HH, et al. Thymidine kinase 1 is a better prognostic marker than Ki-67 for pT1 adenocarcinoma of the lung. *Int J Clin Exp Med.* 2014 Aug 15;7(8):2120-8.
145. Yamashita S, Moroga T, Tokuiishi K, Miyawaki M, Chujo M, Yamamoto S, et al. Ki-67 labeling index is associated with recurrence after segmentectomy under video-assisted thoracoscopic surgery in stage I non-small cell lung carcinoma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;17(4): 341-6.
146. Carvalho L. Reclassifying bronchial-pulmonary carcinoma: differentiating histological type in biopsies by immunohistochemistry. *Rev Port Pneumol.* 2009;15(6):1101-9.
147. Brunnström H, Johansson L, Jirstrom K, Jönsson M, Jönsson P, Planck M. Immunohistochemistry in the differential diagnostics of primary lung cancer: an investigation within the Southern Swedish LungCancer Study. *Am J Clin Pathol.* 2013 Jul;140(1):37-46.
148. Boveri T. The origin of malignant tumors. Baltimore: Williams&Wilkins; 1929.
149. Budakov P, Eri Ž. Patologija. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2011.
150. Atanacković M, Bacetić D, Basta-Jovanović G, Begić-Janeva A, Boričić I, Brašanac D, et al. Patologija. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2003.
151. Straus B. Genomske promjene i karcinogeneza. *Biochemia Medica.* 1995;5(1):11-21.
152. Budakov P, Eri Ž. Patologija. 6. izd. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2014.
153. Levi-Montalcini R, Meyer H, Hamburger V. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res.* 1954;14:49-57.
154. Levi-Montalcini R, Cohen S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann NY Acad Sci.* 1960;85:324-41.
155. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995 Jul;19(3):183-232.
156. St. Hilaire RJ, Hradek GT, Jones AL. Hepatic sequestration and biliary secretion of epidermal growth factor: evidence for a high-capacity uptake system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983 Jun;80(12):3797-801.
157. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol.* 1965 Dec;12(3):394-407.
158. Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell.* 2003 Feb;11(2):507-17.
159. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003 Sep;12(3):541-52.
160. Roskoski R Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014 Jan;79:34-74.

161. Uribe P, Gonzalez S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract*. 2011 Jun;207(6):337-42.
162. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009 Aug;28(Suppl 1):S24-S31.
163. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Oct;26(10):1742-51.
164. Strategic Alliance: OncLive. Melanoma brings immunotherapy to the forefront, but challenges remain. Available from: www.onclive.com.
165. Irmer D, Funk JO, Blaukat A. EGFR kinase domain mutations-functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene*. 2007 Aug 23;26(39):5693-701.
166. Matsumura I, Mizuki M, Kanakura Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. *Cancer Sci*. 2008 Mar;99(3):479-85.
167. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E, et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res*. 1997 Apr;3(4):515-22.
168. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax*. 2006 Feb; 61(2):140-5.
169. Fang S, Wang Z. (2014). EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Sep 26;8:1595-611.
170. Villa C, Cagle PT, Johnson M, Patel JD, Yeldandi AV, Raj R, et al. Correlation of EGFR mutation status with predominant histologic subtype of adenocarcinoma according to the new lung adenocarcinoma classification of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Oct;138(10):1353-7.
171. Sun Y, Yu X, Shi X, Hong W, Zhao J, Shi L. Correlation of survival and EGFR mutation with predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in stage IB patients. *World J Surg Oncol*. 2014 May;12:148.
172. Wang S, Wang Z. EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer from mainland China and their relationships with clinicopathological features: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(8) 1967-78.
173. Hong S, Fang W, Hu Z, Zhou T, Yan Y, Qin T, et al. Large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese han population. *Sci Rep*. 2014 Dec 1;4:7268.
174. Ye T, Pan Y, Wang R, Hu H, Zhang Y, Li H, et al. Analysis of the molecular and clinicopathologic features of surgically resected lung adenocarcinoma in patients under 40 years old. *J Thorac Dis*. 2014 Oct;6(10):1396-402.
175. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski WT, Tysarowski A, Kowalski DM, Głogowski M, Krzakowski M, et al. EGFR mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: a Polish, single institution study and systematic review of European incidence. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013 Dec;6(12):2800-12.
176. Cai D, Li H, Wang R, Li Y, Pan Y, Hu H, et al. Comparison of clinical features, molecular alterations, and prognosis in morphological subgroups of lung invasive mucinous adenocarcinoma. *OncoTargets Ther*. 2014 Nov 18;7:2127-32.
177. Doval DC, Azam S, Batra U, Choudhury KD, Talwar V, Gupta SK, et al. Epidermal growth factor receptor mutation in lung adenocarcinoma in India: A single center study. *J Carcinog*. 2013 Jul 12;12:12.
178. Dahse R, Driemel O, Schwarz S, Dahse J, Kromeier-Hauschild K, Berndt A, et al. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations are rare in salivary gland carcinomas. *Br J Cancer*. 2009 Feb 24;100(4):623-5.
179. Rekhtman N, Tafe LJ, Chaff JE, Wang L, Arcila ME, Colanta A, et al. Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2013 Apr;26(4):511-22.
180. Rickman OB, Vohra PK, Sanyal B, Vrana JA, Aubry MC, Wigle DA, et al. Analysis of ErbB receptors in pulmonary carcinoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3315-24.
181. Liang Z, Zhang J, Zeng X, Gao J, Wu S, Liu T. Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2010 Jan;10(1):376.
182. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013 Jul;8(7):823-59.
183. Oxnard GR, Miller VA, Robson ME, Azzoli CG, Pao W, Ladanyi M, et al. Screening for germline EGFR T790M mutations through lung cancer genotyping. *J Thorac Oncol*. 2012 Jun;7(6):1049-52.
184. He M, Capelletti M, Nafa K, Yun CH, Arcila ME, Miller VA, et al. EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 15;18(6):1790-7.
185. Huang SF, Liu HP, Li LH, Ku YC, Fu YN, Tsai HY, et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8195-203.

186. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005 Mar;2(3):e73.
187. Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol.* 2012 Jan;13(1):e23–e31.
188. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol.* 2013 Jan;8(1):52-61.
189. Liu Y, Xu ML, Zhong HH, Heng WJ, Wu BQ. EGFR mutations are more frequent in well-differentiated than in poorly-differentiated lung adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2008 Apr;14(4):373-9.
190. Zhang Y, Sun Y, Pan Y, Li C, Shen L, Li Y, et al. Frequency of driver mutations in lung adenocarcinoma from female never-smokers varies with histologic subtypes and age at diagnosis. *Clin Cancer Res.* 2012 Apr;18(7):1947-53.
191. Shim HS, da Lee H, Park EJ, Kim SH. Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the international association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society lung adenocarcinoma classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Oct;135(10):1329-34.
192. Song Z, Zhu H, Wu W, Sun W, Zhang Y. Correlation of EGFR mutation and predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in Chinese patients. *Med Oncol.* 2013;30(3):645.
193. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010 Jun 24;362(25):2380-8.
194. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366:883-92.
195. Lai Y, Zhang Z, Li J, Sun D, Zhou Y, Jiang T, et al. EGFR mutations in surgically resected fresh specimens from 697 consecutive Chinese patients with non-small cell lung cancer and their relationships with clinical features. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 17;14(12):24549-59.
196. Ofiara LM, Navasakulpong A, Beaudoin S, Gonzales AV. Optimizing tissue sampling for the diagnosis, subtyping, and molecular analysis of lung cancer. *Front Oncol.* 2014 Sep 22;4:253.
197. Zhuang YP, Wang HY, Shi MQ, Zhang J, Feng Y. Use of CT-guided fine needle aspiration biopsy in epidermal growth factor receptor mutation analysis in patients with advanced lung cancer. *Acta Radiol.* 2011 Dec 1;52(10):1083-7.
198. Allegrini S, Antona J, Mezzapelle R, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, et al. Epidermal growth factor receptor gene analysis with a highly sensitive molecular assay in routine cytologic specimens of lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2012 Sep;138(3):377-81.
199. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol.* 2014 Feb;9(2):154-62.
200. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol.* 2008 Jun;26(6):983-94.
201. Ellison G, Donald E, McWalter G, Knight L, Fletcher L, Sherwood J, et al. A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 Oct 6;29: 132.
202. Tibiletti MG, Bernasconi B, Dionigi A, Riva C. The applications of FISH in tumor pathology. *Adv Clin Path.* 1999 Oct;3(4):111-8.
203. Trask B, Pinkel D. Fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Methods Cell Biol.* 1990;33: 383-400.
204. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremnes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 15;21(20):3798-807.
205. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000 Nov;157(5):1467-72.
206. Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2005 Oct;18(10):1350-6.
207. Awaya H, Takeshima Y, Furonaka O, Kohno N, Inai K. Gene amplification and protein expression of EGFR and HER2 by chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol.* 2005 Oct;58(10):1076-80.
208. Sholl LM, John Iafrate A, Chou YP, Wu MT, Goan YG, Su L, et al. Validation of chromogenic in situ hybridization for detection of EGFR copy number amplification in nonsmall cell lung carcinoma. *Mod Pathol.* 2007 Oct;20(10):1028-35.
209. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Jul 1;16(13):3349-55.

210. Yu J, Kane S, Wu J, Benedettini E, Li D, Reeves C, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 May 1;15(9):3023-8.
211. Oste C. Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1988 Feb;6(2):162-6.
212. Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCR em tempo real. *Rev Biotechnol Cienc Des*. 2004;33:10-3.
213. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of trypanosoma cruzi DNA in blood samples from chagas disease patients. *PLoS Neglect Trop D*. 2011 Jan;5(1):e931.
214. Stojanović P, Budimlija Z, Tasić M. Mogućnosti lančane reakcije polimeraze. *Acta medica Medianae*. 2001;40(3):65-9.
215. Cikota B, Janežić A, Magić Z. Kvantifikacija ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze. *Vojnosanit Pregl*. 2002;59(5): 551-6.
216. CK-12 Biology. Available from: <http://www.ck12.org/book/CK-12-Biology/>.
217. Wittwer CT, Kuskawa N. Real-time PCR. In: Persing D, Tenover F, Relman D, White T, Tang Y, Versalovic J, Unger B, editors. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington, DC: ASM Press; 2002.
218. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
219. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995 Jun;4(6):363-7.
220. Yu HA, Pao W. Targeted therapies: Afatinib-new therapy option for EGFR-mutant lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Oct;10(10):551-2.
221. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):121-8.
222. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353:123-32.
223. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):947-57.
224. Kobayashi K, Hagiwara K. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Target Oncol*. 2013 Mar;8(1):27-33.
225. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*. 2013 Sep;108(3):370-7.
226. Bell DW, Lynch TJ, Hasserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 1;23(31):8081-92.
227. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A et al. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet*. 2006 Jan;79(1):129-35.
228. Mills NE, Fishman CL, Scholes J, Anderson SE, Rom WN, Jacobson DR. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid as a diagnostic test for lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Jul 19;87(14):1056-60.
229. Rotella V, Fornaro L, Vasile E, Tibaldi C, Boldrini L, Chella A, et al. EGFR and K-Ras mutations in women with lung adenocarcinoma: implications for treatment strategy definition. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014 Oct 11;33:77.
230. Mücke P, Hengstler JG, Ros R, Bittinger F, Metz T, Gebhard S, et al. C-erbB-2 expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*. 2001 Apr;92(4):474-9.
231. Zhou K, Xu D, Cao Y, Wang J, Yang Y, Huang M. C-MYC aberrations as prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One*. 2014 Apr 14;9(4): e95020.
232. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.
233. Duarte RL, Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol*. 2005 Jan-Feb;32(1):56-65.
234. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet*. 1990 Mar 24;335(8691):675-9.
235. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
236. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
237. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan;89(1):55-64.

238. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. Bethesda: National Cancer Institute. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015.
239. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*. 2014 Sep 15;120(18):2883-92.
240. Ren S, Kuang P, Zheng L, Su C, Li J, Li B, et al. Analysis of driver mutations in female non-smoker Asian patients with pulmonary adenocarcinoma. *Cell Biochem Biophys*. 2012 Nov;64(2):155-60.
241. Brega E, Brandao G. Non-small cell lung carcinoma biomarker testing: the pathologist's perspective. *Front Oncol*. 2014 Jul 16;4:182.
242. Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E, Mounawar M, Antoine M, Poulot V, et al. Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small cell lung carcinoma [ERMETIC] project--part 1). *J Thorac Oncol*. 2011 Jun;6(6):1006-15.
243. Stojšić J, Adžić T, Marić D, Subotić D, Milovanović I, Milenković B, et al. Histological types and age distribution of lung cancer operated patients over a 20-year period: a pathohistological based study. *Srp Arh Celok Lek*. 2011 Sep-Oct;139(9-10):619-24.
244. Paliogiannis P, Attene F, Cossu A, Defraia E, Porcu G, Carta A, et al. Impact of tissue type and content of neoplastic cells of samples on the quality of epidermal growth factor receptor mutation analysis among patients with lung adenocarcinoma. *Mol Med Rep*. 2015 Jul;12(1):187-91.
245. Zhu P, Pan Q, Wang M. Efficacy of bronchoscopic biopsy for the detection of epidermal growth factor receptor mutations and anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*. 2015 Nov;6(6):709-14.
246. Hajmanoochehri F, Mohammadi N, Zohal MA, Sodagar A, Ebtehaj M. Epidemiological and clinicopathological characteristics of lung cancer in a teaching hospital in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(6):2495-500.
247. Niu XM, Lu S. Acetylcholine receptor pathway in lung cancer: new twists to an old story. *World J Clin Oncol*. 2014 Oct 10;5(4):667-76.
248. Balaban G, Žikić T, Perin B, Čanak V, Kopitović I, Jovanović S. Operabilnost bolesnika sa centralnim karcinomom bronha i atelektazom. *Pneumon*. 1998;36(1-4):11-4.
249. Wang S, Yu B, Chiu Chin Ng, Mercorella B, Selinger CI, O'Toole SA, et al. The suitability of small biopsy and cytology specimens for EGFR and other mutation testing in non-small cell lung cancer. *Trans Lung Cancer Res*. 2015 April; 4(2):119-25.
250. Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S, Stewart KN, Devereux GS, Nicolson MC, et al. Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol*. 2010 Apr;5(4):448-52.
251. Gellert AR, Rudd RM, Sinha G, Geddes DM. Fiberoptic bronchoscopy: effect of multiple bronchial biopsies on diagnostic yield in bronchial carcinoma. *Thorax*. 1982 Sep;37(9):684-7.
252. Scarpino S, Pulcini F, Di Napoli A, Giubettini M, Ruco L. EGFR mutation testing in pulmonary adenocarcinoma: evaluation of tumor cell number and tumor percent in paraffin sections of 120 small biopsies. *Lung Cancer*. 2015 Jan;87(1):8-13.
253. Rodriguez EF, Monaco SE, Dacic S. Cytologic subtyping of lung adenocarcinoma by using the proposed International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society (IASLC/ATS/ERS) adenocarcinoma classification. *Cancer Cytopathol*. 2013 Nov;121(11):629-37.
254. Subotić D, Mandarić D, Andrić L, Atanasijadić N, Gajić M. Prognostički faktori resektabilnog primarnog nemikrocelularnog karcinoma bronha. *Acta chirurg lugosl*. 2003;50(2):61-70.
255. Eguchi T, Kadota K, Park BJ, Travis WD, Jones DR, Adusumilli PS. The New IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification: what the surgeon should know. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Autumn;26(3):210-22.
256. Mandal SK, Singh TT, Sharma TD, Amrithalingam V. Clinico-pathology of lung cancer in a regional cancer center in Northeastern India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:7277-81.
257. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. 2011 May;24(5):653-64.
258. Sun Y, Yu X, Shi X, Hong W, Zhao J, Shi L. Correlation of survival and EGFR mutation with predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in stage IB patients. *World J Surg Oncol*. 2014 May;12:148.
259. Stenhouse G, Fyfe N, King G, Chapman A, Kerr KM. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004 Apr;57(4):383-7.
260. Warth A, Stenzinger A, Brünneck AC, Goepfert B, Cortis J, Petersen I, et al. Interobserver variability in the application of the novel IASLC/ATS/ERS classification for pulmonary adenocarcinomas. *Eur Respir J*. 2012 Nov;40(5):1221-7.
261. Thunnissen E, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Chiriac LR, Dacic S, et al. Reproducibility of histopathological subtypes and invasion in pulmonary adenocarcinoma. An international interobserver study. *Mod Pathol*. 2012 Dec;25(12):1574-83.
262. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):2972-7.

263. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors *Am J Surg Pathol*. 2010 Aug;34(8):1155-62.
264. Khode R, Larsen DA, Culbreath BC, Parrish S, Walker KL, Sayage-Rabie L, et al. Comparative study of epidermal growth factor receptor mutation analysis on cythology smears and surgical pathology specimens from primary and metastatic lung carcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2013 Jul;121(7):361-9.
265. Yang JC, Wu YL, Chan V, Kurnianda J, Nakagawa K, Saijo NJ, et al. Epidermal growth factor receptor mutation analysis in previously unanalyzed histology samples and cytology samples from the phase III Iressa Pan-Asia Study (IPASS). *Lung Cancer*. 2014 Feb;83(2):174-81.
266. Swati I, Zhang S, Tull J, Khurana KK. Accuracy of cytology specimen and needle core biopsies for detection of mutation in non-small cell carcinoma: comparison with resection specimen. *World J Oncol*. 2011 Jun;2(6):275-80.
267. Allegrini S, Antona J, Mezzapelle R, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, et al. Epidermal growth factor receptor gene analysis with a highly sensitive molecular assay in routine cytologic specimens of lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2012 Sep;138(3):377-81.
268. Kamila WK, Michał S, Paweł K, Paulina J, Tomasz K, Bożena J, et al. EGFR activating mutations detected by different PCR techniques in Caucasian NSCLC patients with CNS metastases: short report. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Dec;30(8):1063-71.
269. Sakurada A, Lara-Guerra H, Liu N, Shepherd FA, Tsao MS. Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2008 May;3(5):527-9.
270. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*. 2015 Aug 15;5(9): 2892-911.
271. Zaric B, Stojsic V, Kovacevic T, Sarcev T, Tepavac A, Jankovic R, et al. Clinical characteristics, tumor, node, metastasis status, and mutation rate in domain of epidermal growth factor receptor gene in serbian patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2014 Sep;9(9):1406-10.
272. Stella GM, Scabini R, Inghilleri S, Cemmi F, Corso S, Pozzi E, et al. EGFR and KRAS mutational profiling in fresh non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Aug;139(8):1327-35.
273. Zhang Y, Sun Y, Pan Y, Li C, Shen L, Li Y, et al. Frequency of driver mutations in lung adenocarcinoma from female never-smokers varies with histologic subtypes and age at diagnosis. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1;18(7):1947-53.
274. Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, Rekhtman N, Lau C, Reva BA, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther*. 2013 Feb;12(2):220-9.
275. Sheffield BS, Bosdet IE, Ali RH, Young SS, McNeil BK, Wong C, et al. Relationship of thyroid transcription factor 1 to EGFR status in non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol*. 2014 Jun;21(6):305-8.
276. Shanzhi W, Yiping H, Ling H, Jianming Z, Qiang L. The Relationship between TTF-1 expression and EGFR mutations in lung adenocarcinomas. *PLoS One*. 2014;9(4):e95479.

9. LISTA SKRAĆENICA

| | |
|------------|--|
| A | |
| AAH | atipična adenomatozna hiperplazija, |
| ACN | acinarni, |
| AD-plate | mikrotitar ploča, |
| AIDS | (od eng.-acquired Immune Deficiency Syndrom), |
| AIS | adenokarcinom in situ, |
| ATS | (od eng.- American Thoracic Society), |
| BB | bronhobiopsija, |
| Bcl-2 | (od eng.-B-cell CLL/lymphoma 2), |
| b-HLHZop | (od eng.-helix-loop-helix leucine zipper), |
| cDNA | komplementarnu DNK, |
| CE-IVD | cobas® EGFR Mutation Test, |
| CHRNA5 | (od eng.-cholinergic receptor nicotinic alpha 5), |
| CHRNA3 | (od eng.- cholinergic receptor nicotinic alpha 3), |
| CISH | (od eng.-chromogenic in situ hybridization), |
| c-MET | C- mezenhimalnoepitelni faktor tranzicije, |
| C-myc | (od eng.-myc-v-myc avian, myelocytomatosis viral oncogene homolog 1), |
| CT | kolekciona tuba, |
| DNA EB | DNK elucioni pufer, |
| DNA PBB | DNK parafin vezujući pufer, |
| DNA SD | DNK diluenta, |
| DNA TLB | DNK pufera za liziranje tkiva, |
| dNTP | (dezoksiribonukleotid-trifosfati), |
| EGF | (od eng.-epidermal growth factor), |
| EGFR | (od eng.- epidermal growth factor receptor), |
| ErbB2/HER2 | Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 |
| ErbB3/HER3 | Human Epidermal Growth Factor Receptor 3 |
| ErbB4/HER4 | Human Epidermal Growth Factor Receptor 4 |
| ERS | (od eng.- European Respiratory Society), |
| FFR | fibroblastični faktor rasta, |
| FISH | fluorescentna in situ hibridizacija, |
| FR | faktor rasta, |
| FT | filter tuba, |
| HBME-1 | (od eng.- Anti-Mesothelioma antibody), |
| HIV | (od eng.-human Immunodeficiency Virus), |
| HNF4A | (od eng.-hepatocyte nuclear factor 4, alpha), |
| HPV | (od eng.- human papillomavirus), |
| HRAS | (od eng.-homologous to the oncogene of the Harvey rat sarcoma virus), |
| IATSL | (od eng.- International Association for the Study of Lung Cancer), |
| IPASS | Iressa Pan-Asia Study, |
| IPBV | Institut za plućne bolesti Vojvodine, |
| KB | kateter biopsija, |
| KRAS | (od eng.-homologous to the oncogene of the Kirsten rat sarcoma virus), |
| LP | lepidični, |
| MAPK | Ras/Raf/mitogen-aktivirajuća protein kinaza, |
| MGAC | zapremina rastvora magnezijuma, |
| MIA | minimalno invazivni adenokarcinom, |
| MMX | radni rastvor Master Miksa, |
| MPP | mikropapilarni, |
| NEJ | North East Japan, |
| NRAS | (od eng.-neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene) |
| NSCLC | (od eng.- non-small cell lung cancer) |
| OS | (od eng.-overall survival), |

| | |
|---------------|---|
| PAP | papilarni, |
| Pby | broj pogodaka na biopsijskom uzorku, |
| PCR | (od eng.-polymerase chain reaction), |
| PFS | (od eng.-progression free-survival). |
| PI3K/Akt/mTOR | fosfatidilinozitol- 3-kinaza, |
| PK | pikrinska kiselina, |
| PNS | Paraneoplastični sindrom, |
| Pnt | broj pogodaka na netumorskom tkivu, |
| Pt | broj pogodaka na tumorskom tkivu, |
| PVNT | procentualna vrednost volumenske gustine netumorskog tkiva, |
| PVT | procentualna vrednost volumenske gustine tumorskog tkiva, |
| Rb | (od eng.-retinoblastoma tumor supresor gen), |
| RT- PCR | (od eng.-Reverse transcription -PCR), |
| SOL | solidni, |
| STAT | (od eng.-Spread Through Air Spaces), |
| SV40 | (od eng.-Simian virus 40), |
| SZO | Svetska zdravstvena organizacija, |
| TAT | (od eng.-turnaround time), |
| TBB | transbronhijalna biopsija, |
| TĆ | tumorske ćelije, |
| TGF- α | transformišući faktor rasta- α , |
| TK1 | timidin kinaza 1, |
| TKIs | Tirozin kinaza inhibitori, |
| TNM | (od eng.-tumour lymph nodes metastasis), |
| TTF-1 | (od eng.-thyroid transcription factor-1), |
| VATS | videoasistirana torakoskopija, |
| Vby | volumenska gustina celokupnog biopsijskog uzorka, |
| VEGF | vaskularni endotelni faktor rasta, |
| VMS | videoasistirana medijastinoskopija, |
| VVG | (od eng.-Verhoff Van Gieson), |
| WT | (od eng.- wild type), |
| WB I | radni rastvor pufera I, |
| WBII | radni rastvor pufera II, |
| WJTOG | West Japan Thoracic Oncology Group, |