



Središnja medicinska knjižnica

Vrabec Branica, Božica (2010) *Primjena lužnate lize u izolaciji DNA kao novi pristup analizi genskih biljega bronhalne sluznice iz rutinskih citoloških uzoraka dobivenih tijekom bronhoskopije.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/858>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Božica Vrabec Branica

**Primjena lužnate lize u izolaciji DNA kao novi pristup
analizi genskih biljega bronhalne sluznice iz rutinskih
citoloških uzoraka dobivenih tijekom bronhoskopije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“ i u Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Srećko Gajović

Zahvaljujem svom mentoru prof.dr Srećku Gajoviću za svu pomoć, podršku i savjete u izradi ovog rada.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima Citološkog laboratorija i Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“ koji su mi pomogli te djelatnicima Laboratorija za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio moguć.

SADRŽAJ

1. <u>UVOD</u>	1
1.1. KARCINOM PLUĆA	1
1.1.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA	1
1.1.2. HISTOLOŠKA I KLINIČKA PODJELA KARCINOMA PLUĆA	2
1.1.2.1. HISTOLOŠKA PODJELA KARCINOMA PLUĆA	2
1.1.2.1.1. Karcinom žlijezdanih stanica	4
1.1.2.1.2. Karcinom pločastih stanica	4
1.1.2.1.3. Karcinom malih stanica	5
1.1.2.1.4. Karcinom velikih stanica	6
1.1.2.2. KLINIČKA PODJELA KARCINOMA PLUĆA	6
1.1.3. TNM KLASIFIKACIJA	7
1.1.4. PATOGENEZA KARCINOMA PLUĆA	9
1.1.5. KLINIČKE MANIFESTACIJE KARCINOMA PLUĆA	11
1.1.6. DIJAGNOSTIKA KARCINOMA PLUĆA	12
1.1.6.1. RADIOLOŠKE METODE U DIJAGNOSTICI I PROGNOZI PROŠIRENOSTI KARCINOMA PLUĆA	13
1.1.6.1.1. Rendgenska snimka srca i pluća	13
1.1.6.1.2. Kompjuterizirana tomografija (CT)	13
1.1.6.1.3. Transkutani ultrazvuk (TUS)	14
1.1.6.1.4. Endoskopski ultrazvuk (EUS)	14
1.1.6.1.5. Magnetska rezonancija (MR)	14
1.1.6.1.6. Pozitronska emisijska tomografija sa 18-fluor deoksiglukozom (FDG-PET)	15
1.1.6.1.7. Integrirani PET-CT	15
1.1.6.2. MORFOLOŠKE METODE U DIJAGNOSTICI I PROCJENI PROŠIRENOSTI KARCINOMA PLUĆA	15
1.1.6.2.1. Patohistološki uzorci u dijagnosticiranju karcinoma pluća	16

1.1.6.2.2.	Citološki uzorci u dijagnosticiranju karcinoma pluća	16
1.1.6.2.2.1.	Sputum	17
1.1.6.2.2.2.	Aspirat bronha	18
1.1.6.2.2.3.	Uzorak brisa bronha četkicom	18
1.1.6.2.2.4.	Otisak biopsije sluznice bronha ili tumora	19
1.1.6.2.2.5.	Transbronhalna (TBP) i transtrahealna (TTP) aspiracijska punkcija karine traheje	19
1.1.6.2.2.6.	Bronhoalveolarna lavaža (BAL)	20
1.1.6.2.2.7.	Transbronhalna biopsija pluća (TBBP)	21
1.1.6.2.2.8.	Transtorakalna aspiracijska punkcija	21
1.1.6.2.2.9.	Intraoperativna citološka pretraga	21
1.1.6.2.3.	Imunocitokemija/imunohistokemija	22
1.1.6.2.4.	Kompjuterski asistirana image analiza	22
1.1.6.3.	MOLEKULARNE TEHNIKE U DIJAGNOSTICI KARCINOMA PLUĆA	23
1.1.6.3.1.	DNA/RNA molekularne tehnike	23
1.1.6.3.1.1.	FISH	23
1.1.6.3.1.2.	PCR	24
1.1.6.3.2.	Dosadašnje spoznaje o izolaciji DNA i prepoznavanju molekularnih biljega u dijagnostici karcinoma pluća	26
1.1.6.3.3.	Molekularni biljezi važni za dijagnozu karcinoma pluća	28
1.1.6.3.3.1.	Biomarkeri karcinoma pluća koji se trenutačno koriste	28
1.1.6.3.3.2.	Potencijalni biomarkeri karcinoma pluća	31
1.1.6.3.3.2.1.	Tumor supresorski geni	31
1.1.6.3.3.2.2.	Protoonkogeni i stimulatori rasta	32
1.1.6.3.3.2.3.	Kromosomske abnormalnosti – aneuploidije i delecije	33
1.1.6.3.3.2.4.	Gubitak heterozigotnosti (LOH)	33
1.1.6.3.3.2.5.	Hipermetilacija gena	34

1.1.6.3.3.2.6.	Apoptoza i angiogeneza	35
1.1.6.3.3.2.7.	Aktivacija telomeraza	35
1.1.6.3.3.2.8.	Cirkulirajuća DNA	36
1.1.6.3.3.2.9.	Ekspresija gena i proteini	36
1.1.6.3.3.2.10.	Proteomika i genomika	37
1.1.6.3.3.2.11.	Autoimunost	38
1.1.6.3.3.2.12.	Drugi molekularni markeri	39
2.	<u>HIPOTEZA I CILJEVI RADA</u>	40
3.	<u>MATERIJAL I METODE</u>	42
3.1.	Ispitanici i uzorci stanica	42
3.2.	Izolacija DNA	43
3.3.	Određivanje genetskog spola PCR metodom	44
3.4.	Detekcija i tipizacija DNA HPV-a	45
3.5.	Statistička analiza	45
4.	<u>REZULTATI</u>	47
4.1.	Rezultati uspostavljanja postupka izolacije DNA iz tri izvora i provjera kvalitete izolirane DNA određivanjem spola ispitanika	47
4.2.	Rezultati uspostave metode dokazivanja tri tipa humanog papiloma virusa PCR metodom u datim uzorcima	52
4.3.	Rezultati citomorfološke analize bronhoskopskih uzoraka aspirata bronha i usporedbe citomorfološke dijagnoze s nalazom humanog papiloma virusa	53
5.	<u>RASPRAVA</u>	56
6.	<u>ZAKLJUČAK</u>	64
7.	<u>SAŽETAK</u>	65
8.	<u>ABSTRACT</u>	66
9.	<u>LITERATURA</u>	67
10.	<u>ŽIVOTOPIS</u>	84

1. UVOD

1.1. KARCINOM PLUĆA

1.1.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Rak pluća je po pojavnosti i smrtnosti jedan od najčešćih malignih tumora u ljudi s 1,2 milijuna novo oboljelih (na 1. mjestu u muškaraca i na 2. mjestu u žena u svijetu) i 1,1 milijuna umrlih godišnje¹. Najčešći je uzrok smrti od karcinoma u razvijenim zemljama. Prognoza mu je loša, manje od 15% pacijenata preživi duže od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze². Brz porast incidencije počinje u dvadesetim godinama dvadesetog stoljeća što se objašnjava stvarnim porastom oboljelih ali i relativnim porastom zbog povećane osjetljivosti i specifičnosti dijagnostičkih testova, pojačane zainteresiranosti za tu lokalizaciju karcinoma, starenju populacije i nastankom registara. Prema najnovijim podacima u Hrvatskoj karcinom traheje, bronha i pluća najčešći je karcinom u muškaraca i čini 21% svih karcinoma sa stopom incidencije od 2336 na 100000 stanovnika u 2005. godini. U žena je na trećem mjestu i čini 7% svih karcinoma sa stopom incidencije od 660 na 100000 stanovnika 2005. godine. Stopa mortaliteta od karcinoma pluća u Hrvatskoj u 2005. godini bila je 2086 za muškarce i 554 za žene³. Pušenje se smatra najvažnijim uzročnikom karcinoma pluća⁴. Oko 90% karcinoma pluća u muškaraca i 78% karcinoma pluća u žena može se povezati s dugogodišnjim pušenjem¹. Prvi je put karcinom pluća povezan s pušenjem još 1940. godine. Tek 1964. godine epidemiološka studija je dokazala ovu povezanost⁵, što su kasnije potvrdile i druge epidemiološke studije⁶. Rizik od karcinoma pluća među pušačima raste duljinom pušenja i brojem dnevno popušanih cigareta. Većina pušača ne razvije karcinom pluća, dok 10-15% nepušača oboli od tog karcinoma⁴, stoga se razmišlja i o nekim drugim čimbenicima kao što su izloženost dimu cigarete, različiti profesionalni

karcinogeni, već postojeće nemaligne bolesti pluća⁷. Različite studije sugeriraju da i virusi, kao što su HPV (humani papiloma virus), EBV (Epstein-Barrov virus) i u manjoj mjeri SV 40 (simian virus), mogu biti uključeni u nastanak karcinoma pluća. Sýrjanen 2002. godine objavljuje rad, objedinjujući veći broj studija o prisutnosti HPV-a u stanicama karcinoma pluća s velikom geografskom različitosti i nesrazmjernom u rezultatima tvrdeći da se mogućnost o latentnoj HPV infekciji, kao udruženom karcinogenu, ne može isključiti⁷.

Najnovija studija koja objedinjuje rezultate incidencije HPV-a u stanicama karcinoma pluća iz cijelog svijeta na 4508 slučajeva sugerira da bi HPV mogao biti drugi važan čimbenik u razvoju karcinoma pluća nakon pušenja cigareta⁸.

1.1.2. HISTOLOŠKA I KLINIČKA PODJELA KARCINOMA PLUĆA

1.1.2.1. HISTOLOŠKA PODJELA KARCINOMA PLUĆA

Karcinomi pluća su heterogena skupina tumora epitelnog porijekla koji nastaju iz epitelnih stanica bronha, bronhiola i alveola. Najčešće korištene su histološka i klinička podjela karcinoma pluća. Histološka podjela Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organisation, WHO) danas je široko prihvaćena u svijetu⁹ i prema njezinom revidiranom obliku iz 2003. godine maligni tumori pluća epitelnog porijekla prikazani su u tablici 1.

Najčešća četiri histološka tipa karcinoma pluća, koji čine 96% svih primarnih neoplazmi pluća, su karcinom žlijezdanih stanica, pločastih stanica, malih stanica i velikih stanica. Ostalih 5% čine karcinoid, karcinom bronhalnih žlijezda i ostali rjeđi tipovi karcinoma.

1.1.2.1.1. Karcinom žlijezdanih stanica ili adenokarcinom

Karcinom žlijezdanih stanica je najčešći histološki tip karcinoma pluća (35% karcinoma pluća)¹⁰, incidencija mu je u stalnom porastu, posebno u žena, u usporedbi s karcinomom pločastih stanica koji je prije bio najčešći plućni karcinom. Češće se, od drugih tipova karcinoma, razvija u nepušača, posebno u žena⁹. Najčešće se prezentira kao periferni plućni čvor promjera manjeg od 4 cm. Rijetko je smješten centralno kao hilarna ili perihilarna masa, a zahvaća pleuru i torakalni zid u oko 15% slučajeva, što je češće nego u drugih histoloških tipova karcinoma⁹. Raste brzo, rano metastazira i kasno daje simptome pa ima lošu prognozu. Histološki karcinom žlijezdanih stanica formira žlijezde i proizvodi sluz. U ovu skupinu spada i bronhoalveolarni karcinom kao poseban kliničkopatološki entitet koji nastaje iz pneumocita tipa II i može se manifestirati kao solitarni periferni čvor, multifokalna bolest ili kao infiltrati koji imitiraju pneumoniju i brzo se šire od jednog do drugog reznja.

Citološka dijagnoza bazira se na osnovi kombinacije morfologije stanica i arhitekture staničnih nakupina. Citoplazma stanica adenokarcinoma je obično obilna, jezgre su ekscentrično položene, okrugle ili ovalne sa mekanim konturama i minimalnim nepravilnostima. Kromatin im je fino granuliran i jednolično raspoređen u dobro diferenciranim karcinomima⁹.

1.1.2.1.2. Karcinom pločastih stanica

Karcinom pločastih stanica čini 30% svih karcinoma pluća i najviše je povezan s pušenjem cigareta. Preko 90% ovog karcinoma razvije se u pušača. Obično nastaje

u proksimalnim dišnim putevima, te dovodi do bronhalne opstrukcije, opstruktivne pneumonije ili hemoptize. Pokazuje dva osnovna tipa rasta: intraepitelni sa ili bez subepitelne invazije ili endobronhalni polipoidni rast. Razvija se kroz nekoliko stadija od hiperplazije bazalnih stanica, pločaste metaplazije, atipične pločaste metaplazije, karcinoma in situ, do invazivnog karcinoma. Dobro diferencirani karcinom pločastih stanica sadrži keratin, a stanice su raspoređene u skupine s prisutnim međustaničnim mostićima.

Citološki izgled stanica ovisi o stupnju diferenciranosti tumora i vrsti uzorka. U slabije diferenciranim karcinomima obično su prisutne pojedinačne izolirane stanice, moguće bizarnog izgleda, nepravilne hiperkromatske jezgre, sa jednim ili više nukleola i obilnom citoplazmom te nekrozom i staničnim detritusom u pozadini. Dobro diferencirani karcinomi prezentiraju se keratiniziranim stanicama tamne piknotične jezgre u eksfolijativnim uzorcima, dok se u brisevima bronha četkicom manifestiraju kohezivnim nakupinama dubljih slojeva stanica⁹.

1.1.2.1.3. Karcinom malih stanica

Karcinom malih stanica je karcinom neuroendokrinog porijekla, nastao iz Kulchitskyevskih stanica. Nađe se u oko 25% svih karcinoma pluća, a oboljeli su većinom pušači. Uglavnom je smješten centralno, sa širenjem u okolno tkivo, perihilarno te infiltracijom submukoze bronha i okolnog tkiva dovodi do ektramuralne kompresije bronha s posljedičnom atelektazom. Često ga prati opsežna limfadenopatija i velika sklonost ranom metastaziranju te razvijanje paraneoplastičnog sindroma. Klinički simptomi često su odraz diseminacije bolesti. Stanice ovog karcinoma su vrlo fragilne, te se u aspiratima bronha i brisu bronha četkicom često vide kao loše očuvani ostaci kromatina jezgre. Čine kohezivne nakupine s fenomenom utiskivanja jezgara. Svaka stanica pokazuje visok omjer jezgre i citoplazme, te fino granuliran i jednolično raspoređen kromatin bez vidljivih nukleola⁹.

1.1.2.1.4. Karcinom velikih stanica

Karcinom veliki stanica je četvrti po učestalosti (10% svih karcinoma pluća), a oboljeli su većinom pušači. Obično raste kao veliki periferni nekrotični tumor. Sastoji se od velikih stanica istaknutih nukleola, bez proizvodnje sluzi ili međustaničnih mostića. Mnogi tumori, koji bi nekada bili dijagnosticirani kao karcinomi velikih stanica, danas su prepoznati kao slabo diferencirani karcinomi žlijezdanih stanica ili karcinomi pločastih stanica nakon primjene imunohistokemijskih bojanja, elektronskog mikroskopa i monoklonalnih protutijela¹¹. Ustanovljena je varijanta karcinoma velikih stanica s karakteristikama neuroendokrinih tumora, a povezana je s lošom prognozom. Čini 3% svih karcinoma pluća.

1.1.2.2. KLINIČKA PODJELA KARCINOMA PLUĆA

Osim histološke podjele karcinoma pluća u svakodnevnom kliničkom radu više se koristi klinička podjela karcinoma pluća. U određivanju i planiranju liječenja, a zbog kliničko-bioloških karakteristika, karcinom pločastih stanica, karcinom žlijezdanih stanica i karcinom velikih stanica razmatraju se kao jedna skupina tumora – skupina ne-malih stanica (engl. non-small cell lung carcinoma, NSCLC)¹²⁻¹⁸. Karcinom malih stanica pluća (engl. small cell lung carcinoma, SCLC) je, što se tiče brzine umnožavanja i metastaziranja, biološki agresivniji i bolje reagira na kemoterapiju u usporedbi s karcinomima ne-malih stanica, pa se smatra drugom skupinom raka pluća. U vrijeme otkrivanja taj karcinom je većinom već razvio diseminirane metastaze i liječi se kemoterapijom i zračenjem¹⁹. Bolesnici s karcinomom ne-malih stanica liječe se kirurški ukoliko je bolest u ranijim stadijima ili kemoterapijom i zračenjem u uznapredovalim stadijima^{20,21}. Osim karcinoma malih i ne-malih stanica u kliničkoj podjeli karcinoma pluća, treću skupinu čine ostali karcinomi u koju spadaju karcinoid, adenoid-cistični karcinom i mukoepidermoidni karcinom.

1.1.3. TNM KLASIFIKACIJA

U opisu anatomske proširenosti bolesti kod karcinoma pluća koristi se TNM klasifikacija i svrstavanje u stadije²². Cjeloviti naziv TNM sustava je Međunarodni sustav za određivanje proširenosti raka pluća (engl. The International Staging System for Lung Cancer, ISSLC) Sadašnje 7. izdanje TNM klasifikacije potiče iz 2009. godine. i prema novodonešenim kriterijima može se koristiti ne samo za karcinome ne-malih stanica pluća već i za karcinome malih stanica pluća i bronhopulmonarne karcinoid tumore²³. Podijeljena je u 4 stadija bolesti s dodatnom podjelom stadija I-III u A i B subtipove što je prikazano u tablici 5. Ti stadiji imaju važne terapijske i prognostičke implikacije.

Tablica 2. TUMOR (T)

T – tumor	
Tumor ≤ 2 cm	T1a
Tumor > 2 cm i ≤ 3 cm	T1b
Tumor > 3 cm i ≤ 5 cm	T2a
Tumor > 5 cm i ≤ 7 cm	T2b
Tumor > 7 cm	T3
Dodatni čvorovi u istom režnju	T3
Dodatni čvorovi u drugom ipsilateralnom režnju	T4
Maligni perikadijalni izljev	M1a
Zahvaćenost pleure	M1a

Tablica 3. ZAHVAĆENOST REGIONALNIH LIMFNIH ČVOROVA (N)

No – limfni čvorovi nisu zahvaćeni
N1 – zahvaćeni ipsilateralni bronhopulmonarni limfni čvorovi ili hilarni čvorovi
N2 – zahvaćeni ipsilateralni medijastinalni ili subkarinarni limfni čvorovi
N3 – zahvaćeni medijastinalni, hilarni, bilo koji supraklavikularni čvorovi

Tablica 4. METASTAZE (M)

Nedokazane metastaze	M0
Maligni perikardijalni izljev	M1a
Zahvaćenost pleure (maligni pleuralni izljev ili pleuralni čorovi)	M1a
Odvojeni čvorovi u kontralateralnom pluću (iste histologije)	M1a
Udaljene metastaze	M1b

Tablica 5. T/M grupiranje stadija

T/M		N0	N1	N2	N3
T1 (≤2cm)	T1a	I A	II A	III A	III B
T1 (>2cm i ≤3cm)	T1b	I A	II A	III A	III B
T2 (>3cm i ≤5cm)	T2a	I B	II A	III A	III B
T2 (>5cm i ≤7cm)	T2b	II A	II B	III A	III B
T2 (>7cm)	T3	II B	III A	III A	III B
T3 (direktna invazija)		II B	III A	III A	III B
T4 (čvorovi istog režnja)		II B	III A	III A	III B
T4 (proširenost u istom režnju)	T4	III	III A	III B	III B
M1 (ipsilateralni čvorovi)		III	III A	III B	III B
T4 (pleuralni izljev)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (kontralateralni čvorovi)		IV	IV	IV	IV
M1 (udaljene metastaze)	M1b	IV	IV	IV	IV

1.1.4. PATOGENEZA KARCINOMA PLUĆA

Razumijevanje karcinogeneze karcinoma pluća i razvoj novih tehnologija u otkrivanju biomarkera tog karcinoma ostvarilo je značajan napredak. Posebno unazad nekoliko godina brojna istraživanja se bave ranim otkrivanjem i prognozom bolesti. Molekularne promjene koje stoje u pozadini preneoplazija i invazivnih karcinoma usmjerile su istraživanja na biomarkere za ranu detekciju karcinoma i mogućnost personalizacije tretmana bolesnika koji bi se osnivao na profilu biomarkera. Promjene u ekspresiji gena i kromosomskoj strukturi pokazane u takvim preneoplastičnim lezijama i njihova učestalost i broj rastu s atipijom stanica. Neke od promjena nađenih u preneoplazijama uključuju hiperproliferaciju i gubitak kontrole staničnog ciklusa, promjene u p53 genu, promjene ras gena i gena u regiji 3p14.2, promjene u metilaciji promotora ovih gena, pojačani vaskularni rast, te promjene u međustaničnoj tvari^{24,25}.

Preneoplastične lezije karcinoma pločastih stanica poznate su godinama, reverzibilne su, preinvazivne i mogu se vidjeti u pozadini invazivnih karcinoma pločastih stanica velikih dišnih puteva. Morfologija je zlatni standard u ocjeni premalignih promjena na stanicama pločastog epitela pri čemu ne postoje dodatne dijagnostičke procedure koje bi mogle pomoći u dijagnozi istih. Histološki kriteriji koji se koriste u dijagnozi premalignih promjena su debljina epitela, veličina stanica, sazrijevanje stanica i njihova orijentacija te karakteristike jezgre. Osnovni kriterij je sačuvana bazalna membrana, koja je obično različite debljine.

Preneoplastične promjene karcinoma pločastih stanica uključuje slijedeće morfološke promjene: hiperplaziju vrčastih stanica, hiperplaziju bazalnih stanica, nezrelu pločastu metaplaziju, pločastu metaplaziju, blagu, srednju i izraženu displaziju pločastih stanica, karcinom in situ. Dosadašnja istraživanja pokazala su da oko 25% displastičnih promjena progredira u invazivni karcinom u periodu od 36 mjeseci, a više od 50% pacijanata s karcinomom in situ razvije invazivni karcinom u 30 mjeseci^{26,27}. U toku proteklih 10-ak godina pokušano je morfološke premaligne lezije karcinoma pločastih stanica okarakterizirati na molekularnom nivou. Najranije

promjene, koje su primjećene, su gubitak heterozigotnosti na nekoliko mjesta u 3p kromosomu, nakon čega slijedi gubitak heterozigotnosti na kromosomu 9p21²⁶⁻²⁸. Promjene na kromosomima 8p21-23, 13q14 i 17p13 ubrajaju se u kasne promjene. Nekoliko studija navodi ekspresiju p53 proteina u preinvazivnim bronhalnim lezijama, ali ne i u normalnim stanicama bronhalne sluznice²⁹⁻³⁰. Iako prisustvo ekspresije ukazuje na promjenu gena, važnije je ustanoviti mutaciju gena^{31,32}. Promjena gena p53 i gubitak heterozigotnosti moguće je vidjeti i u histološki normalnim stanicama bronhalne sluznice pušača i ne mora značiti povećani rizik od nastanka invazivnog karcinoma, već prije pokazuje genetska oštećenja izazvana pušenjem. Slična iskustva vezana su i za metilaciju p16(INK4A)/ARF lokusa gena na kromosomu 9p21. Primjećena je veća učestalost metilacije p16(INK4A) u toku progresije od hiperplazije bazalnih stanica (7%), pločaste metaplazije (24%) do karcinoma in situ i invazivnog karcinoma (50-75%)^{33,34}. Važno je reći da se promjena metilacije može vidjeti i u dugogodišnjih pušača bez karcinoma.

Atipična adenomatoidna hiperplazija (AAH) prethodi razvoju adenokarcinoma. Definirana je kao lokalizirana proliferacija stanica, s blagom do srednjom atipijom, koje oblažu alveole, ponekad i respiratorne bronhirole, tvoreći fokalne lezije na periferiji pluća, obično promjera manjeg od 5 mm. Incidencija AAH-e je između 9 i 21% u pacijenata s primarnim plućnim karcinomom i između 4 i 10% u pacijenata bez karcinoma³⁵. Na mikrodiseciranim patohistološkim uzorcima AAH-e, metodom lančane reakcije polimeraze, rađene su studije na molekularnom nivou. K-ras mutacije ustanovljene su u 24-50% plućnih adenokarcinoma. Mutacije na kodonu 12 gena K-ras nađene su u 24-50% plućnih adenokarcinoma i u 15-39% AAH-a i smatra se da predstavljaju rani događaj koji prethodi malignom rastu³⁶. Nedavne studije sugeriraju da se AAH može razviti putem mutacije K-ras gena ili gena za receptor epidermalnog faktora rasta, ali da AAH s mutacijom K-ras gena možda ne progredira dalje u invazivni karcinom³⁷. U AAH-i ustanovljena je ključna genetička promjena, često prisutna u plućnom adenokarcinomu, koja uključuje gubitak heterozigotnosti na kromosomu 3p (FHIT gen) i kromosomu 9p (p16 gen)³⁸. Gubitak heterozigotnosti na tim kromosomima identificiran je u 18% (za FHIT gen)

i 13% (za p16 gen) AAH-a. U AAH-i gubitak heterozigotnosti i mutacija gena p53 je rijetka, u usporedbi s adenokarcinomom, dok je ekspresija p53 proteina česta. Ipak tokom progresije, od AAH-e do invazivnog adenokarcinoma, primjećena je česta mutacija gena p53^{39,40}.

Za karcinome malih stanica preneoplastična lezija nije poznata. Difuzna idiopatska plućna neuroendokrina hiperplazija prethodi karcinoidu. Ukoliko se ta hiperplazija nalazi dalje od bazalne membrane i mjeri manje od 5 mm, naziva se karcinoid tumorlet i smatra se reaktivnom promjenom. Trenutačno ne postoje genetski markeri koji bi mogli razlikovati neoplastične od neneoplastičnih proliferacija. Genetsko i histogenetsko znanje o tim je lezijama minimalno⁴¹.

Postoje neka saznanja o razlici u karcinogenom efektu pušenja cigareta između muškaraca i žena. Podaci pokazuju da žene razviju češće karcinom žlijezdanih stanica, ali žive duže. Razlog može biti u mehanizmu popravka DNA. Razlike između spolova manifestiraju se i u odgovoru na biološke lijekove (kao što su inhibitori tirozin kinaze epidermalnog faktora rasta) i antiangiogenske lijekove. Karcinomi u nepušača genetski se razlikuju od karcinoma ne-malih stanica povezanih s pušenjem, što također može imati utjecaj na izbor tretmana bolesti. Genetske razlike, kao što je rjeđa pojava mutacija K-ras gena i češća pojava mutacija gena za receptore epidermalnog faktora rasta, vjerojatno su uzrokom bolje efikasnosti lijekova inhibitora receptora epidermalnog faktora rasta u te populacije pacijenata⁴².

1.1.5. KLINIČKE MANIFESTACIJE KARCINOMA PLUĆA

Karcinom pluća manifestira se simptomima uzrokovanim primarnim tumorom, njegovim lokalnim širenjem, metastatskom bolesti ili ektopičkim stvaranjem hormona. 7-10% pacijenata s karcinomom pluća su bez simptoma i njihova bolest se otkriva slučajno, nakon nalaza rendgena pluća učinjenog iz drugog razloga. Mogu se javiti nespecifični simptomi kao što su umor, anoreksija, gubitak na težini, slabost i povišena temperatura. Obično su prisutni kod već uznapredovale bolesti i nisu

specifični za karcinom pluća. Simptomi primarnog tumora ovise o njegovoj lokaciji u plućima (centralni ili periferni). Centralno smješteni tumori daju simptome kao što su kašalj, dispneja, atelektaze, postopstrukcijske pneumonije, hemoptize i sl. Većina perifernih tumora su karcinomi žlijezdanih stanica ili karcinomi velikih stanica i uz kašalj i dispneju mogu uzrokovati simptome vezane za pleuralni izljev i jače bolove kao rezultat infiltracije parijetalne pleure i torakalnog zida. Zbog periferne smještenosti, karcinomi žlijezdanih stanica mogu biti bez simptoma dok ne uzrokuju ekstratorakalne metastaze, npr. kliničke simptome širenja u kosti ili intrakranijalu metastatsku bolest. Simptomi vezani za lokalno širenje tumora uključuju simptome vezane uz opstrukciju gornje šuplje vene, paralizu nervusa rekurensa i frenikusa praćenu paralizom dijafragme, pritisak na plexus simpatikus i disfagiju kao rezultat pritiska na jednjak, te pleuralni i perikardijalni izljev. Karcinomi metastaziraju hematogeno i limfogeno i mogu zahvatiti bilo koji organ ili organski sustav. Najčešće su to jetra, nadbubrežne žlijezde, kosti, mozak, udaljeni limfni čvorovi i koštana srž. Paraneoplastični sindromi većinom su prisutni kod karcinoma malih stanica, iako mogu biti prisutni i kod karcinoma ne-malih stanica. Karcinom pločastih stanica često je praćen hiperkalcemijom vezanom za proizvodnju hormona nalik paratiroidnom hormonu. Karcinom žlijezdanih stanica često uzrokuje hipertrofičnu plućnu osteoartropatiju i Trousseauov sindrom kao posljedicu hiperkoagulabilnosti. Sindrom neprimjerene proizvodnje antidiuretskog hormona je češće prisutan u pacijenata s karcinomom malih stanica, ali može biti prisutan i u pacijenata s karcinomom ne-malih stanica. Cushingov sindrom može biti jedan od simptoma karcinoma pluća zbog ektopične proizvodnje adrenokortikotropnog hormona¹¹.

1.1.6. DIJAGNOSTIKA KARCINOMA PLUĆA

Dijagnostika karcinoma pluća koristi brojne neinvazivne i invazivne metode u cilju postavljanja dijagnoze i procjene proširenosti bolesti. Dijagnostički postupci podrazumijevaju uzimanje anamneze, fizikalni pregled, laboratorijsku obradu,

određivanje tumorskih markera, citološku analizu iskašljaja, bronhoskopiju, analizu citopatoloških uzoraka uzetih citološkom punkcijom, zatvorenom ili otvorenom biopsijom. Dijagnostički postupci za procjenu proširenosti bolesti su rendgen srca i pluća, CT toraksa i abdomena, te mozga (u pacijenata s karcinomom žlijezdanih stanica i karcinomom malih stanica, te onih s prisutnim neurološkim simptomima), UZV abdomena, scintigrafija kosti, rendgenske snimke skeleta kod prisutnih simptoma ili patološkog scintigrafskog nalaza, citološka punkcija pleuralnih izljeva, punkcije ili biopsije uvećanih limfnih čvorova, MRI, PET, medijastinoskopija, punkcija ili biopsija koštane srži.

1.1.6.1. RADIOLOŠKE METODE U DIJAGNOSTICI I PROGNOZI PROŠIRENOSTI KARCINOMA PLUĆA

1.1.6.1.1. Rendgenska snimka srca i pluća

Rendgenska snimka srca i pluća predstavlja početak dijagnostičke obrade bolesti pluća. Nakon što se otkrije nodus na rendgenskoj snimci, potrebno je usporediti taj nalaz s ranijim rendgenskim snimkama radi procjene dinamike tvorbe. Ukoliko je nodus stacioniran unatrag dvije godine i više, smatra se da je najvjerojatnije riječ o nemalignoj leziji. Ako je nodus nastao unatrag dva mjeseca velika je vjerojatnost da se radi o malignom nodusu.

1.1.6.1.2. Kompjuterizirana tomografija (CT)

Kompjuterizirana tomografija (CT) je „zlatni standard“ u radiološkoj procjeni proširenosti karcinoma pluća zbog mogućnosti prikaza morfoloških karakteristika tumora i procjene njegovog stadija⁴³⁻⁵⁰. Ona je metoda izbora i u rutinskom praćenju bolesnika u postoperativnom razdoblju za procjenu uspjeha terapije ili detekcije recidiva tumora⁵¹. U usporedbi s rendgenskom snimkom srca i pluća, CT pruža više informacija o lokalizaciji tumora, njegovoj veličini i izgledu, lokalnoj i udaljenoj

proširenosti⁵². Spiralni CT omogućuje skeniranje cijele regije u jednom zadržanom dahu uz manju dozu zračenja. Multidektorski CT (MDCT) omogućuje još brže skeniranje uz manju dozu zračenja.

1.1.6.1.3. Transkutani ultrazvuk (TUS)

Ultrazvukom je moguće detektirati udaljene metastaze organa abdomena i periferne tumora uz torakalnu stijenu te procijeniti infiltraciju torakalne stijenke ili pleure tumorom. Pod kontrolom UZV-a obavlja se perkutana transtorakalna punkcija za citološku analizu, te dijagnostička i terapijska punkcija pleuralnog izljeva⁵³⁻⁵⁸.

1.1.6.1.4. Endoskopski ultrazvuk (EUS)

Endoskopski ultrazvuk (čija se sonda uvodi u jednjak) omogućuje prikaz limfnih čvorova medijastinuma i citološku punkciju istih, jer ovom metodom nije moguće razlikovati benigne od malignih limfnih čvorova.

1.1.6.1.5. Magnetska rezonancija (MR)

Magnetska rezonanca smatra se komplementarnom metodom CT-u. Njegova je prednost mogućnost multiplanarnog prikaza i velike razlučivosti u intenzitetu tkiva tumora od okolnih mekotičnih struktura. Prednost je i u odsutnosti ionizirajućeg zračenja⁵⁹. MR je superiorniji od CT-a u prikazu medijastinalne masti i procjeni tumorske infiltracije medijastinuma. Ovom metodom kao i CT-om nemoguće je diferencirati benigne od malignih limfnih čvorova.

1.1.6.1.6. Pozitronska emisijska tomografija sa 18-fluor deoksi-glukozom (FDG-PET)

Ova dijagnostička pretraga bazira se na pojavi da tumorske stanice pokazuju veću metaboličku aktivnost. Tako stanice karcinoma pluća pojačano nakupljaju radioaktivno ozračenu glukozu u odnosu na zdravo tkivo. Ta se akumulacija radioaktivnog izotopa snima gama kamerom, a intenzitet nakupljanja korelira s agresivnošću tumora. Nedostatak metode su lažno pozitivni rezultati kod upalnih i granulomskih procesa, a lažno negativni kod hiperglikemije i biološki slabo aktivnih tumora (npr. bronhoalveolarnog karcinoma i karcinoida) te kod lezija manjih od 1 cm. Prednost pred CT-om i MR-om je mogućnost detektiranja metastatski promijenjenih limfnih čvorova pa se zato preporučuje kao rutinska pretraga u određivanju proširenosti karcinoma unutar medijastinuma⁶⁰⁻⁶⁷.

1.1.6.1.7. Integrirani PET-CT

U ovoj dijagnostičkoj metodi pozitronska emisijska tomografija (FDG-PET) i kompjuterizirana tomografija (CT) su integrirani, što omogućuje superponiranje područja povećane metaboličke aktivnosti direktno na pripadajuće anatomske strukture detaljno prikazane CT-om. Ova metoda ima veću senzitivnost i specifičnost od FDG-PET-a^{68,69}.

1.1.6.2. MORFOLOŠKE METODE U DIJAGNOSTICI I PROCJENI PROŠIRENOSTI KARCINOMA PLUĆA

Svakodnevno laboratorijska dijagnostika karcinoma postaje sve složenija, tehnički zahtjevnija i specijaliziranija. Uz sve modernije i moćnije slikovne (radiološke) metode i sve bolje bronhoskopske tehnike, osnovna dijagnoza karcinoma i dalje mora biti morfološka, citološka ili patohistološka. Za optimalnu

citološku/patohistološku dijagnozu potrebni su klinički podaci o pacijentu i adekvatni, reprezentativni i tehnički dobro procesuirani uzorci.

1.1.6.2.1. Patohistološki uzorci u dijagnosticiranju karcinoma pluća

Najčešći patohistološki uzorci u dijagnostici karcinoma pluća su biopsijski uzorci koji mogu biti uzeti prilikom bronhoskopije (ekscizija komadića sluznice bronha ili transbronhalna biopsija pluća), biopsija pleure, otvorena biopsija (prilikom manjeg kirurškog zahvata kao što su video medijastinoskopija, VMS ili video asistirana torakoskopija, VTS) ili perkutane transtorakalne biopsije. U slučaju kada nije moguće odstraniti malu leziju, tada je važno znati odabrati adekvatno mjesto za biopsiju velike tumorske mase jer njeni rubni dijelovi mogu biti nereprezentativni, a središnji dio može biti nekrotičan⁷⁰. Otvorene biopsije zahtjevaju tzv. brzu dijagnostiku na smrznutim rezovima koja omogućuje patohistološku dijagnozu unutar nekoliko minuta. U većini slučajeva takva dijagnoza je sigurna i pouzdana ali postoje situacije kada je bolje pričekati na patohistološku dijagnozu na trajnim, rutinskim patohistološkim uzorcima koje pružaju više morfoloških informacija⁷⁰.

1.1.6.2.2. Citološki uzorci u dijagnosticiranju karcinoma pluća

Za razliku od patohistološke analize uzorka tkiva, citološka dijagnostika na citološkim uzorcima zasniva se na detaljima individualne stanice, na skromnijem uvidu u njihovu arhitekturu i međusobnu orijentaciju, te bez uvida o njihovoj invaziji. Razlikujemo eksfolijativne i aspiracione citološke uzorke. U pulmološkoj citodijagnostici koriste se eksfolijativni uzorci kao što su: sputum (iskašljaj), uzorci uzeti prilikom bronhoskopije (aspirati bronha, bris bronha četkicom, otisci ekscidirane sluznice, bronhoalveolarna lavaža, otisci tranbronhalne biopsije pluća), otisci biopsije pleure. U uzorke aspiracione citodijagnostike ubrajamo citološke

uzorke dobivene aspiracionom punkcijom kao što su punktati pleuralnih izljeva, perkutani transtorakalni punktati, punktati uvećanih limfnih čvorova, punktati subkutanih metastatskih promjena te punktati uzeti prilikom bronhoskopske pretrage kao što su transbronhalni i transtrahealni punktati. Prilikom izvođenja kirurških zahvata na pulmološkim pacijentima intraoperativna citodijagnostika ima važnu ulogu u brznoj i pouzdanoj dijagnostici tumora pluća, određivanju proširenosti tumorskog procesa (otkrivanje metastaza u limfnim čvorovima), otkrivanju recidiva bolesti, razlikovanju primarnih od metastatskih procesa i sl. Treba reći da se većina dijagnostike karcinoma pluća zasniva na bronhoskopski uzetim uzorcima. Kada tumor bronhoskopski nije vidljiv potrebno je učiniti transbronhalnu ili transtrahealnu punkciju/biopsiju paratrahealno, traheobronhalno, hilarno, bronhialno ili periferno. Kada je tumor smješten u rubnim dijelovima pluća i bronhoskopski nedohvatljiv, te u situacijama kada je praktički nemoguće provesti bronhoskopski pregled (pa je nemoguće doći do patohistološkog uzorka ili je on nereprezentativan ili lažno negativan), citodijagnostika putem perkutane transtorakalne punkcije/biopsije pod kontrolom UZV-a ili CT-a. postaje jedina moguća metoda uzimanja morfološkog uzorka za dijagnozu (osim agresivnije otvorene biopsije), te je od velike dijagnostičke važnosti. Brojne studije pokazale su vrlo dobru korelaciju citološke i patohistološke dijagnoze karcinoma pluća⁷¹.

1.1.6.2.2.1. Sputum

Sputum je najlakše dobavljiv citološki uzorak u pulmološkoj citologiji, a citološka analiza sputuma je jednostavna, jeftina i najstarija metoda otkrivanja bolesti respiratornog trakta. Sputum predstavlja produkt respiratornog trakta, nastao interakcijom između epitelnih cilijarnih stanica sluznice i imunološkog sistema domaćina.. Sastoji se pretežno od sluzi, različitih stanica, a mogu se naći i udahnuti nestanični dijelovi, pa čak i ostaci hrane. Adekvatan sputum sadrži alveolarne makrofage uz stanice pločastog i bronhalnog epitela. Analizira se citološki radi otkrivanja karcinoma bronha, ali može dati kliničaru brojne vrijedne patološke

podatke o dišnom sustavu i drugim patološkim stanjima u organizmu bolesnika. Prema bolesti pluća ili cijelog organizma, u sputumu možemo naći, osim već navedenih alveolarnih makrofaga i pločastih i bronhalnih epitelnih stanica, i neutrofilne i eozinofilne granulocite, histiomonocite, limfocite, Charcot-Leydenove kristale, eritrocite, epiteloidne stanice, divovske stanice tipa Langhans, elastična vlakna, mikrolite, kukice ehinokoka, dijelove glatke muskulature, Curshmannove spirale, maligne stanice plućnih, medijastinalnih i metastatskih izvanplućnih malignih procesa kao što su stanice malignog melanoma, Reed-Sternbergove stanice, stanice koriokarcinoma i leiomiosarkoma⁷².

1.1.6.2.2.2. Aspirat bronha

U toku bronhoskopskog pregleda fleksibilnim fiberoptičkim bronhoskopom, sukcijom sekreta traheje i bronha može se dobiti aspirat koji se onda analizira citološki i bakteriološki. U toku pregleda u bronhe se uštrca određena količina fiziološke otopine koja se ponovo isiše, a dobiveni sadržaj koristi u citologiji i bakteriologiji. Metoda je vrlo korisna jer omogućuje dobivanje uzorka i iz periferije pluća⁷².

1.1.6.2.2.3. Uzorak brisa bronha četkicom

Ova vrsta materijala dobiva se u tijekom bronhoskopskog pregleda tako da se kroz endoskop provede instrument s četkicom na vrhu kojom je moguće pod kontrolom oka na periferiji segmentalnih bronha uzeti uzorak za citološku analizu, nakon čega se materijal sa četkice razmaže na predmetno stakalce i dalje citološki obradi. Metoda je pouzdana, bezopasna, jednostavna, a naročito onda kada se zbog opasnosti od krvarenja želi izbjeći standardna biopsija tumora ili pluća, te se ona sve više primjenjuje umjesto biopsije. Uzorak brisa bronha četkicom smatra se zadovoljavajućim kada sadrži stanice ili agense od dijagnostičke važnosti za patološki proces. U odsustvu takvih stanica adekvatnost uzorka postaje stvar osobne

procjene. Dobar uzorak trebao bi sadržavati dovoljan broj očuvanih cilindričnih epitelnih stanica, a prisustvo manjeg broja loše očuvanih epitelnih stanica uz mnogo krvi, upalnih stanica, artefakata nastalih prilikom sušenja i uz kontaminaciju većeg broja oralnih stanica pločastog epitela, čini uzorak nezadovoljavajućim.

Uzorci aspirata bronha i brisa bronha četkicom mogu doseći visoki stupanj osjetljivosti (veći od 90%) i specifičnosti. Ti rezultati u mnogočemu ovise o smještaju i veličini tumora, njegovom histološkom tipu i vještini bronhoskopičara⁷³.

1.1.6.2.2.4. Otisak biopsije sluznice bronha ili tumora (Otisak ekscidirane sluznice)

Tijekom bronhoskopskog pregleda uz uzimanje uzorka aspirata bronha i brisa bronha četkicom moguće je uzeti i bioptički uzorak jer je iskustvo pokazalo da istodobno uzimanje više različitih uzoraka povećava postotak pozitivnosti citološke pretrage. Radovi mnogih autora, na velikom broju karcinoma, dokazuju da je bolje kombinirati analizu različitih bronhoskopskih uzoraka te se na taj način postotak dokazanih karcinoma može popeti na više od 90%, dok pozitivnost samo u bioptičkom uzorku rijetko prelazi 70%⁷². Pongrac i sur.⁷² navode da su se njihovi citološki i patohistološki nalazi istog bioptičkog uzorka podudarali u 70% u dijagnozi karcinoma, a u 20% slučajeva citološka analiza dala je pozitivan nalaz karcinoma dok je patohistološki nalaz bio negativan.

1.1.6.2.2.5. Transbronhalna (TBP) i transtrahealna (TTP) aspiracijska punkcija karine traheje

Ovom metodom moguće je odrediti tumorsku invaziju u peribronhalne ili medijastinalne limfne čvorove, što odlučuje o operabilnosti tumora. Prednost metode je što se uzorci za citološku analizu dobivaju jednostavno, lako i za bolesnika pošteno jer tada nije potrebno učiniti medijastinoskopiju ili eksplorativnu torakotomiju. Također je na taj način moguće dokazati i druge patološke procese

medijastinuma kao što su maligni limfomi, sarkoidoza, tuberkuloza, ciste, timom, metastatske karcinome drugih izvanplućnih lokalizacija i sl⁷².

1.1.6.2.2.6. Bronhoalveolarna lavaža (BAL)

Bronhoalveolarna lavaža je postupak ispiranja plućnog parenhima i distalnih bronha izotoničnom otopinom NaCl. BAL je uglavnom dijagnostički postupak ali može biti i terapijski (u bolesnika s alveolarnom proteinozom). Relativno je sigurna metoda s malim brojem komplikacija. Vršiti se fleksibilnim bronhoskopom tako da se vrh bronhoskopa zaglavi u segmentalni ili subsegmentalni bronh područja koje želimo isprati, a potom se određena količina tekućine u 4-5 frakcija instilira kroz radni kanal i aspirira u odgovarajuću silikoniziranu posudu. Često se izvodi u istom aktu s transbronhalnom biopsijom pluća kao komplementarna metoda⁷⁴. Udio alveolarne i bronhalne komponente u lavatu procjenjuje se citološki. Adekvatan lavat sadrži manje od 5% stanica bronhalnog epitela na 200 stanica u vidnom polju i prikladan je za mikrobiološku, citološku, imunocitokemijsku i biokemijsku analizu. Citološkom analizom može se postaviti dijagnoza malignih bolesti plućnog parenhima, alveolarne proteinoze, histiocitoze Langerhansovih stanica, a može pomoći i u postavljanju dijagnoze limfocitnog alveolitisa (u tuberkulozi, sarkoidozi uz povišeni omjer CD4/CD8), hipersenzitivnom pneumonitisu, (snižen omjer CD4/CD8), limfocitnoj intersticijskoj pneumoniji i limfoproliferativnim bolestima. Neutrofilni alveolitis nalazimo u idiopatskoj plućnoj fibrozi i fibrozirajućem obliku nespecifične intersticijske pneumonije. Veći udio eozinofila nalazimo u Loefflerovom sindromu, alergijskoj bronhopulmonalnoj aspergilozi, Chürg-Straussovom sindromu i kroničnoj eozinofilnoj pneumoniji. Miješani alveolitis nalazi se u raznim kroničnim idiopatskim pneumonijama. Visok postotak siderofaga ukazuje na sindrom alveolarne hemoragije. BAL je odlična metoda i u dijagnostici infekcija plućnog parenhima imunokompromitiranih bolesnika.

1.1.6.2.2.7. Transbronhalna biopsija pluća (TBBP)

Ovom metodom uzima se komadić plućnog parenhima za citološki i patohistološki pregled uz pomoć fleksibilnog fiberoptičkog bronhoskopa. Najčešće se koristi u dijagnozi nejasnih difuznih plućnih infiltrata, sumnje na limfangiozu pluća, sumnje na razne bakterijske i gljivične plućne infekcije, posebno u imunokompromitiranih bolesnika i raznih drugih patoloških supstrata (poput sarkoidoze, tuberkuloze, intersticijske plućne fibroze itd.)⁷².

1.1.6.2.2.8. Transtorakalna aspiracijska punkcija

Transtorakalna aspiracijska punkcija je jednostavna, laka i brza dijagnostička metoda, čije su komplikacije rijetke, a daje vrlo visok postotak pozitivnih nalaza. Metoda je izbora za patološke procese toraksa do dubine od 9 cm. Vrlo je primjerena za punkciju supstrata prednjeg ili stražnjeg medijastinuma, gdje je drugim dijagnostičkim metodama, osim dijagnostičke torakotomije, teško doći do adekvatnog uzorka za citološku analizu. Osjetljivost metode kreće se do 90%, a točnost više od 90%. Punktiraju se lezije manje od 1 cm pa sve do 10 cm i više. U mnogim je slučajevima jedina dijagnostička metoda kojom se prije operacije može dokazati patološki supstrat. Ovim načinom dijagnosticiraju se primarni karcinomi pluća, razni drugi dobroćudni i zloćudni tumori, razni upalni tumori, metastatski primarno izvanplućni maligni procesi, neurogeni tumori, maligni limfomi i dr.⁷².

1.1.6.2.2.9. Intraoperacijska citološka pretraga

Ovom tehnikom intraoperacijski se uzima tumor ili drugi patološki supstrat i otisne se na predmetno stakalce. Uzorak se odmah priprema za mikroskopiranje: suši se na zraku 5-6 minuta, boji skraćenom May-Grünwald-Giemsa metodom bojenja (2 minute s May-Grünwald bojom, ispire destiliranom vodom i 3-4 minute s Giemsa

bojom), ispere destiliranom vodom, čisti i citološki analizira. Visoko je osjetljiva metoda, a dijagnostička točnost benignih i malignih tumora doseže do 98%. Slabiji rezultati postižu se u dijagnozi mezenhimalnih tumora, karcinosarkoma, teratokarcinoma, hemangioblastoma, histiocitoma i malignih neurogenih tumora za koje je potrebno dodatna obrada što je za intraoperacijsku dijagnostiku nemoguće⁷².

1.1.6.2.3. Imunocitokemija/imunohistokemija

Raspoloživost specifičnih monoklonskih protutijela omogućuje nam identifikaciju produkata stanica ili površinskih markera. Oni nam pomažu u kategorizaciji slabo diferenciranih i nediferenciranih malignih tumora. U mnogim slučajevima slabo diferencirani maligni tumori različitog podrijetla slični jedni drugima. Te je tumore nemoguće razlikovati samo na temelju citomorfoloških karakteristika, te nam tu pomažu specifična protutijela. Na primjer prisustvo citokeratina, detektiranog imunocitokemijskom obradom, ukazuje na epitelno podrijetlo stanica (dakle, radi se o karcinomu), dok prisustvo desmin pozitivnih stanica ukazuje na neoplazmu podrijetla mišićnih stanica. Imunocitokemija/imunohistokemija pomaže i u određivanju podrijetla metastatskih tumora. Na primjer maligne stanice pozitivne na TTF-1 ukazuju na podrijetlo stanica iz pluća ili iz štitnjače⁷⁵. Imunocitokemija/imunohistokemija je metoda kojom se mogu detektirati i molekule koje imaju prognostičko i/ili terapijsko značenje u tretmanu ovih tumora⁷⁰.

1.1.6.2.4. Kompjuterski asistirana image analiza (Citometrija)

Kompjuterska analitička studija izgleda stanica kroz svjetlosni mikroskop omogućava, s većom točnošću i objektivnošću, prepoznavanje tipa stanica pomoću analize njihove citoplazme i jezgre. Takva analiza, transformacijom izgleda stanica u digitalne podatke, pruža kvantitativnu ocjenu različitih staničnih komponenta⁷⁶.

Kompjuterski asistirana slikovna analiza prvotno je korištena u određivanju promjena vezanih za malignitet kao što je distribucija DNA u jezgri patohistološki normalnih stanica u blizini preinvazivnih ili invazivnih karcinoma. Razina DNA u tumorskim stanicama je često viša nego u normalnim stanicama zbog kromosomskih promjena. Te kvantitativne mikroskopske tehnike omogućuju pregled tisuće stanica po uzorku u relativno kratkom vremenu. Slične tehnike onima odobrenih u SAD-u za pretraživanje citoloških uzoraka cerviksa, mogle bi u budućnosti igrati ulogu i u pretraživanju (skriningu) stanica karcinoma pluća.

1.1.6.3. MOLEKULARNE TEHNIKE U DIJAGNOSTICI KARCINOMA PLUĆA

Proteklih je godina razvoj novih molekularnih tehnika i amplifikacijskih metoda omogućio veliki napredak u dobivanju genetskih informacija iz malog uzorka tkiva ili stanica, bez potrebe izvođenja agresivnih kirurških zahvata. Čak i mali uzorci omogućuju dobivanje visoko kvalitetnih nukleinskih kiselina koje se mogu koristiti u identifikaciji različitih molekularnih značajki stanica karcinoma¹¹.

1.1.6.3.1. Metode molekularne dijagnostike - DNA/RNA molekularne tehnike

Za praktičnu, laboratorijski baziranu molekularnu dijagnostiku plućnih bolesti danas se najčešće koriste dvije metode: fluorescentna in situ hibridizacija. (FISH) i lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR)⁷⁷.

1.1.6.3.1.1. Fluorescentna in situ hibridizacija - FISH

Hibridizacija nukleinskih kiselina omogućuje detekciju molekula DNA ili RNA koje su komplementarne bilo probnoj nukleinskoj kiselini koja primjerice može odgovarati virusnom genomu ili kloniranom genu⁷⁸. Osim u ekstraktima stanica, hibridizacijom nukleinskih kiselina možemo homologne DNA ili RNA molekule detektirati i na kromosomima ili intaktnim stanicama. Metodu nazivamo

hibridizacijom in situ, a u njoj radioaktivno ili fluorescentno obilježenu probu hibridiziramo na specifičnim staničnim ili substaničnim strukturama, analiziramo mikroskopom. Obilježene je probe moguće hibridizirati s intaktnim kromosomima kako bismo odredili područja kromosoma koja sadržavaju gene od interesa. Hibridizacijom in situ također možemo detektirati specifične mRNA u različitim tipovima stanica u tkivu⁷⁹. Prednost metode leži u mogućnosti detekcije genskih promjena na specifičnoj grupi stanica ili unutar malog broja istraživanih stanica.

FISH metoda je metoda hibridizacije in situ (ISH) koja za određivanje kromosomskih translokacija primjenjuje fluorescentne metode vizualizacije (fluorescentne boje) dok kromogena in situ hibridizacija (CISH) koristi za metodu vizualizacije kromogene koje proizvodi obojena kemikalija na mjestu reakcije⁷⁹. Uglavnom se koristi u citološkim i kirurškim uzorcima u otkrivanju tumorskih stanica i nekih mikroorganizama te u kirurškim operativnim uzorcima u određivanju prognoze i odabiru terapijskog tretmana bolesti.

1.1.6.3.1.2. Lančana reakcija polimeraze - PCR

To je laboratorijska tehnika koja oponaša postupak prepisivanja DNA (replikaciju) koji se odvija u svakoj živoj stanici. Lančanom reakcijom polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) umnaža se mali odsječak DNA, što se koristi u dijagnostici kako bi se prepoznalo da li je odgovarajući odsječak DNA prisutan u uzorku. Metodu je 1988. godine razvio Kary Millus, te je za svoj izum dobio 1993. godine Nobelovu nagradu. Ako je poznat dio slijeda nukleotida u nekoj molekuli DNA, lančanom reakcijom polimeraze moguće je u potpunosti in vitro pripremiti goleme količine te molekule. Osnova metode je opetovano umnažanje određenog segmenta DNA s pomoću DNA polimeraze. Broj novonastalih molekula je dvostruko veći nakon svakog kruga umnažanja i povećava se eksponencijalno, te je iz malog broja kopija molekula kalupa koje su prisutne na početku reakcije moguće pripremiti veliku količinu DNA tako da DNA nije potrebno izolirati iz većeg broja stanica ili komada tkiva. Od jednog lanca DNA može se dobiti velik broj kopija što

omogućuju biokemijske osobine molekule deoksiribonukleinske kiseline. Molekulu DNA možemo denaturirati, razdvojiti joj lance, a jednolančana DNA tada predstavlja kalup za sintezu drugog komplementarnog lanca DNA u metodi lančane reakcije polimeraze (PCR metodi). Tako je moguće od jedne ishodišne molekule DNA geometrijskom progresijom dobiti onolik broj molekula koliko je određeno ciklusa sinteze. Za tu reakciju neophodno je prisustvo enzima DNA polimeraze koja katalizira nizanje nukleotidnih ostataka u molekulu DNA, za što su mu potrebni slobodni nukleotidi i kratki odsječci DNA zvani početnice (engl. primeri) za započinjanje sinteze. Početnice su oligonukleotidni lanci, dugi 20-30 ostataka, komplementarni početnom i završnom dijelu gena koji želimo umnožiti. Danas se koriste sintetski i već pročišćene početnice koje naručujemo od komercijalnih tvrtki. Produkt PCR metode je eksponencijalno nakupljanje specifično ciljanog fragmenta DNA, pa je zato veoma važno odabrati jedinstveni i specifični slijed nukleotida za željenu sekvencu prema kojem će se sintetizirati početni oligonukleotidi jer ciljna DNA čini samo mali dio smjese genomske DNA. Jedini nedostaci reakcije su što umnožava fragmente do najviše 25 kb duljine i u tome što moramo poznavati sekvence koje graniče s ciljnim fragmentom, kako bismo mogli konstruirati početnice⁸⁰. Sama metoda izvodi se u odgovarajućim uređajima koji brzo griju i hlade uzorke precizno na unaprijed određene temperature. Lančana reakcija polimeraze postala je nezamjenljiva u molekularnoj biologiji, naročito u području medicinske dijagnostike kao efikasna i senzitivna u molekularnoj patologiji primarnih i metastatskih neoplazmi, upalnim mehanizmima i infektivnim bolestima⁷⁷. Identificiranjem abnormalnosti određenih gena, uključujući i gena za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR), PCR metoda nam pomaže u prepoznavanju pacijenata koji će dobro odgovoriti na suvremenu terapiju lijekovima inhibitorima tirozin kinaze¹¹. Zbog vrlo široke primjene, do danas su razvijene brojne modifikacije osnovne metode PCR-a.

Metilacijski PCR je metoda koja se koristi u otkrivanju epigenetskih abnormalnosti stanica karcinoma. DNA metilacija igra važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena. Tumori uglavnom pokazuju globalnu hipometilaciju i regionalnu

promoter hipermetilaciju. U ranoj fazi razvoja karcinoma, promjena u hipermetilaciji DNA promotera viđena je u dosta gena uključujući i tumor supresorske gene kao što su p16, DAP-kinaza, RAR- β , FHIT, RASSF1 i APC. Dokazano je da se promjena u hipermetilaciji pojavljuje i u prekanceroznim stanjima karcinoma pluća i kao takva može se koristiti za otkrivanje populacije pacijenata s povišenim rizikom za razvoj karcinoma pluća⁸¹.

Komplementarna DNA može se koristiti kao kalup za PCR obrnutim prepisivanjem (engl. reverse transcript PCR, RT-PCR). RT-PCR koristi se u istraživanju prisustva mRNA transkripta, te prekomjerne ili premale genske ekspresije ili odsustva ekspresije u specifičnim stanicama nakon izolacije RNA. Promjena u ekspresiji gena je karakteristika maligne transformacije, a takva promjena omogućuje identifikaciju stanica karcinoma preko detekcije mRNA specifičnih za te tumorske stanice. Nekoliko studija koriste RT-PCR u otkrivanju mikrometastaza u limfnim čvorovima, uključujući i stanice karcinoma ne-malih stanica pluća i u pretrazi periferne krvi za potencijalnom diseminacijom stanica karcinoma pluća za vrijeme lobektomije⁷⁷.

1.1.6.3.2. Dosadašnje spoznaje o izolaciji DNA i prepoznavanju molekularnih biljega u dijagnostici karcinoma pluća

Unazad nekoliko godina svjedoci smo ubrzane integracije molekularne dijagnostike u citopatologiji i njene neophodnosti zbog što boljeg tretmana bolesnika⁸². Nove probe i molekularni markeri neprestano se razvijaju u nastojanju što bolje identifikacije i karakterizacije malignih procesa. Molekularno biološka dijagnostika zasniva se pretežno na analizi nukleinskih kiselina (DNA i RNA). Većina istraživanja molekularnih markera odnosila se na izolaciju DNA iz tkivnih uzoraka koji su uglavnom fiksirani i uklopljeni u parafin⁸³ a mogu biti i svježi. Tako je najveći broj istraživanja proveden na tkivnim uzorcima o utjecaju različitih fiksativa i metoda izolacije DNA na kvalitetu dobivene genomske DNA^{84,85}. S druge strane, tek je nekoliko studija objavljeno na tu temu, rađeno na rutinskim

dijagnostičkim citološkim uzorcima⁸⁶⁻⁸⁸ Zbog manje količine uzorka koja limitira broj nukleinskih kiselina i proteina raspoloživih za analizu, najčešće molekularne tehnike u citologiji uključuju upravo in situ hibridizaciju (ISH) i lančanu reakciju polimeraze (PCR).

Molekularne metode otkrivaju mutacije ili promjenu umnažanja (amplifikaciju) onkogeni, delecije i mutacije tumor supresorskih gena i druge genetičke abnormalnosti vezane za maligne tumore. Fluorescentnom in situ hibridizacijom otkrivaju se bročane i strukturne abnormalnosti kromosoma i ta je metoda na jednoslojnim citološkim preparatima tekućih uzoraka (iz tjelesnih šupljina, uzoraka eksfolijativne citologije ili aspirata iglom) pokazala odlične rezultate koji mogu biti i bolji od rezultata dobivenih na tkivnim uzorcima u otkrivanju kromosomskih translokacija⁸².

Rezultati PCR metode ovise o količini i kvaliteti DNA potrebne za analizu. Ekstrakcija nukleinskih kiselina povijesno se koristila organskim tehnikama koristeći kloroform i fenol. Ta metoda koristi kemikalije opasne za čovjeka i okoliš, dugo traje, naporna je i ima relativno visoke troškove. Stoga se sve više primjenjuju komercijalni kitovi koji većinom koriste kolonice sa silika gel membranom na koju se veže DNA⁸⁰. Danas ekstrakcija nukleinskih kiselina može biti i automatizirana, no složenost i troškovi takvih procedura predstavljaju značajno opterećenje u slučaju sistematske široko primjenjujuće izolacije DNA pa je stoga svako pojednostavljenje procedure izolacije DNA dobro došlo u štednji vremena i novca⁸⁹. Većina PCR metoda koristi se citološkim tekućim uzorcima iz „epruvete“, a manje citološkim preparatima na staklu. Određene metode su se razvile za izolaciju DNA iz prethodno obojenih arhivskih citoloških uzoraka i to mikrodisekcijom prethodno morfološki izabranih stanica. Greške i zamke takvih procedura leže u kontaminaciji produkata PCR metode, upotrebi nepovoljnih tehnika čija je osjetljivost loša, teškoćama u upotrebi adekvatnih pozitivnih i negativnih kontrola metode i prevelikom oslanjanju na molekularne rezultate u nedostatku morfoloških dokaza. Upotreba kitova i drugih komercijalnih reagensa pomogla je u premoštenju nekih od tih problema s nekonzistentnim rezultatima⁸². Primjena metoda molekularne

biologije na citološkim uzorcima, kao što je aspirat bronha, u dijagnostičke svrhe i za istraživanje stanica karcinoma pravi je izazov. Aspirati bronha često sadrže manju količinu DNA, kad se uspoređuju s tkivnim uzorcima. Pri tom obično samo mali dio cjelokupne genomske DNA predstavlja DNA tumorskih stanica. Stoga je kritično, za molekularna citološka istraživanja na aspiratima bronha, dobivanje visoko kvalitetne genomske DNA. Istraživanja su pokazala da komercijalni kitovi nude brze i jednostavne protokole za primjenu čak i za neiskusno osoblje, te nisu toksični, ali proizvode manje DNA koja je značajno više fragmentirana^{86,88}. Ekstrakcija fenol/kloroformom daje najviše DNA i to duže fragmente, ali je toksična i dugo traje. Čistoća DNA je pri tom nešto slabija, što još uvijek ne predstavlja prepreku daljnjim analizama ovakvih uzoraka⁹⁰.

1.1.6.3.3. Molekularni biljezi važni za dijagnozu karcinoma pluća

Molekularni biljezi karcinoma pluća koriste se u svrhu otkrivanja rizičnih faktora za razvoj karcinoma, za rano otkrivanje karcinoma, u odabiru optimalnog tretmana pacijenta, u prognozi bolesti i za praćenje pacijenta nakon tretmana bolesti. U svim nabrojenim područjima priželjkuje se otkrivanje dovoljno osjetljivih, dovoljno specifičnih i isplativih biomarkera.

1.1.6.3.3.1. Biomarkeri karcinoma pluća koji se trenutačno koriste

Pretraga krvi je jedna od najjednostavnijih načina za otkrivanje biljega raka. Slijedeći su markeri kandidati za kliničku primjenu identifikacijom u krvi, za otkrivanje i praćenje karcinoma pluća⁹¹.

Karcionoembrionalni antigen (CEA) je onkofetalni protein koji nije prisutan u odraslih. Povećana proizvodnja u stanicama karcinoma uzrokovana je prestankom represije CEA-inkodirajućeg gena. U karcinomima pluća gdje je CEA povišen, nivo mu može korelirati s odgovorom na terapiju. CEA nije osjetljiv ni specifičan i često

je povišen u pušača. Može se koristiti uz druga mjerenja koja prate relaps bolesti, a njegov povišeni nivo je ponekad loš prognostički znak.

CYFRA 21-1 mjeri fragmente citokeratina 19 prisutnog u epitelnim stanicama. Povezan je s karcinomom epitelnih stanica uključujući i karcinom ne-malih stanica pluća, posebno pločastog porijekla. Njegova osjetljivost za karcinome ne-malih stanica varira od 23-70%. Može biti povišen i u benignim bolestima pluća. Čini se da korelira s odgovorom na terapiju i s prognozom, te se može koristiti uz druge testove za prognozu i praćenje povratka bolesti.

Antigen karcinoma pločastih stanica je strukturalni protein citoplazme. Njegova koncentracija u cirkulaciji može biti povišena u karcinomima pločastih stanica, ali i u bolestima kože i upalnim plućnim bolestima. Publicirana osjetljivost mu je za karcinome ne-malih stanica pluća 15-55%, s najvišom osjetljivošću za karcinom pločastih stanica. Nivo mu može korelirati s metastatskim potencijalom karcinoma.

Neuron specifična enolaza (NSE) je glikolitički enzim proizveden u centralnim i perifernim neuronima i malignim tumorima neuroektodermalnog porijekla i može biti povišena u medularnom karcinomu štitnjače i karcinomu pluća malih stanica. Nađena je i u različitim cirkulirajućim stanicama i može biti povišen i u upalnim bolestima. Njezina osjetljivost u otkrivanju karcinoma malih stanica pluća može biti i 74%, a povišen nivo korelira s kratkoćom preživljenja.

Progastin-oslobađajući peptid je mnogo stabilniji biokemijski prekursor gastrin oslobađajućeg peptida. Proizvodi ga neuroendokrino tkivo gastrointestinalnog i respiratornog trakta, stimulirajući oslobađanje hormona. Ponekad se koristi kao marker za karcinom malih stanica pluća iako je povišen u bubrežnim bolestima i nekim benignim bolestima pluća. Osjetljivost za karcinom malih stanica pluća mu je od 17-86%. Razlike u razini ekspresije nemaju prognostički značaj. Zajedno s NSE može se koristiti u praćenju odgovora na terapiju karcinoma malih stanica pluća.

Tumor M2-piruvat kinaza je dimerična forma piruvat kinaze koja je povećano izražena u tumorskim stanicama. Nivo joj je povišen u brojnim malignim bolestima

kao i u upalnim procesima. Osjetljivost za karcinom pluća varira od 50-71% s najvišom osjetljivošću za adenokarcinome. Koristi se i za praćenje relapsa bolesti nakon provedene terapije.

C reaktivni protein (CRP) povišen je u mnogim upalnim stanjima i u karcinomima. Nije specifičan za karcinom pluća, ali može biti koristan za prognozu bolesti. U provedenoj studiji na 7017 ispitanika praćenih kroz 10 godina povišen nivo CRP-a povezan je s povišenim rizikom od karcinoma i to najviše s karcinomom pluća. Autori zaključuju da kronična upala i oslabljen imunološki mehanizam rezultiraju kroničnom upalom što može prethoditi nastanku karcinoma pluća.

Paneli markera koji uključuju kombinaciju CEA, CYFRA 21-1, antigen karcinoma pločastih stanica i NSE ponekad se koriste za unaprijeđenje osjetljivosti u otkrivanju karcinoma pluća, ali im nedostaje specifičnosti pa se preporučuju samo za eventualno praćenje relapsa bolesti nakon provedene terapije.

Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) – S provedbom ciljane terapije karcinoma pluća sve je veći interes za molekularne markere koji bi bili specifični u predviđanju odgovora pacijenata na terapiju i prognozu bolesti. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) i njegova intracelularna komponenta tirozin kinaze istraživana je zbog svoje uloge u biologiji karcinoma ne-malih stanica pluća. Agensi koji koriste taj molekularni put trenutačno se koriste u terapiji karcinoma pluća. To su male molekule, kao gefitinim i erlotinib, koje inhibiraju tirozin kinazu, kao i monoklonalna antitijela za ekstracelularnu komponentu EGFR-a, kao cetuximab i panitumumab. Prisustvo mutiranog EGFR-a povezano je s odgovorom na inhibitore tirozin kinaze. Nedavno provedene studije navode na zaključak da postoje i drugi značajni parametri, kao što su brojevi kopija EGFR-a i ekspresija mRNA, koji se mogu odrediti u citopatološkim uzorcima i pomoći kliničarima u odabiru terapijskog pristupa⁹².

1.1.6.3.3.2. Potencijalni biomarkeri karcinoma pluća

Postepeno upoznavanje mnogih različitih genetskih i epigenetskih promjena uključenih u malignu transformaciju stanica karcinoma pluća, ukazuje na brojne nove potencijalne biomarkere.

Unazad nekoliko godina studije o biomarkerima karcinoma pluća sve su brojnije i mnoge govore o visokoj osjetljivosti i specifičnosti. Međutim, neke su rađene na malim uzorcima pacijenata, nekima nedostaje reproducibilnost ili su kontrole nedosljedne tako da se njihova prava vrijednost tek mora dokazati na većim kliničkim studijama. Razvoj biomarkera za prognozu i personalizaciju terapije nakon dijagnoze čini se izgledna i postoji nada za otkrićem praktičnih biomarkera za ranu dijagnozu karcinoma pluća u skoroj budućnosti.

1.1.6.3.3.2.1. Tumor supresorski geni

Molekularni mehanizmi onkogene aktivacije uključuju amplifikaciju, mutaciju, translokaciju i prekomjernu ekspresiju gena.

Rb gen smješten je na dužem kraku kromosoma 13 (13q) i određuje regulatorni nuklearni fosfoprotein koji potiče diobu stanica. Abnormalnosti ovog tumor supresorskog gena gotovo su univerzalne u karcinomima malih stanica pluća, ali su prisutne u samo 30% karcinoma ne-malih stanica pluća.

Najčešće mutirani tumor supresorski gen u karcinomoma pluća je p53 gen, smješten na kraćem kraku kromosoma 17 (17p), a mutacije se događaju gotovo isključivo u kodonu 157 kada su vezane za pušenje^{93,94}. On regulira stanični rast između G1 i S faze staničnog ciklusa i ima važnu ulogu u induciranju apoptoze stanica sa oštećenom DNA, a njegove mutacije su obično odraz izloženosti karcinogenima kao što je pušenje. Naziva se čuvarom jer štiti stanice respiratornog trakta od djelovanja karcinogena. Mutacije p53 inhibiraju ili prekidaju proizvodnju p53 proteina. U svojoj mutiranoj formi p53 protein se uglavnom sporije razgrađuje nego divlji tip, što rezultira njegovim visokim nivoom u malignim stanicama.

Abnormalni gen p53 nađen je u 40-70% karcinoma malih stanica pluća i u 40-60% svih karcinoma ne-malih stanica pluća, češće u karcinomu stanica pločastog epitela nego u adenokarcinomu.

Replikacija DNA inhibirana je genom p21 čija je ekspresija povišena paralelno s povišenom ekspresijom p53. Uočava se u 65-75% karcinoma ne-malih stanica pluća.

Tumor supresorski protein p16 mutiran je u 10-40% karcinoma ne-malih stanica pluća i u manje od 1% karcinoma malih stanica. Hipermetilacija p16(INK4a) predstavlja loš prognostički pokazatelj, uglavnom u adenokarcinomima⁹⁵.

1.1.6.3.3.2.2. Protoonkogeni i stimulatori rasta

Poznata su 3 protoonkogena u ras porodici: K-ras, N-ras i H-ras koji određuju sastavne proteine gvanozin trifosfatne grupe znane kao p21ras. Oni su smješteni na unutarnjoj strani stanične membrane i sudjeluju u prijenosu signala. Aktivacija K-ras mutacijom otkrivena je u 50% adenokarcinoma pluća i može se odrediti PCR analizom stanica u bronhioalveolarnoj lavaži pacijenata s karcinomom pluća⁹⁶. Mutacija K-ras nađena je u 15-20% svih karcinoma ne-malih stanica pluća, ali rijetko u karcinomu malih stanica, a rezultira modifikacijom slijeda aminokiselina dovodeći do značajnog pada aktivnosti unutrašnjeg gvanozin trifosfata. Protein ostaje u aktivnom stanju s gvanozin trifosfatom što sprječava njegovo oslobađanje. Ta je mutacija snažno povezana s pušenjem i u adenokarcinomima obično predstavlja negativni prognostički faktor. Mutacije drugih članova ras porodice rjeđe su prisutne u karcinomima ne-malih stanica pluća i rijetke su u karcinomu pluća. Mutacija K-ras gena otkrivena je u uzorcima biopsije bronha pušača bez karcinoma pluća, kao i u sputumima prije dijagnoze karcinoma pluća, pa se smatra mogućim markerom premalignog stanja.

Porodica protoonkogena myc ima 3 člana: C-myc, N-myc i L-myc i uključuje nuklearne proteine koji se vežu na DNA i djeluju kao regulatori transkripcije. C-myc je amplificiran u 80-90% karcinoma malih stanica i u oko 10% karcinoma ne-malih

stanica pluća gdje ima loš prognostički značaj. Ekspresija ovog gena veća je u uzorcima tumora pluća nego u neneoplastičnom plućnom tkivu. Neki onkogeni djeluju kroz hiperprodukciju normalnih proteina, sugerirajući regulacijski defekt u transkripciji ili amplifikaciju gena. Geni i proteinski produkti koji tako djeluju jesu c-erbB-1 i c-erbB-2 protoonkogeni, a oba su receptori tirozin kinaze. C-erbB-1 je najčešće nađen u karcinomima ne-malih stanica, posebno u karcinomima pločastih stanica (65-90%). C-erbB-2 je najčešće prisutan u adenokarcinomima, pokazuje povećanu ekspresiju u manje od 5% karcinoma malih stanica i u 25% karcinoma ne-malih stanica pluća⁹⁷.

1.1.6.3.3.2.3. Kromosomske abnormalnosti: aneuploidije i delecije

Brojčane kromosomske promjene ili aneuploidije ustanovljene su protočnom citometrijom. Za njihovu dijagnozu koristi se klasično kromosomsko pruganje, spektralna kariotipizacija i fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)^{98,99}.

1.1.6.3.3.2.4. Gubitak heterozigotnosti (engl. loss of heterozygosity, LOH)

Normalna ljudska DNA sadrži dva alela za svaki genski lokus, a promjena jednog alela može rezultirati patološkim promjenama. Genski lokusi, koji sadrže dvije različite kopije alela, su heterozigotni. Većina heterozigotnih alela dopušta normalne varijante i ne rezultira patološkim promjenama. Jedan od pretpostavljenih načina onkogeneze je da, ako je jedan alel već pri rođenju nefunkcionalan, promjena drugog mutacijom dovest će do promjene djelovanja stanice i razvoja tumora. To uočavamo tijekom dijagnostičkog postupka kao promjenu jednog od alela, kojeg više ne možemo otkriti u promijenjenom tumorskom tkivu i to nazivamo gubitak heterozigotnosti.

Karcinomi, uključujući i karcinom pluća, uglavnom pokazuje gubitak heterozigotnosti alela važnih za regulaciju rasta i homeostazu. Više od 90% karcinoma malih stanica i više od 70% karcinoma ne-malih stanica sadrži neki

gubitak heterozigotnosti. LOH je ustanovljen i u nekim benignim bolestima uključujući astmu i KOPB, vjerojatno odražavajući genetsku predispoziciju identificiranu u toj bolesti⁷⁶.

1.1.6.3.3.2.5. Hipermetilacija gena

Metilacija promotora u mnogim različitim tumor supresor genima rani je događaj u razvoju karcinoma pluća. Hipermetilacija promotorske regije gena povezana je sa sprječavanjem transkripcije i zahvaća gene uključene u svim aspektima normalnog funkcioniranja stanice te je kritični okidač za malignu transformaciju i njenu progresiju¹⁰⁰. Metilacija se može ustanoviti specifičnom metilacijskom PCR analizom koja koristi bisulfite za konvertiranje svih nemetiliranih (ali ne i metiliranih) citozina u uracil, a zatim se izvodi amplifikacija sa početnicama za metiliranu nasuprot nemetilirane DNA. Metilacija promotora postala je aktivno polje istraživanja. U prijašnjim studijama ustanovljena je poremećena metilacija p16(INK4a), APC, TMS11, RASSF1 i DPK. Nedavno istraživanje Belinskog i sur. utvrdilo je da je hipermetilacija promotorske regije mnogih različitih gena u krvi i sputumu povezana s karcinomom pluća i da može prethoditi kliničkoj dijagnozi karcinoma¹⁰¹. Istražuje se metilacija u tjelesnim tekućinama te citopatološkim uzorcima. U bronhioalveolarnoj lavaži metilacija p16, RASSF1A, H-cadherina i RAR β povezana je s prisustvom plućnog karcinoma, a FHIT metilacija je izgleda povezana s pušenjem¹⁰². U uzorcima aspirata bronha, hipermetilacija promotorske regije gena RASSF1A nađena je u 88% karcinoma malih stanica pluća i 28% karcinoma ne-malih stanica pluća. Hipermetilacija nije ustanovljena u ispitanika s benignim bolestima pluća¹⁰³. Druge studije ustanovile su poremećenu promotor metilaciju promotora APC, p16 i RAR β 2 gena u aspiratima bronha pacijenata s karcinomom pluća s osjetljivošću od 69% i specifičnošću od 87% u detekciji karcinoma korištenjem kombinacije tih gena^{104,105}. Istraživanjem metilacije brojnih staničnih linija karcinoma pluća ustanovljeno je 132 gena koji su

suprimirani metilacijom. Istraživači potvrđuju da su ti geni izraženi u normalnim stanicama pluća, ali često nisu povezani s primarnim karcinomom pluća¹⁰⁶.

1.1.6.3.3.2.6. Apoptoza i angiogeneza

Anti-apoptotički proto-onkogen Bcl-2 važan je za apoptozu. Njegova ekspresija viša je u karcinomu malih stanica (75-95%) nego u karcinomu ne-malih stanica pluća (25% u karcinomu pločastih stanica i 12% u adenokarcinomu)^{107,108}. Tumorima su potrebni angiogeni faktori rano u patogenezi kako bi što prije osigurali svoju krvnu oskrbu potrebnu za njihov rast. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i fibroblastični faktor rasta važni su induktori angiogeneze. Ekspresija VEGF-a je povišena u metastatskim karcinomima pluća, a u karcinomu pločastih stanica pluća je konstantno izražena. VEGF povećava mikrovaskularnu permeabilnost i stimulira rast endotelnih stanica. Ekspresija VEGF je prognostički indikator u pacijenata s karcinomom pluća, a uključena je u progresiju tumora kroz dva mehanizma: kao faktor rasta za stanice tumora i kao mitotički faktor za vaskularne endotelne stanice¹⁰⁹. Pušenje uzrokuje gubitak funkcije fragilnog histidin trijadskog gena (FHIT) što se povezuje s lošom prognozom. Promjena njegove ekspresije nađena je u 80% svih karcinoma malih stanica pluća i 40% karcinoma ne-malih stanica pluća⁹⁵.

1.1.6.3.3.2.7. Aktivacija telomeraza

Funkcija ljudskih telomera je zaštita građe krajeva kromosoma. Njihova disfunkcija igra važnu ulogu u inicijaciji karcinoma i njegovoj progresiji. Telomeraza je potencijalni marker za karcinom pluća. Njezine zaštitne strukture izgrađuju krajeve kromosoma i uključene su praktički u sve tipove karcinoma ljudi. Ekspresija tri osnovne komponente telomeraza je povišena u gotovo svim karcinomima malih stanica i u 80-85% karcinoma ne-malih stanica pluća. Jako povišen nivo aktivnosti telomeraza korelira s proširenošću karcinoma ne-malih

stanica. Aktivnost telomeraze nađena je povišena u 71% hiperplazija, u 80% metaplazija i u 100% karcinoma in situ stanica bronhalnog epitela¹¹⁰.

1.1.6.3.3.2.8. Cirkulirajuća DNA

Nivo cirkulirajuće van stanične DNA u plazmi i serumu je općenito prepoznata kao viša u pacijenata sa karcinomom pluća, nego u zdravih ispitanika. Ona nije korisna kao biomarker jer joj nivo značajno varira ovisno o tipu i proširenosti karcinoma i tehnici mjerenja DNA. Kao izvor povišene DNA u karcinomu pluća smatraju se apoptotičke ili nekrotične tumorske stanice koje oslobađaju DNA u cirkulaciju. Sve je veći interes za otkrivanje specifičnih markera koristeći cirkulirajuću DNA koja pokazuje genetske i epigenetske promjene tipične za tumor (gubitak kromosoma, aktivaciju onkogeni, inaktivaciju tumor supresorskih gena metilacijom)^{111,112}.

Od otkrivanja gubitka genetskog materijala sa kromosoma 3p kao jednog od najranijih genetskih promjena koje se pojavljuju tijekom bronhalne karcinogeneze, nekoliko je studija istraživalo da li se te promjene, kao što su mikrosatelitska nestabilnost i gubitak heterozigotnosti (LOH) mogu naći u cirkulirajućoj DNA. Te su genetske promjene nađene u cirkulirajućoj DNA u 27-88% pacijenata s karcinomom pluća¹¹³. Najčešće genetske mutacije, istraživane kao mogući biomarkeri karcinoma pluća, su mutacije K-ras i p53 od kada su ustanovljene kao najčešće mutacije u karcinomu pluća i preneoplazijama. K-ras mutacije u cirkulirajućoj DNA nađene su 20-30% pacijenata s karcinomom pluća, a p53 mutacije u 27%¹¹⁴. Istraživanja su kontradiktorna u ocjeni da li te mutacije predviđaju odgovor na kemoterapiju.

1.1.6.3.3.2.9. Ekspresija gena i proteini

Mnogi istraživači istražuju proteine u krvi i sputumu kao moguće biomarkere karcinoma pluća. hnRNPB1, RNA vežući protein uključen u transport mRNA i

mutaciju RNA, čest je u karcinomu pluća pločastih stanica. Njegova izraženost u sputumu korelirala je s razinom razvoja karcinoma pluća u određenim populacijama, a protein je bio pretjerano izražen u ranom stadiju karcinoma pluća. Nedavne studije o nivou hnRNPB1 u plazmi pacijenata s karcinomom pluća pokazuju njegovu povišenu vrijednost u 46% pacijenata s karcinomom pluća u usporedbi s 12% kontrolnih ispitanika¹¹⁵. Katalitička komponenta ljudske telomeraze (engl. human telomerase catalytic component, hTERT) je povišena u karcinomima, a EGFR je često povišen u karcinomu pluća. Miura i sur.¹¹⁶ mjerili su hTERT i EGFR mRNA u 112 pacijenata s karcinomom pluća i u 80 kontrolnih ispitanika, koristeći kvantitativni RT-PCR. Broj kopija serumske hTERT mRNA korelirala je s proširenošću tumora, metastazama i relapsom bolesti, a broj kopija je bio manji nakon provedene terapije. Autori izvješćuju o osjetljivosti od 89% i specifičnosti od 73% za hTERT i osjetljivosti od 71% i specifičnosti od 80% za EGFR. Ekspresija RAP1 gena koji pomaže u regulaciji stabilnosti telomera, povezana je s boljim preživljavanjem pacijenata s karcinomom pluća¹¹⁷. Survivin je protein koji inhibira apoptozu i potiče mitozu. Količina nuklearnog survivina u tumorskom tkivu može predvidjeti povratak bolesti i loše preživljenje u pacijenata s operiranim karcinomom pluća ne-malih stanica^{118,119}. Osteopontin je preizražen u tkivu i serumu pacijenata s karcinomom pluća i može biti udružen s agresivnim tokom bolesti¹²⁰. Povišena razina otopljenog E-kadherina nađena je u pacijenata s karcinomom pluća¹²¹.

1.1.6.3.3.2.10. Proteomika i genomika

Metodologija proteomske analize napredovala je posljednjih godina. Ova metoda pomaže u klasifikaciji tumora, u prognozi, osjetljivosti na lijekove kao i u razvoju ranih dijagnostičkih markera u perifernim tekućim uzorcima kao što su serum ili urin⁴².

Proteomske studije koriste dva pristupa: jedan je profil proteina gdje se uzorak izraženih proteina koristi u identifikaciji karcinoma pluća, dok aktualni uključeni proteini mogu biti nepoznati. Drugi je pristup korištenje proteomskih tehnika u

identifikaciji individualnih proteina koji mogu poslužiti kao markeri karcinoma pluća. Jedna grupa istraživača identificirala je dva proteina: serum amiloid A i makrofag-inhibitorni faktor koji su povišeni u karcinomu pluća, ali njihov nivo nema prognostičku vrijednost¹²². U studiji praćenja pacijenata potvrđeno je da je serum amiloid A povišen u pacijenata s karcinomom pluća, ali makrofag-inhibitorni faktor nije se razlikovao u pacijenata s karcinomom pluća i kontrolnih ispitanika s drugim bolestima¹²³. Nekoliko je studija pokušalo identificirati uzorak proteina u krvi koji bi mogao razlikovati pacijente s karcinomom pluća od kontrolnih ispitanika. Analizirana je krv 158 pacijenata s karcinomom pluća i 50 kontrolnih ispitanika, a izborom od 5 proteina mogao se dijagnosticirati karcinom ne-malih stanica pluća sa osjetljivošću od 91,4%⁹¹.

2007. godine Chen i sur. izvještavaju o svojim rezultatima genomskih studija karcinoma pluća. Oni su razvili microarray analizu tumorskog tkiva pacijenata s karcinomom pluća u ranom stadiju koji su prošli operativno liječenje. Identificirali su 16 gena povezanih s lošim ishodom bolesti. Pet od šest gena potvrđeni su RT-PCR-om. Pacijenti s takvim visoko rizičnim genima imaju 3-4 puta veću vjerojatnost da umru unutar 5 godina nakon operacije¹²⁴. Buduće kliničke studije tek će ustanoviti pravu prognostičku vrijednost rezultata baziranih na genetskom ili proteinskom profilu pacijenata.

1.1.6.3.3.2.11. Autoimunost

Prisustvo malignih stanica aktivira imunološki sustav i dokazano je da karcinom inducira autoimunost na autologne stanične antigene¹²⁵. Mnogi od ciljnih antigena su stanični proteini čija deregulacija ili poremećena ekspresija može voditi u tumorigenezu. Autoantitijela na neke od tih antigena nađeni su u pacijenata s karcinomom pluća. Jedna prospektivna studija istražuje anticiklin B1 serumsko antitijelo kao mogući dijagnostički i prognostički marker u pacijenata uključenih u longitudinalnu studiju karcinoma pluća.

1.1.6.3.3.2.12. Drugi molekularni markeri

Mitohondrijska DNA predložena je u nekim studijama kao mogući biomarker karcinoma pluća. Intrigantna ideja je korištenje markera iz izdahnutog zraka pacijenata s karcinomom pluća koji sadrži različite kisele i aromatske sastojke. Poli i sur. izvješćuju da je mjerenjem kombinacije od 13 hlapljivih organskih sastojaka u izdahu moguća ispravna klasifikacija karcinoma pluća u 80% slučajeva¹²⁶. Wang i sur.¹²⁷ kombiniranjem mnogih DNA markera u plazmi i sputumu pokušavaju povećati osjetljivost i specifičnost dijagnoze karcinoma pluća. Oni su analizirali hipermetilaciju 3 tumor supresorskih gena metilacijskim specifičnim PCR-om i nestabilnost 8 mikrosatelitnih markera analizom gubitka heterozigotnosti (LOH) te analizirali mikrosatelitnu nestabilnost u tkivu tumora i uzorcima sputuma 79 pacijenata s karcinomom pluća. Istaknuli su sedam biomarkera kao najosjetljivijom i najspecifičnijom kombinacijom markera za dijagnozu karcinoma pluća: gubitak heterozigotnosti D9S286, D9S942, GATA49D12 i D13S170, mikrosatelitnu nestabilnost D9S942, metilaciju p16(INK4a) i RAR β iz sputuma. Najnovije studije o prisutnosti humanog papiloma virusa u karcinomima pluća sugeriraju da se može razmišljati da bi taj virus mogao biti drugi najvažniji uzročnik karcinoma pluća nakon pušenja cigareta, te su takvi rezultati snažan motiv za daljnja istraživanja⁸. Treba napomenuti da je trenutno najšire prihvaćen biomarker za karcinome pločastih stanica glave i vrata upravo status visoko rizičnih tipova humanog papiloma virusa¹²⁸.

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Hipoteza ovog rada je da se lužnatom lizom stanica bez dodatnog pročišćenja može dobiti dovoljno kvalitetna DNA za gensku dijagnostiku lančanom reakcijom polimeraze.

Prema navedenoj hipotezi glavni cilj ovog istraživanja je uspostaviti alat za analizu DNA bolesnika kod kojih se vrši bronhoskopska pretraga i uzimanje citoloških uzoraka iz aspirata bronha pri kojima bi se uzorci DNA uzimali na najjednostavniji mogući način, bez dodatnog opterećivanja pacijenata. Isti ili sličan postupak trebao bi se primijeniti za dobivanje kontrolne DNA iz uzoraka koji nisu zahvaćeni patološkim procesom (bris sluznice obraza i vjeđa). Dodatni cilj istraživanja je provjeriti pouzdanost postupka određivanjem spolnih kromosoma pacijenata metodom lančane reakcije polimerazom, te uzorke izolirane DNA upotrijebiti u provjeri prevalencije visokorizičnih tipova humanog papiloma virusa (tip 16, 18 i 33) u bolesnika s karcinomom pluća dijagnosticiranih u našoj ustanovi.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- uspostaviti postupak izolacije DNA iz tri izvora (aspirata bronha, brisa bukalne i vjeđne sluznice) i provjeriti kvalitetu izolirane DNA određivanjem spola ispitanika.
- uspostaviti metodu dokazivanja tri visokorizična tipa HPV-a PCR metodom u datim uzorcima.
- izvršiti citomorfološku analizu bronhoskopskih uzoraka i usporediti citomorfološku dijagnozu s nalazom HPV-a.

- usporediti nalaz HPV-a u tri različita uzorka svakog pacijenta (aspirat bronha, bris bukalne sluznice, bris vjeđe).
- korelirati prevalenciju HPV-a naše hrvatske populacije bolesnika s karcinomom pluća s ostalima u svijetu

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci stanica

Ispitanici su bili pacijenti Klinike za plućne bolesti Jordanovac upućeni na bronhoskopski pregled zbog radiološki utvrđenog infiltrata na plućima u razdoblju od 2007.-2008. godine. Od njih 139, citološkom analizom utvrđeno je 84 sa karcinomom pluća. Svi pacijenti su prije bronhoskopskog pregleda potpisali informativni pristanak za sudjelovanje u studiji. Studija je odobrena od strane etičkog povjerenstva Klinike za plućne bolesti Jordanovac i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Anamnestički podaci prikupljeni iz povijesti bolesti bili su: dob, spol, pušačke navike koje su bile izražene brojem kutija/godina (engl. pack/years) koji pokazuje broj popušanih cigareta na dan te duljinu pušenja. Izračunava se tako da se broj popušanih cigareta dnevno pomnoži sa brojem godina pušenja te se umnožak podijeli sa 20.

Bronhoskopski pregled učinjen je prema standardnoj kliničkoj proceduri sa fleksibilnim fiberoptičkim bronhoskopom kojim pulmolog prikuplja tekući sadržaj sa endobronhalne lezije. Brisevi bukalne i vjeđne sluznice uzimane su simultano, neposredno prije bronhoskopije, i predstavljali su kontrolne uzorke DNA. Uzorci bukalne sluznice uzeti su s jedne unutarnje strane obraza, a uzorci vjeđne sluznice s jedne unutarnje strane donje vjeđe, nježno pomoću štapića s vatom. Štapići sa stanicama bukalne i vjeđne sluznice odmah su uronjeni u 2 ml fiziološke otopine (0,9% NaCl) u sterilnoj epruveti. Dolaskom u citološki laboratorij, aspirati bronha su najprije obrađeni za dijagnostičke rutinske svrhe. Uzorci su centrifugirani, i od dijela istaloženih stanica s ostatkom tekućeg sadržaja učinjeni su konvencionalni citološki razmazi. Fiksirani su sušenjem na zraku, te obojeni metodom po May-Grünwald-

Giemsi, te analizirani od strane specijaliste kliničke citologije. Citološki uzorci svrstani su u četiri kategorije:

1. normalan nalaz
2. atipija na epitelnim stanicama
3. suspektno na karcinom
4. karcinom

Prema klasifikaciji karcinoma pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2003. godine postoje četiri osnovne kategorije karcinoma: karcinom pločastih stanica, karcinom žlijezdanih stanica, karcinom velikih stanica i karcinom malih stanica. Kako je, samo na osnovi citoloških uzoraka, ponekad nemoguće odrediti točan histološki tip karcinoma, karcinomi pluća klasificirani su prema kliničkoj podjeli u karcinome ne-malih stanica (u koje ulaze karcinom pločastih stanica, adenokarcinom i karcinom velikih stanica) i karcinome malih stanica.

Ostatni materijal aspirata bronha, zajedno s brisevima bukalne i vjeđne sluznice transportiran je u Laboratorij za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U prvih 63 ispitanika iz izolirane DNA određivao se genetski spol metodom lančane reakcije polimerazom kako bi se provjerila pouzdanost metode i mogućnost provedbe cijelog postupka u kliničkim uvjetima. Od 139 ispitanika u 84 je ustanovljen karcinom pluća na osnovi citološkog uzorka aspirata bronha te je njima određivano prisutvo DNA visokorizičnih tipova humanog papiloma virusa tipa 16, 18 i 33 u sva tri uzorka (aspiratu bronha, brisu bukalne sluznice i brisu vjeđe) metodom lančane reakcije polimeraze.

3.2. Izolacija DNA

Uzorci sakupljeni kroz dva dana, čuvani na sobnoj temperaturi, procesuirani su zajedno popodne drugog dana. Epruvete sa štapićima s uzorcima briseva bukalne i

vjeđne sluznice nekoliko su puta vorteksirani (miješani na laboratorijskoj mješalici), štapići s vatom su zatim pažljivo ocijeđeni od viška tekućine uza zid epruvete i odbačeni. Tekućina sa stanicama preseljena je u mikroepuvete i centrifugirana 8 minuta u mikrocentrifugi na maksimalnoj brzini (14000 okretaja/min). Supernatant je odstranjen, a stanice su ostavljene na dnu. Stanice su resuspendirane u 30 μ l (za uzorke briseva) ili u 75 μ l (za uzorak aspirata bronha; veći volumen je potreban zbog veće količine uzorka u toj proceduri) mješavine lužine 25 mM NaOH i 0,2 mM EDTA te inkubirane 10 minuta na 98°C. Nakon toga uzorci su vorteksirani i inkubirani 10 minuta na 98°C, nakon čega je slijedilo hlađenje 2 minute na ledu. Konačno, neutralizirajuća otopina s 40 mM TrisCl (pH 5.0) dodana je svakom uzorku, istog volumena, kao što je bio početni volumen za lizu lužinom. To je odgovaralo 30 μ l neutralizirajuće otopine korištene za uzorak briseva i 75 μ l korištenih za uzorak aspirata bronha, čineći ukupni uzorak od 60, odnosno 150 μ l, otopine DNA spremne za PCR, pospremljene na 4°C. Koncentracija DNA i njena čistoća provjerena je spektrofotometrom Nanodrop 1000.

3.3. Određivanje genetskog spola lančanom reakcijom polimeraze (PCR metodom)

Izolirana DNA korištena je za određivanje genetskog spola PCR metodom. Metoda se zasniva na prisustvu amelogenin gena (AMEL) na X i Y kromosomu (AMELX i AMELY). AMELY sadži malu deleciju na prvom intronu koja se koristi za razlikovanje sekvenci X i Y kromosoma¹²⁹. Korištne su tri početnice SexX (5'-TCTCCTATACCACTTAGTCACT), SexY (5'-GCCCAAAGTTAGTAATTTTACCT) i SexCommon (5'-CAGCTTCCCAGTTTAAGCTCT), što je omogućilo amplifikaciju 330bp PCR produkta sa X kromosoma i 218 bp sa Y kromosoma.

3.4. Detekcija i tipizacija DNA HPV-a

DNA humanog papilom virusa tipova 16, 18 i 33 umnožena je specifičnim početnicama za E6 regiju kako bi se identificirali HPV subtipovi. Prednje početnice zajedničke za HPV 16, 18 i 33 su AAGGGCGTAACCGAAATCGGT. Obrnute početnice za HPV 16, 18 i 33 su GTTTGCAGCTCTGTGCATA, GTGTTTCAGTTCCGTGCACA i GTCTCCAATGCTTGGCACA amplificirajući 140 bp produkt za HPV tip 16 i 18, te 141 bp za HPV tip 33¹³⁰. Završni PCR produkt analiziran je pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. Pozitivna kontrola bio je uzorak HPV-a s cerviksa žene pozitivan na HPV 16, 18 i 33 dobiven iz dijagnostičkog laboratorija Klinike za infektivne bolesti Fran Mihaljević. Za PCR metodu koristili smo 1 μl gore opisane otopine DNA pripremljene za PCR, u 25 μl ukupnog volumena za reakcije koja sadrži Go Taq polimerazu (Promega 0,625 jedinica), mješavinu deoksinukleotida (200 μM), početnice (400 nM), MgCl₂ (2 mM), 5x Green Buffer (Promega) koji već sadrži boju i sterilnu vodu. Korištene temperature bile su za denaturaciju na 94°C kroz 5 minuta, nakon čega je slijedilo 38 ciklusa denaturacije na 94°C kroz 30 sekundi, komplementarno sparivanje početnica na 50°C kroz 30 sekundi, ekstenzija DNA lanaca na 72°C kroz 60 sekundi, te poslije završenih ciklusa završna ekstenzija na 72°C kroz 7 minuta. Rezultati su vizualizirani koristeći elektroforezu u 1,5% agaroznom gelu, a veličina produkata određena je korištenjem 50 i 100 bp DNA biljega veličina.

3.5. Statistička analiza

Rezultati vezani za ispitanike kao što su dob i pušačke navike prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD).

Ispitali smo uspješnost naše metode izolacije DNA određivanjem spolnih kromosoma ispitanika metodom lančane reakcije polimeraze. Metodu smo testirali na tri uzorka (bris vjeđe i bukalne sluznice te aspirat bronha) svih 63 ispitanika: 45

muškaraca i 18 žena. Za ispitivanu metodu izračunavali smo kvantitativne pokazatelje dijagnostičke točnosti: dijagnostičku osjetljivost i specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost te dijagnostičku učinkovitost (točnost).

4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirano je 139 pacijenata od kojih je u njih 84 citološki dijagnosticiran karcinom pluća: u 64 muškaraca i 20 žena u dobi od 46 do 85 godina (srednja vrijednost 64,35+7,73 godina). 73 su pušači (srednja vrijednost broja kutija/godina 64,35+36,94), dok je 11 nepušača.

Citološkom analizom ustanovljeno je 66 slučajeva karcinoma ne-malih stanica (38 karcinoma pločastih stanica, 14 karcinoma žljezdanih stanica i 12 slabo diferenciranih karcinoma ne-malih stanica), 14 karcinoma malih stanica, i 4 miješana tipa karcinoma (malih i ne-malih stanica).

4.1. Uspostavljanje postupka izolacije DNA iz tri izvora i provjera kvalitete izolirane DNA određivanjem spola ispitanika

Kako je DNA prisutna u svakom uzorku koji sadrži stanice s jezgrom, prisustvo inhibitora daljnjih enzimatskih reakcija smatra se glavnom preprekom za uspješnu analizu DNA, prvenstveno njezinu amplifikaciju PCR metodom. Prisustvo različitih staničnih produkata i komponenata međustanične tvari degradira DNA ili inhibira Taq polimerazu¹³¹. Dodatni koraci DNA ekstrakcije i pročišćavanja korištenjem različitih alkoholnih otopina i/ili fenola/kloroforma uobičajeni su tijekom DNA izolacije¹³². DNA se može da izolirati korištenjem komercijalnih kitova¹³³ ili složenijim postupcima koji uključuju posebnu opremu za sakupljanje uzoraka¹³⁴, proteinazu K i/ili fenol/kloroform ekstrakciju¹³⁵. To predstavlja značajno i financijsko i radno opterećenje, posebno u laboratorijima za genotipiziranje većeg broja različitih uzoraka, stoga je svako pojednostavljenje procedure dobro došlo.

Naša metoda izolacije DNA temelji se na lizi stanica lužinom i već je korištena na ljudima¹³⁶ i miševima^{132,137} (tablica 6) što nam je predstavljalo početnu točku za pokušaj dizajniranja novog, jednostavnijeg protokola koji bi se koristio u obradi

rutinskih citoloških uzoraka aspirata bronha uzetih prilikom bronhoskopskog pregleda.

Tablica 6. Postupak izolacije DNA iz sluznice obraza miša (Mitrečić i sur.¹³²)

-
1. Uzimanje brisa sluznice jednog obraza miša
 2. Uranjanje štapića s vatom u 70µl sterilne fiziološke otopine (0.9% NaCl)
 3. Brzo miješanje na laboratorijskoj mješalici zajedno s šapićima s vatom
 4. Odbacivanje štapića s vatom
 5. Centrifugiranje 8 minuta na maksimalnoj brzini
 6. Uklanjanje supernatanta ostavljajući stanice na dnu
 7. Resuspenzija na 30µl lužnate otopine (25 mM NaOH i 0.2 mM EDTA)
 8. Inkubacija 20 min na 65°C
 9. Miješanje na laboratorijskoj mješalici i inkubacija 8 min na 98°C (2x)
 10. Hlađenje 2 min na ledu
 11. Dodavanje 30 µl neutralizirajuće otopine (40 mM Tris-Cl, pH 5.0)
 12. Korištenje 1–2 µl uzorka za PCR
-

Za uzorke, koji bi poslužili kao reprezentativni uzorci pacijentove DNA, s područja koje nije zahvaćeno lokalnim patološkim procesom, izabrali smo uzorak brisa bukalne sluznice. Međutim, kako on može biti pod utjecajem inhalacijskih karcinogena (kao što je cigaretni dim), uzorak brisa sluznice vjeđe poslužio nam je kao dodatni izvor za izolaciju DNA.

Naš protokol zasniva se na sakupljanju stanica u fiziološkoj otopini što je bolje nego u sterilnoj vodi¹³⁷ jer potiče da se epitelne stanice oštete i raspadnu u hipotoničnoj otopini te da DNA izađe iz stanice. Slijedi jednostavna liza stanica lužinom na dvije temperature. Kako našom metodom uspijevamo sakupiti dovoljno stanica nije nam potrebna posebna oprema ili dodatno uzimanje uzorka tkiva koje može dovesti do njegova oštećenja¹³⁴. Kako bi se što veći broj stanica raspao u većem uzorku bronhalnog aspirata povećali smo količinu lužine na 7 µl, u odnosu na briseve ili metodu korištenu na mišjim uzorcima gdje se resuspenzija vrši na 30µl lužnate otopine¹³². Naši humani uzorci aspirata bronha bili su veći, a centrifugiranjem nismo bili u mogućnosti potpuno ukloniti fiziološku otopinu koja

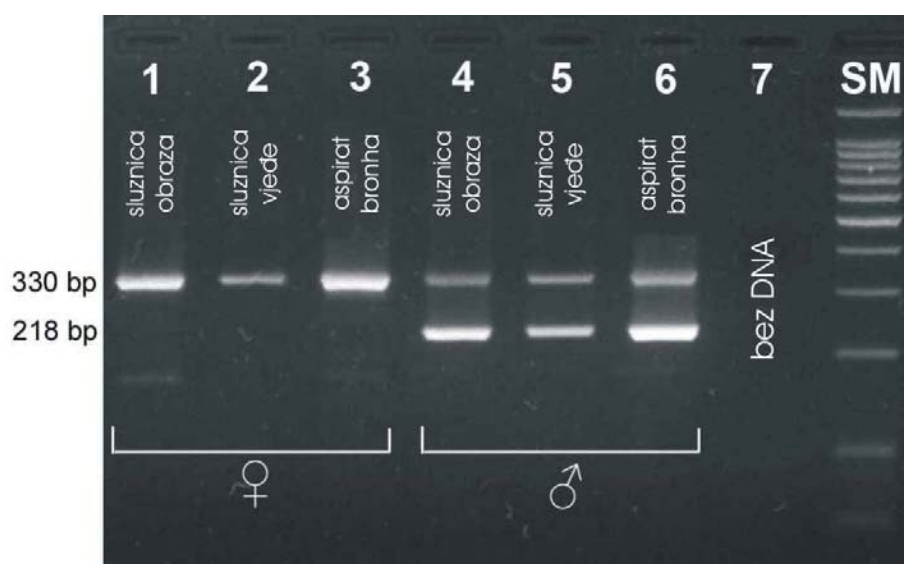
bi tako razrijedila ionako preslabu otopinu lužine. Zato smo povećali količinu otopine lužine za suspenziju, za uzorke aspirata bronha, na 75 μ l. Inkubacija u dva koraka pokazala se presudna u ovoj proceduri jer je postigla bolji rezultat nego grijanje na jednoj ili na dvije različite temperature¹³². Odbacili smo grijanje na 65°C, kakvo je korišteno na mišjim uzorcima¹³², jer nije rezultiralo razaranjem stanica niti kvalitetnom DNA. Produžili smo grijanje na temperaturi od 98°C sa 8 minuta na 10 minuta čime je vjerojatno postignuta koagulacija više proteina i dodatno pucanje stanične membrane. Za vrijeme drugog grijanja na temperaturi od 98°C kombiniranog s hlađenjem na ledu i miješanjem na laboratorijskoj mješalici (vorteksiranjem), završava prekid staničnih membrana i koagulacija mogućih inhibitornih molekula bez smanjivanja konačne količine izolirane DNA. Pretpostavljamo da enzimi, zbog djelovanja temperature, budu inaktivirani prije kompletne lize stanica što ih također sprječava da oštete otpuštenu DNA. Tako dobivamo očuvanu DNA, koja je izašla iz stanice i postala prikladna za daljnju analizu. Dobivene uzorke DNA ostavljali smo u malim Eppendorf epruvetama, koje su se koristile u PCR mašini, jer je iskustvo pokazalo da se sprječava moguće zagađenje uzoraka. Svako prebacivanje u nove epruvete nosi sa sobom rizik od zagađenja, pogotovo s DNA iz drugih uzoraka, koja može potom biti otkrivena vrlo osjetljivim PCR-om, a uzorak krivo dijagnosticiran. Izolirana DNA je stabilnija i trajna i može stajati pohranjena na temperaturi od 4°C dulje vrijeme, tako da je bila uspješno korištena i dvije godine nakon izolacije. U slučaju da uzorak ishlapi, dodavanjem nove sterilne vode, DNA postaje opet dostupna za korištenje.

Tablica 7. Naša metoda izolacije DNA iz aspirata bronha, te briseva sluznice obraza i vjeđe

Brisevi sluznice obraza i vjeđe	Aspirati bronha
Uzimanje briseva sluznice obraza i vjeđe s štapićem s vatom	Sakupljanje tekućine sa endobronhalne lezije s pomoću aspiracije
Uranjanje štapića a vatom u 2 ml sterilne fiziološke otopine (0,9% NaCl) u sterilnu epruvetu	Resuspenzija u 5 ml sterilne fiziološke otopine (0,9% NaCl) u 50 ml sterilnoj epruveti
Miješanje na laboratorijskoj mješalici zajedno s štapićima s vatom	Centrifugiranje na 1500 okretaja/min 3 min
Uklanjanje štapića s vatom	Uklanjanje tekućine ostavljajući stanice na dnu
Centrifugiranje 8 min na maksimalnoj brzini	Priprema konvencionalnih citoloških preparata s inokulirajućom petljom
Uklanjanje tekućine ostavljajući stanice na dnu	Čuvanje peleta stanica za DNA izolaciju
Resuspenzija u 30 µl lužnate otopine (25 mM NaOH i 0,2 mM EDTA)	Resuspenzija u 75 µl lužnate otopine (25 mM NaOH i 0,2 mM EDTA)
<p style="text-align: center;">Inkubacija 10 min na 98°C</p> <p style="text-align: center;">Miješanje na laboratorijskoj mješalici</p> <p style="text-align: center;">Inkubacija 10 min na 98°C</p> <p style="text-align: center;">Hlađenje 2 min na ledu</p>	
Dodavanje 30 µl neutralizirajuće otopine (40 mM Tris-Cl, pH 5,0)	Dodavanje 75 µl neutralizirajuće otopine (40 mM Tris-Cl, pH 5,0)
1–2 µl uzorka korišteno za PCR	

Kako bismo dokazali da je dobivena DNA prikladna za sigurnu i pouzdanu genotipizaciju pomoću PCR-a iz sva tri uzorka (aspirata bronha, brisa bukalne i vjeđne sluznice) izoliranu DNA iskoristili smo za određivanje genetskog spola pacijenata. Određivanje spola baziralo se na određivanju prisustva amelogenin gena na X i Y kromosomu (AMELX i AMELY). AMELY sadrži malu deleciju na prvom intronu što se koristi za razlikovanje sekvence X i Y kromosoma¹²⁹.

U prvih 63 ispitanika kojima je određivan genetski spol iz sva tri uzorka PCR amplifikacija bila je uspješna u svih 188 uzoraka osim jednog uzorka aspirata bronha gdje se nije dobio produkt lančane reakcije polimeraze. Uspješnom amplifikacijom utvrdili smo 45 muškaraca i 18 žena i rezultat se u potpunosti poklapao sa spolom pacijenata u svim uzorcima (slika 1).



Slika 1. Gel elektroforeza PCR produkata dobivenih genotipizacijom uzoraka žena (linije 1-3) i muškaraca (linije 4-6). Linije 1 i 4 dobivene su iz brisa sluznice obraza, 2 i 5 iz uzoraka brisa vjeđne sluznice i 3 i 6 iz uzoraka aspirata bronha; 330 bp fragment je specifičan za X kromosom a 218 bp fragment za Y kromosom. Linija 7 je kontrolna, bez DNA i linija 8 sadrži 100 bp DNA kao marker veličine (SM).

Izračunali smo kvantitativne pokazatelje dijagnostičke točnosti ispitivane metode: dijagnostičku osjetljivost i specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost te dijagnostičku učinkovitost (točnost) (tablica 8.)

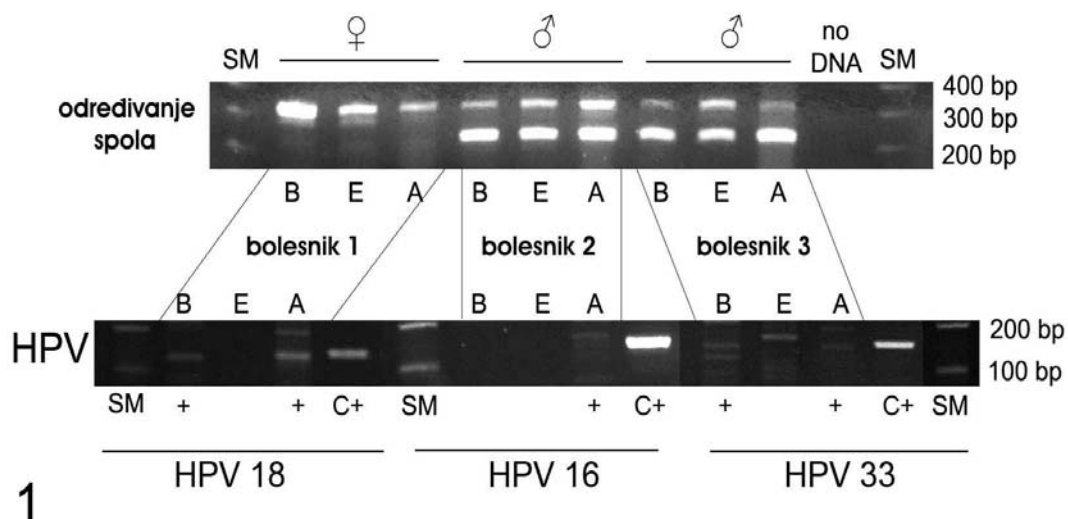
Tablica 8. Kvantitativni pokazatelji dijagnostičke točnosti naše metode izolacije DNA

KVANTITATIVNI POKAZATELJI DIJAGNOSTIČKE TOČNOSTI	%
Dijagnostička osjetljivost	99,25
Dijagnostička specifičnost	100
Pozitivna prediktivna vrijednost	100
Negativna prediktivna vrijednost	98,18
Dijagnostička učinkovitost (točnost)	99,47

4.2. Rezultati uspostave metode dokazivanja tri tipa HPV-a metodom PCR-a u datim uzorcima; usporedba nalaza HPV-a u tri različita uzorka istog pacijenta

Tri uzorka svakog pacijenta s karcinomom pluća, dobivena novom metodom izolacije DNA, podvrgli smo dokazivanju tri visokorizičnih tipova humanog papiloma virusa tipa 16, 18 i 33 PCR metodom.

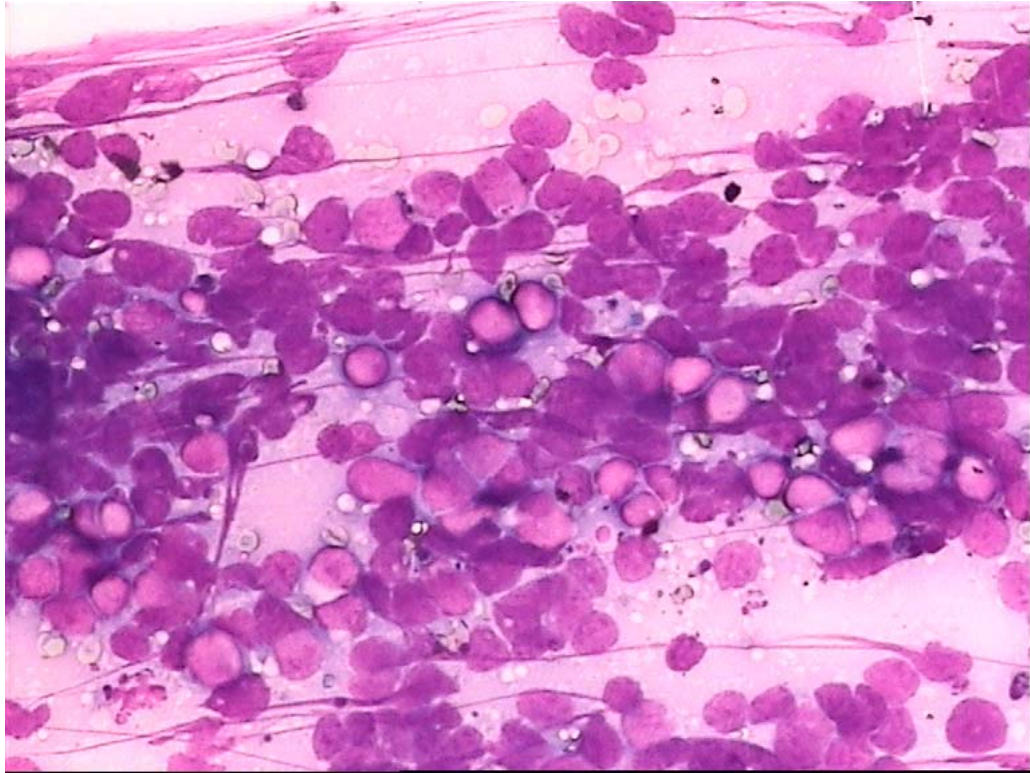
Od 84 testirana pacijenta na prisustvo humanog papiloma virusa samo je tri pacijenta bilo pozitivno metodom lančane reakcije polimeraze. Jedan pacijent bio je HPV tip 16 pozitivan u uzorku aspirata bronha, dok su njegovi uzorci brisa bukalne i vjeđne sluznice bili negativni. Jedna pacijentica bila je HPV tip 18 pozitivna u uzorcima aspirata bronha i brisa bukalne sluznice, dok je uzorak brisa vjeđne sluznice bio negativan. Jedan pacijent bio je HPV tip 33 pozitivan kako u uzorku aspirata bronha tako i u uzorku brisa bukalne sluznice, dok mu je uzorak vjeđne sluznice bio negativan. Svi ostali pacijenti bili su negativni u sva tri uzorka-u uzorku aspirata bronha, brisa bukalne i vjeđne sluznice (slika 2).



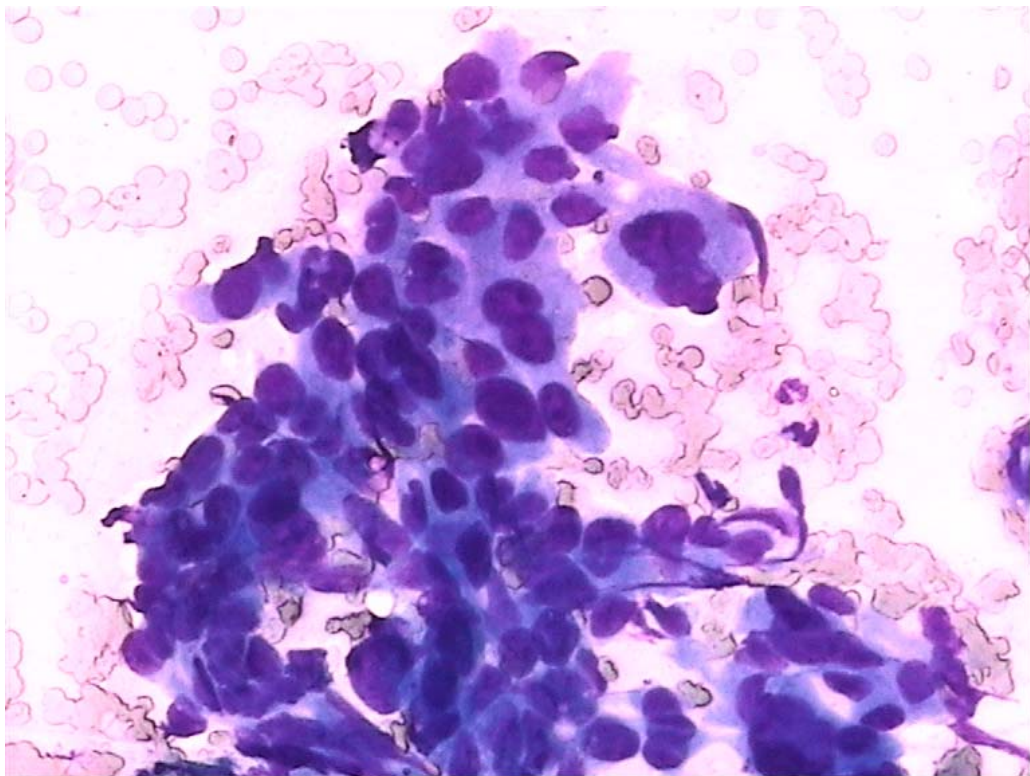
Slika 2. Gel elektroforeza PCR produkata određivanja spola (gornji gel) i detekcije HPV-a (donji gel) dobivenih iz uzoraka izoliranih od pacijenta 1-3. Pacijent 1 je žena HPV tip 18 pozitivna, a pacijenti 2 i 3 su muškarci pozitivni na HPV 16 i HPV 33 (+ označava HPV pozitivne uzorke, C+ pozitivne kontrole dobivene iz uzoraka cerviksa nepovezanih pacijenata). Uzorci su uzeti iz bukalne (B) i vjeđne (E) sluznice i aspirata bronha (A). SM-100 bp DNA kao marker veličine; no DNA - negativna kontrola bez DNA.

4.3. Rezultati citomorfološke analize bronhoskopskih uzoraka aspirata bronha i usporedbe citomorfološke dijagnoze s nalazom HPV-a

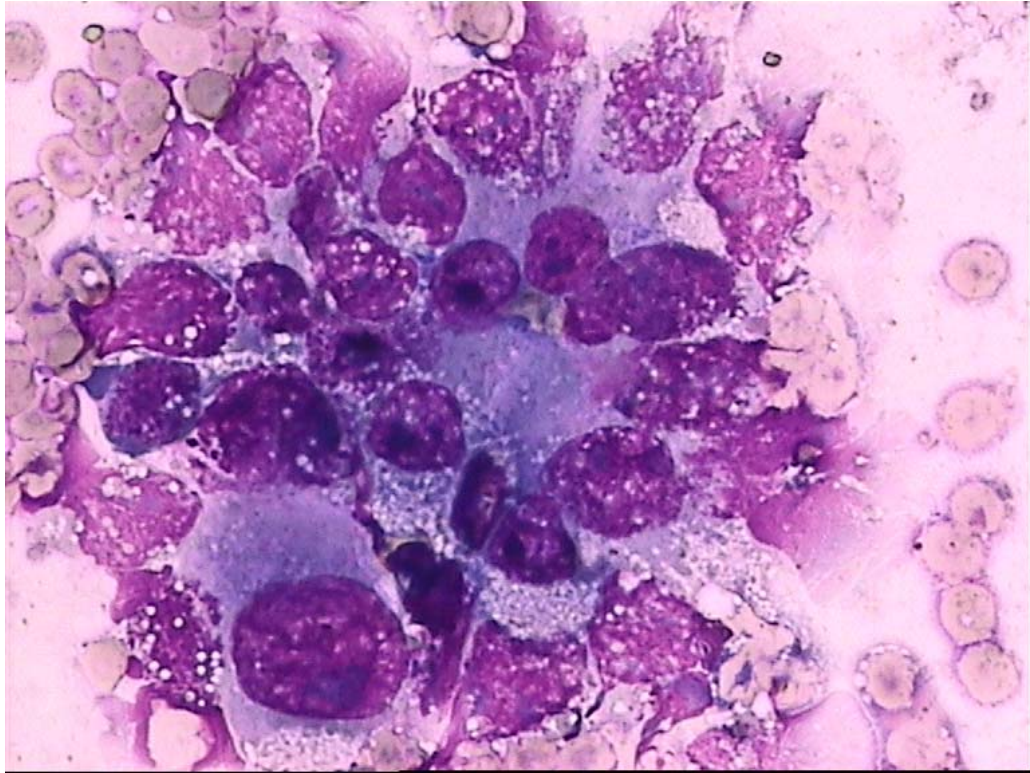
Od 84 testiranih pacijenata samo je tri bilo HPV pozitivno metodom lančane reakcije polimerazom. Uzorak pozitivan na HPV 16 je uzorak 69-godišnjeg muškarca, pušača (100 kutija/godina) sa miješanim karcinomom ne-malih i malih stanica. Uzorak pozitivan na HPV tip 18 pripada 71-godišnjoj pacijentici, pušačici (35 kutija/godina) sa adenokarcinomom. Uzorak pozitivan na HPV tip 33 pripada 72-godišnjem pacijentu, pušaču (125 kutija/godina) s karcinomom ne-malih stanica.



Slika 3. Stanice miješanog tipa karcinoma (malih i ne-malih stanica) pacijenta pozitivnog na tip 16 HPV-a (May-Grünwald-Giemsa bojenje, x 400)



Slika 4. Stanice adenokarcinoma pacijentice pozitivne na tip 18 HPV-a (May-Grünwald-Giemsa bojenje, x 400)



Slika 5. Stanice karcinoma ne-malih stanica pacijenta pozitivnog na tip 33 HPV-a (May-Grünwald-Giemsa, x 400)

5. RASPRAVA

Postoji stalna i sve izraženija potreba da dijagnostičke rezultate na patohistološkim i citološkim uzorcima uspoređujemo i nadograđujemo spoznajama o molekularnim markerima na stanicama karcinoma. U citologiji, DNA za takve analize u dijagnostičke svrhe moguće je dobiti iz različitih izvora, između kojih su i arhivski citološki uzorci.^{90,138,139} Stoga se traži jednostavna i primjenljiva metoda izolacije DNA koja bi se mogla koristiti rutinski, na većem broju pacijenata, usporedno uz prikupljanje citoloških uzoraka pa tako ne bi zahtjevala dodatne dijagnostičke procedure za pacijente. Naš primarni interes bio je analizirati plućne citološke uzorke uzete prilikom bronhoskopskog pregleda. U tu smo svrhu formirali i testirali jednostavan protokol za izolaciju DNA jer su genetičke analize različitih markera potencijalno korisne u otkrivanju preneoplastičnih promjena ili promjena u ranom otkrivanju plućnog karcinoma^{140,141} i mogle bi se uspješno nadograditi na citološku analizu stanica¹⁴². Pri tom je od ključnog značenja jednostavan način dobivanje genomske DNA za uspješnu PCR amplifikaciju. Rutinski korištene metode DNA izolacije uključuju uporabu komercijalnih kitova ili složene procedure lize stanica proteinazom K koju slijedi izopropanol i/ili fenol/kloroform ekstrakcija kao dodatni korak u pročišćavanju DNA. Ova potonja metoda danas se sve više napušta jer koristi kancerogene tvari, dugo traje i zahtijeva uporabu veće količine pribora i kemikalija⁸⁰. Naša metoda, za razliku od većine prijašnjih citopatoloških studija koje su rađene na izolaciji DNA sakupljenih i fiksiranih uzoraka tkiva većinom uklopljenih u parafin¹⁴³, koristi svježije uzorke. Prednost korištenja svježih uzoraka leži u većoj jednostavnosti i efikasnosti izolacije DNA. Neke studije analizirale su utjecaj različitih fiksativa na ekstrakciju DNA i kvalitetu genomske DNA⁹⁰. DNA tijekom postupka izolacije degradira, tj. razbija se u manje fragmente. Tome pridonosi najviše miješanje na laboratorijskoj mješalici (vorteksiranje), opetovana centrifugiranja i pipetiranja kroz uske nastavke. Međutim, takvim se postupcima dobivaju fragmenti dovoljno veliki (100-200kb) za zadovoljavajuće

izvođenje PCR-a i daljnjih analiza. Umnožavanje gena ili dijela gena reakcijom PCR-a na DNA izoliranoj iz parafinskih kocki manje je uspješno od umnožavanja DNA izolirane iz svježeg tkiva. Pohranjivanje DNA iz parafina na dulje vrijeme prije provođenja metode amplifikacije dodatno smanjuje uspješnost. Pohranjivanje ili smrzavanje/odmrzavanje vjerojatno potiče raspadanje DNA. Reakcija PCR-a na ovako izoliranoj DNA uključuje povećani broj amplifikacijskih ciklusa i produljenje koraka komplementarnog sparivanja početnica, te produljenje koraka polimerizacije. Koristili smo svjež materijal, ali se metoda pokazala uspješnom i za materijale stare 2 dana što nam je omogućilo njihovo sakupljanje kroz dva dana te zajedničko procesuiranje drugog dana popodne. Pokazalo se da su citološki uzorci dovoljno bogati epitelnim stanicama, dok je već u početnom uzorku udio međustanične tvari, koja je najčešći inhibitor u metodi lančane reakcije polimeraze, malen⁸⁶.

Dodatni cilj naše metode bio je sakupljanje kontrolne, reprezentativne pacijentove DNA iz nekog drugog područja koje nije zahvaćeno lokalnim patološkim procesom. Zato su simultano, uz bronhoskopski pregled i uzimanje uzoraka aspirata bronha, jednostavnom metodom uzeti i brisevi bukalne sluznice s minimalnim opterećivanjem pacijenata dodatnim postupkom. Kako bukalna sluznica može biti izložena, kao i pluća, inhalatornim kancerogenima, bris sluznice vjeđe uzet je kao dodatni izvor kontrolne DNA. Reprezentativnost uzoraka bukalne sluznice potvrđena je nedavnim studijama koje su je uspoređivale s uzorcima krvi^{144,145} što dovodi do zaključka da bi predloženi protokol mogao naći svoju primjenu kako u analizi citopatoloških uzoraka tako i u epidemiološkim istraživanjima.

Liza lužinom je jednostavna metoda izolacije DNA koja je već testirana na brisevima bukalne sluznice miševa^{132,136,137} i ljudi. Ona se temelji na raspadu stanične membrane i termičkoj denaturaciji što omogućuje neoštećenoj DNA omogućuje da napusti stanicu i da se uspješno koristi za daljnje analize. Ta je metoda uzeta kao polazna točka za adaptaciju korištenja u citologiji. Naš dodatni cilj istraživanja bio je provjera kvalitete izolirane DNA određivanjem spolnih kromosoma pacijenata metodom lančane reakcije polimeraze. Izračunom kvantitativnih pokazatelja dijagnostičke točnosti ispitivane metode u određivanju

spolnih kromosoma ispitanika dobili smo visoke vrijednosti dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti, te dijagnostičke učinkovitosti (točnosti).

Izolate DNA upotrijebili smo i u provjeri prevalencije visokorizičnih tipova humanog papiloma virusa tipa 16, 18 i 33 u bolesnika s citološki dijagnosticiranim karcinomom pluća iz uzoraka aspirata bronha. Od naših 139 obrađena pacijenta u 84 dijagnosticiran je karcinom pluća iz citoloških uzoraka aspirata bronha. Naši rezultati pokazuju vrlo nisku incidenciju visoko rizičnih tipova HPV-a u pacijenata s karcinomom pluća. U najnovijoj studiji o incidenciji HPV-a u patohistološkim uzorcima karcinoma pluća rađenoj na 4508 uzoraka u cijelom svijetu izneseni su vrlo različiti i kontradiktorni rezultati u rasponu od 0-79%⁸. Sve dosadašnje studije rađene su na patohistološkim uzorcima karcinoma. Ovo je prva studija rađena na citološkim bronhoskopskim uzorcima i na hrvatskoj populaciji pacijenata s novom jednostavnom metodom izolacije DNA rađenom na svježim uzorcima koja omogućuje dobivanje DNA, spremne za PCR analizu u manje od sat vremena⁸⁹.

Velike varijacije u studijama o incidenciji HPV-a u karcinomima pluća pokušavaju se objasniti korištenjem različitih vrsta uzoraka (smrznuti, formalin fiksirani ili parafinski uklopljeni), izborom različitih metoda dokazivanja DNA humanog papiloma virusa (in situ hibridizacija-ISH, lančana reakcija polimeraze-PCR, imunohistokemija, Hybrid capture II assay, DNA hibridizacija, Southern Blott), izborom početnica te konačno i geografskim i okolišnim čimbenicima kao što su obrazovanje, ekonomski i vremenski uvjeti koji bi mogli utjecati na dobivene rezultate. Jedna je studija pokazala da Kinezi koji žive u različitim geografskim područjima pokazuju različitu prevalenciju HPV infekcije¹⁴⁶. U većini europskih zemalja (Njemačka 0%, Francuska 2,7%, Turska 5%, Grčka 0%), u Americi (5,9%) i Indiji (5%) prevalencija visoko rizičnih tipova HPV-a u karcinomima pluća je niska¹⁴⁷. Druga studija u Grčkoj pokazuje potpuno suprotan rezultat od 70% HPV pozitivnih karcinoma pluća¹⁴⁸. Daljnje studije pokazuju veće prisustvo HPV infekcije: u sjevernoj Europi i Čileu (29%) stopa HPV infekcije je viša: u Finskoj u 41,7% adenokarcinoma i 28,6% karcinoma pločastih stanica, a u Norveškoj u 49%

karcinoma pluća. Najviša prevalencija HPV infekcije pokazana je u Aziji. U Okinawi, u Japanu HPV infekcija prisutna je u 79% karcinoma pločastih stanica i u 49% adenokarcinoma¹⁴⁹. U Kini je prevalencija HPV 16 26%, a HPV-a 18 23,3% u karcinomima pluća ne-malih stanica¹⁴⁶.

Što se tiče primjenjenih metoda detekcije HPV-a in situ DNA hibridizacija je metoda koja ima prednost lokalizacije stanica unutar tumora na kojima se utvrđuje prisutnost HPV-a ali je njena senzitivnost slabija. Hirayasu i suradnici⁸ svojom studijom iz 1996. godine pokazuju različite rezultate za metodu PCR-a i metodu in situ hibridizacije. Za PCR dobivena je stopa incidencije HPV-a od 79% , a za hibridizaciju 53%. Općenito, potrebna je validacija metoda za dokazivanje HPV-a od strane većeg broja laboratorija i reanaliza uzoraka kako bi se objasnila različitost dobivenih rezultata. Većina studija koristila se PCR metodom, uglavnom koristeći početnice za amplifikaciju DNA HPV-a regije L1, E6 i/ili E7 i E1. Izbor početnica je veoma važan jer ako one ne sadrže prave HPV probe, DNA humanog papiloma virusa se ne može ustanoviti u uzorku premda može biti prisutna¹⁵⁰. Neki su koristili dva seta početnica, neki tzv. „nested PCR“ ili PCR sa specifičnim tipom početnica kako bi poboljšali stupanj detekcije HPV-a. Također je korišten Southern blott ili dot blot nakon PCR-a. Sve ove metode imaju svoja ograničenja, a osjetljivost se smanjuje ako se pokušavaju prepoznati veći fragmenati DNA¹⁵¹.

DNA HPV-a ustanovljena je u histološkim uzorcima svih najčešćih histoloških tipova karcinoma pluća što i ne treba čuditi jer se ovaj virus povezuje i s adenokarcinomom cerviksa¹⁵² ali i s neuroendokrinim karcinomom malih stanica cerviksa koji se morfološki ne može razlikovati od karcinoma malih stanica pluća¹⁵³.

Naši uzorci sadrže normalne stanice i stanice karcinoma tako da nije moguće razlikovati da li je HPV isključivo prisutan u stanicama tumora, ali taj je problem prisutan i u studijama koje su rađene na uzorcima tkiva¹⁴⁶. HPV je opće prisutan i inficira visok postotak ljudi, te je HPV infekcija bila dokazana i u normalnim plućima sa prisustvom DNA HPV-a u pneumocitima i alveolarnim makrofagima^{147,154,155}. Ipak, na ulogu HPV-a u karcinogenezi ukazuju molekularni pokusi u kojima je ekspresija HPV 16/18 E6 onkoproteina u stanicama karcinoma

pluća povezana s inaktivacijom p53¹⁵⁵. Također, potvrđeno je da ovakva genetska preinaka u in vitro uvjetima uzrokuje besmrtnost bronhalnih stanica¹⁴⁶. Kinjo i suradnici tvrde da HPV etiološki nije uključen u razvoj karcinoma pluća iako uzrokuje pločastu metaplaziju u adenokarcinomima¹⁵⁶. Drugo objašnjenje za mali broj virusa može biti tek privremeno prisutan prema teoriji zvanoj „udari i bježi“ (engl. „hit and run“) koja tumači da se DNA virusa može izgubiti nakon transformacije, kao što je pokazano u studijama rađenim na goveđem modelu i kako je sugerirano u HPV 18 onkogenezi¹⁴⁶. Više je studija pokazalo da infekcija HPV-om ne predstavlja puku kolonizaciju epitelnih stanica pluća već virus svojom integracijom u genom stanice domaćina može potaknuti razvoj karcinoma. Ostaje pitanje da li se infekcija HPV-om dogodi prije ili nakon razvoja tumora, odnosno da li se HPV integrira u normalnu stanicu iz koje se kasnije razvija karcinom ili se ta integracija dogodi kasnije u stanice već razvijenog karcinoma. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi potvrdom integracije virusa u stanicama primarnog tumora i stanicama njegovih metastaza dokazala da je ta infekcija uslijedila prije razvoja karcinoma⁸. Dva od tri pacijenta, čiji su uzorci aspirata bronha sadržavali DNA HPV-a, bili su također pozitivni na iste tipove virusa i u brisevima bukalne sluznice. Poznato je da se HPV prenosi direktnim kontaktom preko sluznica¹⁵⁷. Kako u plućima to nije moguće, razmišlja se o prijenosu zrakom ili krvlju. Čini se da bi glukozaminglikani i posebno heparin sulfati mogli biti primarni receptori HPV-a u krvi^{158,159}. Danas se malo zna o oralnoj infekciji HPV-om u općoj populaciji. U nekim studijama koje su rađene na općoj populaciji kao kontrolnoj skupini za karcinome oralne šupljine, prevalencija HPV-a iznosila je od 5-9,2%¹⁴⁹. Studija o prevalenciji HPV-a u karcinomima glave i vrata rađena na 201 karcinoma i 333 kontrolnih ispitanika utvrdila je prisutnost visoko rizičnih tipova HPV-a u 22% karcinoma i 10,8% ispitanika kontrolne skupine. Isti autori tvrde kako infekcija visoko rizičnim tipovima HPV-a odljuštenih stanica dobivenih ispirkom usne šupljine predstavlja rizični faktor za razvoj karcinoma glave i vrata neovisan o konzumaciji alkohola i pušenju cigareta, te kao takva može poslužiti kao biomarker za tu vrstu karcinoma¹⁶⁰. Prisutnost HPV-a tipa 16 dokazana je u 6,3% tkiva tonzila

s prisutnim tonzilitisom i/ili hipertrofijom tonzila i u 0,6% ispitanika kontrolne skupine iste studije u Helsinkiju¹⁶¹ Smith i suradnici u studiji rađenoj na 193 karcinoma oralne šupljine i orofarinksa utvrđuju prisutnost visoko rizičnih tipova HPV-a u 20% karcinoma, te značajno viši postotak visoko rizičnih tipova HPV-a u ispirku usne šupljine pacijenata s HPV pozitivnim karcinomom. Također u istoj studiji, DNA HPV-a tipa 16 ustanovljen je isključivo u stanicama karcinoma ali ne i u okolnom tkivu. Pri tom autori studije navode kako, premda su isti tipovi HPV-a utvđeni u tkivu tumora i u ispirku usne šupljine, nije jasno da li genom visoko rizičnih tipova HPV-a detektiran u eksfoliranim stanicama dolazi iz skrivenih stanica karcinoma u usnoj šupljini ili se virus oslobađa iz susjednih stanica sluznice koje mogu biti permanentno inficirane istim tipom virusa koji je prisutan u karcinomu¹⁶².

HPV je smatran spolno prenosivom bolešću, ali to je stajalište postalo upitnim čestim nalazom HPV-a u djece. Studija Smitha i suradnika objavljena 2007. godine o prevalenciji HPV-a u djece starosti od 2 tjedna do 20 godina ustanovila je najvišu stopu prevalencije u najmlađoj dobnoj skupini (do 1 godine života) od 2,5% i najstarijoj dobnoj skupini (od 16. do 20. godine) od 3,3%¹⁶³. Prevalencija HPV-a u djece u skupini od 3 i 5 godina u studiji rađenoj 2003. godine u Japanu iznosila je 45,2% za djecu od 3 godine i 50% za djecu od 5 godina¹⁶⁴. Za razliku od genitalnog trakta, priroda oralne infekcije HPV-om je slabo istražena¹⁶⁵. HPV se također može prenijeti i nespolnim kontaktom uključujući i uobičajeni fizički kontakt i perinatalnim vertikalnim prijenosom¹⁶⁶. Neki drugi autori tvrde da je oralna šupljina značajan rezervoar HPV infekcije koji ne mora biti potpuno neovisan o rezervoaru u cerviksu¹⁶⁷. Prevalencija HPV 16/18 dokazana je i u krvnoj cirkulaciji pacijenata s karcinomom pluća gdje je bila značajno viša nego u kontrolnoj grupi pacijenata. Još uvijek je put ulaska i opstanka HPV-a u krvi enigma¹⁶⁸. Svi HPV pozitivni pacijenti s karcinomom pluća naše studije su pušači. Postavlja se pitanje koliki je stvarni udio samog humanog papiloma virusa u kancerogenezi karcinoma pluća ili kakav je eventualni zajednički utjecaj drugih čimbenika, kao što je pušenje cigareta ili konzumacija alkohola, i HPV-a na razvoj karcinoma pluća. Smith i suradnici u svojoj studiji o karcinomima glave i vrata utvrdili su statistički značajan

sinergistički efekt između ustanovljenog visoko rizičnog tipa HPV-a u stanicama karcinoma i povećane konzumacije alkohola, te aditivni efekt između HPV-a i pušenja cigareta¹⁶⁰. Svakako su potrebna daljnja istraživanja o prisustvu visoko rizičnih tipova humanog papiloma virusa u stanicama karcinoma pluća većeg broja nepušača kako bi se jasnije utvrdio efekt samog virusa u razvoju karcinoma pluća.

Stanice korištene za izolaciju DNA odgovaraju stanicama koje su se citomorfološki analizirale, ali ovi uzorci predstavljaju mješavinu stanica zahvaćenih i nezahvaćenih patološkim procesom. U analizi stanica karcinoma pluća ta heterogenost uzorka ne bi trebala smetati u detekciji karcinom-specifičnih molekularnih markera jer čak i mali karcinomi se ljušte i njihove stanice su stoga dostupne i za citološku analizu i za izolaciju DNA¹⁶⁹. Ako bi stanice karcinoma bile morfološki identificirane u citološkim uzorcima tada bi se i njihova DNA trebala amplificirati PCR metodom. Ipak, postoje situacije kada takva heterogenost stanica može smetati u interpretaciji rezultata što je slučaj u analizi gubitka heterozigotnosti (engl. loss of heterozygosity - LOH) gdje normalne stanice mogu zamaskirati rezultate relevantne za karcinom.

Snažan razvoj radioloških (slikovnih) tehnika i sve boljih bronhoskopskih metoda omogućuju otkrivanje vrlo malih i ranih patoloških procesa bronha i pluća koji zahtijevaju adekvatnu morfološku dijagnozu od strane citopatologa koji bivaju pritisknuti zadatkom postavljanja definitivne dijagnoze na malom uzorku s mogućim artefaktima nastalim procesuiranjem uzoraka. Stoga je jasan sve veći interes otkrivanja molekularnih biomarkera karcinoma pluća koji bi pripomogli morfološkim metodama u što ranijem i točnijem definiranju tih patoloških procesa. S druge strane, provedba ciljane terapije karcinoma ne-malih stanica pluća sve je prisutnija uz kirurgiju i konvencionalnu kemoterapiju, za koju je neophodna točna dijagnoza histološkog tipa karcinoma¹⁷⁰ i identifikacija onih tumora koji će reagirati na takvu ciljanu terapiju lijekovima inhibitorima receptora tirozin kinaze epidermalnog faktora rasta. Tako citopatolog, uz kliničku/molekularnu korelaciju odrađuje važnu ulogu u odabiru pacijenata kandidata za ciljanu terapiju inhibitorima tirozin kinaze¹⁷¹. Gen za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) i v-Ki-ras 2

(viral Kirsten rat sarcoma 2 oncogene homolog, KRAS) su onkogeni, i na osnovi brojnih studija, smatraju se prediktorima odgovora karcinoma ne-malih stanica pluća na EGFR ciljanu terapiju¹⁷². Terapijski odgovor na inhibitore tirozin kinaze najbolji je u adenokarcinomima sa somatskim mutacijama u eksonima 18-21 tirozin kinaza domene epidermalnog faktora rasta¹⁷¹, dok mutacija KRAS onkogeni predstavlja negativan prognostički faktor i loš odgovor na ciljanu terapiju. Testiranje statusa gena za receptor epidermalnog faktora rasta i KRAS onkogeni u karcinomima pluća uključuje različite metode, kao što su PCR metoda za određivanje mutacije njihove DNA, te metoda FISH-e i imunohisto/citokemije za uvid u ekspresiju tih onkogeni. Standardizacija metoda i kriteriji za njihovu interpretaciju još nisu dogovoreni, kao ni tip uzorka koji bi bio najoptimalniji za analizu – kirurški ili citološki, te da li koristiti uzorak primarnog tumorskog procesa i/ili njegove metastaze¹⁷². Rutinski citološki uzorci uzeti prilikom bronhoskopskog pregleda kao što je aspirat bronha^{104,105,173}, i bronhoalveolarni lavat⁹⁶ te pleuralni izljev ili citološki punktati tankom iglom^{172,175} pokazali su se kao adekvatni, sa dovoljnim brojem stanica za DNA sekvencioniranje EGFR i KRAS onkogeni. Unatoč značajnom razvoju ciljane terapije u uznapredovalim karcinomima ne-malih stanica pluća, još uvijek nije postignut napredak u preživljavanju tih pacijenata. Razlozi za to mogu biti razvoj primarne i sekundarne rezistencije na terapiju, odabir bioloških metoda koje se koriste u selektiranju pacijenata za ciljanu terapiju te u činjenici da molekularni status onkogeni epidermalnog faktora rasta možda nije najvažniji prognostički čimbenik u odabiru pacijenata za ciljanu terapiju inhibitorima tirozin kinaze¹⁷⁵. Razumijevanje međusobnog djelovanja inhibitora receptora epidermalnog faktora rasta i drugih molekula bit će presudno u razvoju učinkovitijih terapijskih postupaka i predstavlja novo polje istraživanja i izazov u budućnosti u kojem naša metoda izolacije može naći svoje mjesto.

6. ZAKLJUČAK

U ovoj je studiji prezentirana inovativna primjena metode izolacije DNA u svrhu njenog korištenja za dijagnostičke postupke lančanom reakcijom polimeraze iz rutinskih citoloških uzoraka aspirata bronha te briseva bukalne i vjedačne sluznice. Njezine glavne prednosti u odnosu na druge metode izolacije su neinvazivni pristup, jednostavnost i kratkoća trajanja same procedure, upotreba jednostavnih kemikalija i visok postotak uspješnosti daljnjeg postupka lančane reakcije polimeraze.

Naši rezultati na 84 pacijenata s karcinomom pluća ukazuju da je samo kod tri pacijenta u uzorku aspirata bronha ustanovljen humani papiloma virus. Takvi rezultati sugeriraju da visoko rizični tipovi humanog papiloma virusa tipa 16, 18 i 33 najvjerojatnije nemaju značajniju ulogu u nastanku karcinoma pluća u Hrvatskoj, što odgovara rezultatima istraživanja i u nekim drugim europskim zemljama. Sva ta tri HPV pozitivna pacijenta bili su pušači, a u dvoje njih je isti tip HPV-a ustanovljen i u brisu bukalne sluznice. Svakako su potrebna daljnja istraživanja na većem broju pacijenata s karcinomom pluća kako bi se što točnije odredila uloga humanog papiloma virusa u nastanku karcinoma pluća.

7. SAŽETAK

Tek je mali broj radova objavljen o izolaciji DNA iz rutinskih citoloških uzoraka. Neupitan nedostatak većine metoda izolacije DNA je u složenosti postupka koji uključuje obvezatno dodatno pročišćavanje DNA. U ovom radu uspostavljen je inovativni jednostavni protokol za izolaciju humane DNA iz rutinskih citoloških uzoraka vezanih za karcinom pluća kao što je aspirat bronha, te iz briseva bukalne i vjeđne sluznice. Pokazali smo da je kombinacijom lužnate i temperaturne lize moguće izolirati DNA adekvatnu za metodu lančane reakcije polimeraze (PCR) u manje od sat vremena. Testiranje metode amplifikacijom fragmenata spolnih kromosoma pokazalo je da je metoda efikasna i pouzdana. Prezentirani protokol omogućuje očuvanje visoko kvalitetene DNA prikladne za dijagnostičke postupke koji se osnivaju na lančanoj reakciji polimerazom.

Osim dobro poznate uloge u razvoju karcinoma cerviksa, postoje naznake da bi HPV mogao imati ulogu i u kancerogenezi karcinoma pluća. U rutinskim citološkim uzorcima aspirata bronha 84 pacijenata s karcinomom pluća izolirana je DNA te se utvrđivala prisutnost visoko rizičnih tipova humanog papiloma virusa tipa 16, 18 i 33 metodom lančane reakcije polimeraze. Rezultate smo uspoređivali s onima iz uzoraka briseva bukalne i vjeđne sluznice istih pacijenata. Samo su tri pacijenta bila HPV pozitivna u uzorcima aspirata bronha: jedan je bio HPV tip 16 pozitivan, jedan HPV tip 18, a jedan HPV tip 33 pozitivan. Pacijenti pozitivni na tip 18 i 33 HPV-a bili su pozitivni na iste tipove virusa i u uzorcima brisa bukalne sluznice. Svih 84 pacijenata bilo je HPV negativno u uzorcima briseva vjeđne sluznice. Naši rezultati svjedoče o niskoj prevalenciji HPV-a u pacijenata s karcinomom pluća u Hrvatskoj, što se podudara s rezultatima nekih drugih europskih zemalja i govori u prilog tome da je vjerojatnije da HPV nema veću ulogu u razvoju karcinoma pluća ove zemljopisne regije.

8. ABSTRACT

There are only a few systematic reports about DNA extraction from routine diagnostic cytological specimens. An inevitable drawback of such techniques is obligatory DNA purification. In our study, a simple protocol is implemented for human DNA isolation from cytological specimens related to lung cancer, like bronchial aspirates and samples collected by swabbing of the inner cheek and eyelid. By combining alkaline and temperature lyses it was possible to isolate DNA solution ready for PCR in less than an hour. Testing the method used for amplification of sex chromatin gene fragments showed that it is highly efficient and reliable. The presented protocol preserves high-quality DNA that is suitable for diagnostic procedures based on PCR methods. Besides its well-known role in cervical carcinoma, HPV is also suggested to be involved in lung cancer development. We have used routine bronchial aspirates from 84 patients with lung carcinoma for DNA extraction and then performed polymerase chain reaction for high-risk HPV types 16, 18 and 33. The results were compared to those obtained from buccal and eyelid mucosa. Only three patients were positive for HPV in bronchial aspirates: one for HPV 16 type, one for HPV 18 type, and one for HPV 33. Patients HPV 18 and HPV 33 positive had also HPV positive sample of buccal mucosa. All 84 patients were HPV negative in eyelid mucosa samples. Our data indicated the low prevalence of HPV in patients with lung carcinomas in Croatia, similar to some other European countries, therefore it seems unlikely that HPV contributes to the development of lung carcinomas in this region.

9. LITERATURA

1. Lantuejoul S, Brambilla E. Prognostic biomarkers in non-small cell lung carcinoma. *Curr Diagn Pathol* 2006; 2:418-428.
2. Hirsch FR, Franklin WA, Gazdar AF, Bunn PA.Jr. Early Detection of Lung Cancer: Clinical Perspectives of Recent Advances in Biology and Radiology. *Clin Cancer Res* 2001;7:5-22.
3. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2006. godinu: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zagreb, 2007.
4. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung carcinoma. *Chest* 2003;123:21S-49S.
5. Copeman PW, Cowell TK, Dallas NL. Lung cancer and smoking. *Lancet* 1964;18:1374-5.
6. Edinburg Lung Cancer Group. Patients presenting with lung cancer in south east Scotland. *Thorax* 1987;42(11):853-7.
7. Syrjänen KJ. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:885-891.
8. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer* 2009;65:13-18.
9. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, et al. Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, IARC, 2004.
10. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer* 1995;75:191-202.
11. Huq S, Maghfoor I, Perry M. Lung Cancer, Non-Small Cell. *E medicine.medscape.com* updated Jul 30, 2009.
12. Bunn PA, Kelly K. New combinations in the treatment of lung cancer. *Chest* 2000;117:138S-143S.
13. Deslauriers J, Gregoire J. Surgical therapy of early non-small cell lung cancer. *Chest* 2000;117:104S-109S.
14. Yoshino I, Baba H, Fukuyama S, Kameyama T, Shikada Y, Tomiyasu M, Suemitsu R. A time trend of profile and surgical results in 1123 patients with non-small lung cancer. *Surgery* 2002;131:S242-8.

15. Padilla J, Calvo V, Penalver JC, Sales G, Morcillo A. Surgical results and prognostic factors in early non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1997;63:324-6.
16. Sakao Y, Nakazono T, Sakuragi T, Natsuaki M, Itoh T. Predictive factors for survival in surgically resected clinical IA peripheral adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1157-62.
17. Jassem J, Skokowski J, Dziadziuszko R, Jassem E, Szymanowska A, Rzyman W, Roszkiewicz A. Results of surgical treatment of non-small lung cancer. Validation of the new postoperative pathologic TNM classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:1141-6.
18. Landreneau RJ, Sugarbaker DJ, Mack MJ, Hazelrigg SR, Luketich JD, Fetterman L, Liptay MJ, Bartley S, Boley TM, Keenan RJ, Ferson PF, Weyant RJ, Naunheim KS. Wedge resection versus lobectomy for stage I (T1N0M0) non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:691-700.
19. Elias AD. Small cell lung cancer: State-of-the-art therapy in 1996. *Chest* 1997;112:251S-258S.
20. Port JL, Kent MS, Korst MD, Libby D, Pasmantier M, Altorki NK. Tumor size predicts survival within stage IA non-small cell lung cancer. *Chest* 2003;124:1828-33.
21. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H. Prognosis and survival after resection for bronchogenic carcinoma based on the 1997 TNM-staging classification: the Japanese experience. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1759-64.
22. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111:1710-17.
23. Rami-Porta R. New TNM Classification for Lung Cancer. *Arch Bronconeumol* 2009;45(4):159-161.
24. Greenberg AK, Yee H, Rom WN. Preneoplastic lesions of the lung. *Resp Res* 2002;3:20.
25. Belinsky S. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:707-17.

26. Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene* 1999;18:643-50.
27. Wistuba II, Lam S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1366-73.
28. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res* 2000;60:1949-60.
29. Brambilla E, Gazzeri S, Lantuejoul S, et al. P53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1609-18.
30. Rusch V, Klimstra D, Linkov I, Dmitrovsky E. Abberant expression of p53 of the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia, and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 1995;55:1365-72.
31. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, et al. P53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Ocogene* 1992;7:1989-97.
32. Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, et al. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* 1992;52:6079-82.
33. Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, et al. Abberent promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002;62:2370-77.
34. Lamy A, Sesboue R, Bourguignon J, et al. Aberrant methylation of the CDKN2a/p16INK4a gene promoter region in preinvasive bronchial lesions: a prospective study in high-risk patients without invasive cancer. *Int J Cancer* 2002;100:189-93.
35. Chapman AD, Kerr KM. The association between atypical adenomatous hyperplasia and primary lung cancer. *Br J Cancer* 2000;83:632-6.

36. Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1993;72:432-8.
37. Sakamoto H, Shimizu J, Horio Y, et al. Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. *J Pathol* 2007;212:287-94.
38. Chmara M, Wozniak A, Ochman K, et al. Loss of heterozygosity of chromosomes 3p and 17p in primary non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2004;24:4259-63.
39. Kerr KM, Carey FA, King G, Lamb D. Atypical alveolar hyperplasia: relationship with pulmonary adenocarcinoma, p53 and c-erbB-2 expression. *J Pathol* 1994;174:249-56.
40. Slebos RJ, Baas IO, Clement MJ, et al. P53 alterations in atypical alveolar hyperplasia of the human lung. *Hum Pathol* 1998;29:801-8.
41. Dacic S. Pulmonary Preneoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1073-8.
42. Miller Y.E. Pathogenesis of Lung Carcinoma 100 Year Report. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:216-23.
43. Kent MS, Port JL, Altorki NK. Current state of imaging for lung cancer staging. *Thorac Surg Clin* 2004;14:1-13.
44. Verschakelen JA, Bogaert J, De Wever W. Computed tomography in staging for lung cancer. *Eur Respir J* 2002;35(suppl):40S-48S.
45. Schaefer-Prokop C, Prokop M. New imaging techniques in the treatment guidelines for lung cancer. *Eur Respir J* 2002;19(suppl.35):71S-83S.
46. Verschakelen JA, De Wever W, Bogaert J, Stroobants S. Imaging: staging of lung cancer. *Eur Respir Mon* 2004;214-44.
47. Primack SL, Lee KS, Logan PM, Miller RR, Müller NL. Bronchogenic carcinoma: utility of CT in the evaluation of patients with suspected lesions. *Radiology* 1994;193:795-800.

48. Ladhe S, Paivansalo M, Rainio P. CT for predicting the resectability of lung cancer: a prospective study. *Acta Radiol* 1991;32:449-54.
49. Izbicki J, Thetter O, Karg O. Accuracy of computed tomographic scan and surgical assessment for staging of bronchial carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:413-20.
50. Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer. A review of the current evidence. *Chest* 2003;123(suppl.1):137S-146S.
51. Hyer JD, Silvestri G. Diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med* 2000;21:95-106.
52. Lahde S, Paivansalo M, Rainio P. CT for predicting the resectability of lung cancer: a prospective study. *Acta Radiol* 1991;32:449-54.
53. Yang PC. Ultrasound-guided transthoracic biopsy of the chest. *Radiol Clin North Am* 2000;38:323-43.
54. Mažuranić I, Ivanovi-Herceg Z, Gorečan M, Petrak A, Pongrac I. Interventional, diagnostic and therapeutic use of chest ultrasonography. *Radiol Oncol* 1995;29:279-82.
55. Klein JS, Zarka MA. Transthoracic needle biopsy. *Radiol Clin North Am* 2000;38:235-66.
56. Patel MC, Flower CDR. Radiology in the management of pleural disease. *Eur Radiol* 1996;7:1454-62.
57. Heilo A. US guided transthoracic biopsy. *Eur J Ultrasound* 1996;3:141-51.
58. Görg C, Restrepo I, Schwerek WB. Sonography of malignant pleural effusion. *Eur Radiol* 1997;7:1195-98.
59. Stroobants SG, D'Hoore I, Doooms C, De Leyn PR, Dupont PJ, De Wever W, De Groot T, Verschakelen JA, Mortelmans LA, Vansteenkiste JF. Additional value of whole-body fluorodeoxyglucose positron emission tomography in detection of distant metastases of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2003;4:242-7.

60. Hellwig D, Ukena D, Paulsen F, Bamberg M, Kirsch CM. Meta-analysis of the efficacy of positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose in lung tumors. *Pneumologie* 2001;55:367-77.
61. Hicks R, Kalff V, MacManus MP, Ware RE, Hogg A, McKenzie AF, Mathews JP, Ball DL. 18F-FDG PET provides high-impact and powerful prognostic stratification in staging newly-diagnosed non-small cell lung cancer. *J Nucl Med* 2001;42:1596-604.
62. Pieterman RM, Van Putten JW, Meuzelaar JJ, Mooyaart EL, Vaalburg W, Koëte GH, Fidler V, Pruijm J, Groen HJM. Preoperative staging of non-small-cell lung cancer with positron-emission tomography. *N Engl J Med* 2000;343:254-61.
63. Van Tinteren H, Hoekstra OS, Smit EF, Van den Bergh JH, Schreurs AJ, Stallaert RA, Van Velthoven PS, Comans EF, Diepenhorst FN, Verboom P, Van Mourik JG, Postmus PE, Boers M, Teule GJ. Effectiveness of positron emission tomography in the preoperative assessment of patients with suspected non-small-cell lung cancer: the PLUS multicentre randomised trial. *Lancet* 2002;359:1388-92.
64. Silvestri GA, Tanoue LT, Margolis ML, Barker J, Detterbeck F. The noninvasive staging of non-small cell lung cancer. *Chest* 2003;123:Suppl.1, 147S-156S.
65. Gould MK, Maclean CC, Kuschner WG, Rydzak CE, Owens DK. Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis. *JAMA* 2001;285:914-24.
66. Vesselle H, Pugsley J, Vallieres E, Wood D. The impact of F18 positron – emission tomography on the surgical staging of non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:511-9.
67. Burger G, Goerres S, Schoenes A, Buck A, Lonn HR, Von Schulthess GK. PET attenuation coefficients from CT images: experimental evaluation of the transformation of CT into PET 511-keV attenuation coefficients. *Eur J Nucl Med* 2002;29:922-7.

68. Hany T, Steinert H, Goerres G, Buck A, Von Schulthess GK. PET Diagnostic Accuracy: Improvement with In-Line PET-CT System:Initial Results. *Radiology* 2002;225:575-81.
69. D'Amico T, Wong T, Harpole D, et al. Impact of computed tomography-positron emission tomography fusion in staging patients with thoracic malignancies. *Ann Thorac Surg* 2002;74:160-3.
70. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. USA, W.B.Saunders Company, 1999.
71. Jerše M, Terčelj M. Contributions of cytology examination and methods in lung cancer diagnostic. *Radiol Oncol* 2006;40(Suppl1):S77-S85.
72. Pongrac I. *Atlas pulmološke citologije*. Zagreb, Medicinska naklada, 2009
73. Kini S.R. *Color Atlas of Pulmonary Cytopathology*. Springer-Verlag, New York, Inc. 2002.
74. Peroš-Golubičić T. *Sarkoidoza/Bolesti plućnog intersticija*. Zagreb, Medicinska naklada, 2005.
75. Smojver-Ježek S, Vrabec Branica B, Juroš Z, Boras Z, Čučević B, Mažuranić I. TTF-1 u plućnoj citologiji. *Acta Med Croatica* 2008;62:373-78.
76. Naib ZM. *Cytopathology*. New York, Brown and Company, 1996.
77. Allen TC, Cagle PT, Popper HH. Basic Concepts of Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1551-6.
78. Cooper GM, Hausmann RE. *Stanica : molekularni pristup*, Medicinska naklada, Zagreb,2004.
79. Jukić S, Damjanov I. *Opća patologija*, Medicinska naklada, Zagreb,2002.
80. Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Perić J. *Odabrane metode molekularne biologije:laboratorijski priručnik*. Zagreb, Medicinska naklada, 2009.
81. Mao L. Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer. *Oncogene* 2002;21:6960-9.
82. Bentz JS. Molecular testing in cytopathology: Where we are, where do we go from here? *CAP TODAY* February 2006, pp.
83. Đačić S. EGFR assays in lung cancer. *Adv Anat Pathol* 2008;15:241-7.

84. Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods* 1991;Appl 1:46-50.
85. Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues, *PCR Methods* 1994;Appl 3:S113-S122.
86. Garcia-Closas M, Egn KM, Abruzzo J. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:687-96.
87. Kerstens H.M., Robben J.C., Poddighe P.J., Melchers W.J., Boonstra H., de Wilde P.C., Macville M.V., Hanselaar A.G. AgarCyto: a novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem* 2000;48: 709-718.
88. Tobal K., Layton D.M., Mufti G.J. Non-invasive isolation of constitutional DNA for genetic analysis. *Lancet* 1989;8674: 1281-1282.
89. Vrabec Branica B, Mirečić D, Grgić S, Smojver Ježek S, Chalfe N, Gajović S. PCR Quality DNA Isolation from Human Bronchial Aspirates and Buccal and Eyelid Swabs by a Simple Procedure Based on Alkaline Lyses. *Genet Test and Mol Biom* 2009;13(6):799-802.
90. Grote HJ, Schmiemann V, Sarbia M. DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take? *Anal Cell Pathol* 2003;25:83-8.
91. Greenberg AK, Sung Lee M. Biomarkers for Lung Cancer: Clinical Uses. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13(4):249-55.
92. Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F, et al. Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gen dosage, and gefitinib sensitivity in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:3078-84.
93. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351(6326):453-6.

94. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mescaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Resp J* 2001;18(4):705-19.
95. De Menezes Duarte RL, Machado Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *J Bras Pneumol* 2005;32(1):56-65.
96. 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;87:1056-60.
97. Micke 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;92(4):474-9.
98. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;161(4):1355-67.
99. Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34 Suppl:S53-S8.
100. Belinsky S. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:707-17.
101. Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res* 2006;66:3338-44.
102. Kim H, Kwon YM, Kim JS, et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of nonsmall cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2363-70.
103. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, et al. Methylation of RAS association domain family protein A as a biomarker of lung cancer. *Cancer* 2006;108:129-134.

104. Grote HJ, Schmiemann V, Kiel S, et al. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer* 2004;110:751-55.
105. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, et al. Aberrant promoter methylation of p16^{INK4a}, RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer* 2005;116:720-5.
106. Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M, Lewis CM, Shivapurkar N, Jiang A, Perou CM, Kim YH, Pollack JR, Fong KM, Lam C, Wong M, Shyr Y, Nanda R, Olopade OI, Gerald W, Euhus DM, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD. A genoma-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3:e486.
107. Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, et al. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer* 2003;39(9):1242-50.
108. Shibata Y, Hidaka S, Tagawa Y, Nagayasu T. Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2004;24(3b):1925-8.
109. Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, et al. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46(1):77-85.
110. Yashima K, Litzky IA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997;57(12):2373-7.
111. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1033-5.
112. Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, et al. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of nonsmall cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:2689-92.

113. Xue X, Zhu YM, Woll PJ. Circulating DNA and lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:154-64.
114. Aviel-Ronen S, Blackhall F, Shepherd F, et al. K-ras mutations in nonsmall cell lung carcinoma:a review. *Clin Lung Cancer* 2006;8:30-8.
115. Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K, et al. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer* 2005;48:77-83.
116. Miura N, Nakamura H, Sato R, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) m RNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci* 2006;97:1366-73.
117. Lin X, Gu J, Lu C, et al. Expression of telomerase-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:5720-5.
118. Lu B, Gonzales A, Massion PP, et al. Nuclear survivin as a biomarker for nonsmall lung cancer. *Br J Cancer* 2004;91:537-40.
119. Shinohara ET, Gonzales A, Massion PP, et al. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall lung carcinoma. *Cancer* 2005;103:1685-92.
120. Hu Z, Lin D, Yuan J, et al. Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotype in human nonsmall lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4646-52.
121. Charalabopoulos K, Gogali A, Dalavaga Y, et al. The clinical significance of soluble E-cadherin in nonsmall cell lung cancer. *Exp Oncol* 2006;28:83-5.
122. Howard BA, Zheng Z, Campa MJ, et al. Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in nonsmall lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46:313-23.

123. Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarker for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101:379-84.
124. Chen HY, Yu SL, Chen CH, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007;356:11-20.
125. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-8.
126. Poli D, Carbognani P, Corradi M, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with nonsmall cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Resp Res* 2005;6:71.
127. Wang YC, Hsu HS, Chen JT. Molecular diagnostic markers for lung cancer in sputum and plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:179-84.
128. Mydlarz WK, Hennessey PT, Califano JA. Advances and perspectives in the molecular diagnosis of head and neck cancer. *Expert Opinion on Medical Diagnostic* 2010; 4(1):53-65.
129. Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 1995;167(1-2):327-32.
130. Shimada M, Fukushima M, Mukai H, et al. Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18 and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:1-5
131. Lantz PG, Abu al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hagerdal B, Radstrom P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol Annu Rev* 2000;5:87-130.
132. Mitrečić D., Mavrić S., Vrabec Branica B., Gajović S. Mice genotyping using buccal swab samples – an improved method. *Biochem Genet.* 2008;46(3-4):105-112.

133. Mulot C, Stucker I, Clavel J, Beaune P, Lorient MA. Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card. *J Biomed Biotechnol* 2005;3:291-6.
134. Zhang YH, Huang BL, Eastman K, McCabe LL, MacLennan NK, McCabe ER. Mouth cell collection device for newborn mice. *Mol Genet Metab* 2006;89:164-7.
135. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev* 2003;27:397-404.
136. Rudbeck L, Dissing J. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques* 1998;25:588-92.
137. Meldegaard M, Bollen PJ, Finsen B. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Lab Anim* 2004;38:413-7.
138. Jackson DP, Payne J, Bell S. Extraction of DNA from exfoliative cytology specimens and its suitability for analysis by the polymerase chain reaction. *Cytopathology* 1990;1:87-96.
139. Horiike A, Kimura H, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung carcinoma. *Chest* 2007;131:1628-34.
140. Niklinski J, Hirsch FR. Molecular approaches to lung cancer evaluation. *Lung Cancer* 2002;38:S9-S17.
141. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics and follow up? *Lung Cancer* 2005;49:1-12.
142. Halling KC, Rickman O, Kipp B. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest* 2006;130:694-701.
143. Dacic S. EGFR assays in lung cancer. *Adv Anat Pathol* 2008;15:241-7.

144. Feigelson HS, Rodriguez C, Welch R. Successful genome-wide scan in paired blood and buccal samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1023-25.
145. Woo JG, Sun G, Haverbusch M. Quality assessment of buccal versus blood genomic DNA using the Affymetrix 500 K GeneChip. *BMC Genet* 2007;8:79.
146. Fei Y, Yang J, Hsieh WC, Wu JY, Wu TC, Goan YG, Lee H, Cheng YA. Different Human Papillomavirus 16/18 infection in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients Living in Wuhan, China. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36(5):274-79.
147. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikononopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, Kittas C. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999;30:274-83.
148. Papadopoulou K, Labropoulou V, Davaris P, Mavromara P, Tsimara-Papastamatiou H. Detection of human papillomaviruses in squamous cell carcinomas of the lung. *Virchow Arch* 1998;433:49-54.
149. Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, Genka K. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Pathol* 1996;49(10):810-17.
150. Ciotti M, Giuliani L, Ambrogi V, Ronci C, Benedetto A, Mineo TC, Syrjänen K, Favalli C. Detection and expression of human papillomavirus oncogenes in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2006;16(1):183-9.
151. Clavel CE, Nawrocki B, Bosseaoux B, Poitevin G, Putaud IC, Mangeonjean CC, Monteau M, Birembaut PL. Detection of Human Papillomavirus DNA in Bronchopulmonary Carcinomas by Hybrid Capture II. *Cancer* 2000;88:1347-52.
152. An HJ, Kim KR, Kim IS, Kim DW, Park MH, Park IA, Suh KS, Seo EJ, Sung SH, Sohn JH, Yoon HK, Chang ED, Cho HI, Han JY, Hong SR, Ahn GH. Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of

- cervical adenocarcinoma: a population-based study. *Mod Pathol* 2005;18(4):528-34.
153. Carlson JW, Nucci MR, Brodsky J, Crum CP, Hirsch MS. Biomarker-assisted diagnosis of ovarian, cervical and pulmonary small cell carcinomas: the role of TTF-1 WT-1 and HPV analysis. *Histopathology* 2007;51(3):305-12.
 154. Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 2001;61(7):2799-803.
 155. Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, Chen CY, Lee H. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res* 2007;67(22):10686-93.
 156. Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, Iwamasa T, Kurihara T, Hamada T. Squamous metaplasia induced by transfection of human papillomavirus DNA into cultured adenocarcinoma cells. *Mol Pathol* 2003;56:97-108.
 157. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt6):1456-60.
 158. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64(11):3878-84.
 159. Selinka HC, Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, Sapp M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol* 2007;81(20):10970-80.
 160. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. Human Papillomavirus in Oral Exfoliated Cells and Risk of Head and Neck Cancer. *Journal of National Cancer Institute* 2004;96(6):449-55.

161. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheri A, Aaltonen LM. Presence of DNA of Human Papillomavirus 16 but No Other Types in Tumor-Free Tonsillar Tissue. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1408-10.
162. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, Sexual Behavior and Human Papillomavirus Infection in Oral Cavity and Oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-72.
163. Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of Human Papillomavirus in the Oral Cavity/Oropharynx in a Large Population of Children and Adolescents. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2007;26(9):836-40.
164. Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, Sakagami G, Kubo K, Yoshimoto H, Kameyama Y. Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. *Oral Oncology* 2003;39(8):821-8.
165. Syrjänen S. Oral viral infections that could be transmitted oro-genitally. *Oral Disease* 2006;12(1):2.
166. Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Human papillomavirus (HPV) infection in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2009;168:267-73.
167. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009;199:1263-9.
168. Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, Lee H. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. *Cancer* 2003;97(6):1558-63.
169. Schreiber G, McCrory DC. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest* 2003;123(Suppl1):115S-128S.
170. Sanchez-Cespedes M. The Impact of Gene Expression Microarrays in the Evaluation of Lung Carcinoma Subtypes and DNA Copy Number. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1562-5.

171. Zakowski MF, Hussain S, Pao W, Ladany M, Ginsberg MS, Heelan R, Miller VA, Rusch VW, Kris MG. Morphologic Features of Adenocarcinoma of the Lung Predictive of Response to the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors Erlotinib and Gefitinib. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:470-7.
172. Monaco SE, Nikiforova MN, Cieply BSK, Teot LA, Khalbuss WE, Dacic S. A comparison of EGFR and KRAS status in primary lung carcinoma and matched metastases. *Human Pathology* 2010;41:94-102.
173. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, Baldini E, Melfi F, Fontanini G. Mutational Analysis in Cytological Specimens of Advanced Lung Adenocarcinoma: A Sensitive Method for Molecular Diagnosis. *J Thorac Oncol* 2007;2:1086-90.
174. Huang MJ, Lim KH, Tzen CY, Hsu HS, Yen Y, Huang BS. EGFR mutations in malignant pleural effusion of non-small cell lung cancer: A case report. *Lung Cancer* 2005;49:413-5.
175. Murer B. Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1573-5.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 29.9.1966. godine u Stuttgartu, Njemačka. Osnovnu školu i Matematičko-informatički obrazovni centar završila sam u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1985. godine i diplomirala u rujnu 1990. godine s temom iz ginekološke citologije. Iste godine upisala sam poslijediplomski studij iz medicinske citologije koji sam završila 1997. godine obranom magistarskog rada iz pedijatrijske gastroenterološke citologije „Diferencijalno dijagnostička vrijednost analize citoloških promjena sluznice rektuma u akutnim enterokolitisima rane dječje dobi“. 1995 godine započela sam specijalizaciju iz kliničke citologije za Polikliniku za medicinsku dijagnostiku u Zagrebu i završila je u veljači 2001. godine. U prosincu 2003. godine započinjem raditi u Citološkom laboratoriju Klinike za plućne bolesti Jordanovac gdje i sada radim. Do sada sam objavila šest radova koje citira Current Contents („Mice Genotyping Using Buccal Swab Samples: An Improved Method“, „PCR-Quality DNA Isolation from Human Bronchial Aspirates and Buccal and Eyelid Swabs by a Simple Procedure Based on Alkaline Lysis“, „Detection of Human Papillomaviruses Type 16, 18 and 33 in Bronchial Aspirates of Lung Carcinoma Patients by Polymerase Chain Reaction: A Study of 84 Cases in Croatia“, „Morphometric and DNA Image Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid Macrophages Nuclei in Interstitial Lung Diseases with Lymphocytic Alveolitis“, „Lymphomatoid Granulomatosis in a 23-year-old Man – Cytological and Histological Typing and Rapid Response to Steroid and Cyclophosphamide Combination Therapy“, „Synchronous Bilateral Breast Carcinoma with Two Different Morphology Subtypes: A Case Report“).