

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET
MEDICINA
KATEDRA ZA PATOLOŠKU ANATOMIJU



STEFAN KREMENOVIĆ
NEMIKROCELULARNI KARCINOM PLUĆA
DIPLOMSKI RAD

BANJA LUKA, MART 2021. GOD.

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
MEDICINSKI FAKULTET
MEDICINA

NEMIKROCELULARNI KARCINOM PLUĆA

DIPLOMSKI RAD

Mentor:
prof. dr Ljiljana Tadić Latinović

Kandidat:
Stefan Kremenović , 7102/14

Banja Luka, mart 2021. god.

S A D R Ź A J

1. SAŽETAK.....	
1. ABSTRACT	
2. UVOD	1
3. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA	2
3.1. Adenokarcinom	2
3.1.1. Lepidični adenokarcinom.....	3
3.1.2. Acinarni adenokarcinom	4
3.1.3. Papilarni i mikropapilarni adenokarcinom.....	4
3.1.4. Solidni adenokarcinomi	5
3.2. Skvamozni karcinom pluća	5
3.3. Neuroendokrini karcinom pluća	7
3.4. Krupnoćelijski karcinom pluća.....	9
3.5 Adenoskvamozni karcinom pluća	10
4. IMUNOHISTOHEMIJSKA DIJAGNOSTIKA.....	11
4.1. Markeri diferencijacije adenokarcinoma pluća	12
4.2. Markeri skvamozne diferencijacije	13
4.3. Markeri neuroendokrine diferencijacije	15
4.4. Markeri za krupnoćelijske karcinome pluća.....	16
5. MOLEKULARNA TESTIRANJA	16
5.1. EGFR testiranje	16
5.2. Anaplastična limfomska kinaza (ALK).....	18
5.2.1. Florescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH).....	19
5.2.2. Imunohistohemija ALK	20
5.2.3. Reakcija lančane polimerizacije sa reverznom transkriptazom (RT-PCR)	20
5.3. KRAS testiranje	21
5.4. PD-L1 (Programmed death-ligand 1)	22
6. ZAKLJUČAK	24
7. LITERATURA.....	25

1. SAŽETAK

Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti na globalnom nivou i odgovoran je za oko 10 miliona smrtnih slučajeva godišnje. Po podacima SZO za 2020. godinu, karcinom pluća se u svijetu nalazi na drugom mjestu po broju oboljelih, ali ubjedljivo zauzima prvo mjesto po broju smrtnih ishoda (1,8 miliona). Najznačajniji faktori rizika za nastanak karcinoma pluća su pušenje, izloženost radonu i zagađujućim materijama u vazduhu.

Za postavljanje dijagnoze nemikrocelularnog karcinoma pluća potrebno je odrediti histološki tip na HE bojenim preparatima. Zbog slabijeg stepena diferencijacije i preklapanja između određenih histoloških podtipova često je potrebno odraditi dodatne dijagnostičke procedure. Za imunofenotipizaciju podtipova koriste se metode imunohistohemije sa panelima preporučenih antitijela. Molekularnim testiranjem uzoraka karcinoma pluća pronađene su specifične *driver* mutacije gena (EGFR, ALK, KRAS), koje su postale osnov za razvijanje savremene ciljane imunološke terapije. Upotreba ove terapije umnogome je popravila prognozu bolesti.

Ključne riječi: *NSCLC*, imunohistohemija, *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *PD-L1*

1. ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death globally and is responsible for about 10 million deaths a year. According to the WHO for 2020, lung cancer ranks second in the world in the number of patients, but convincingly ranks first in the number of deaths (1.8 million). The most important risk factors for lung cancer are smoking, exposure to radon and air pollutants.

For diagnose of non-small cell lung cancer, it is necessary to determine the histological type on HE stained specimens. Due to the lower degree of differentiation and overlap between certain histological subtypes, it is often necessary to perform additional diagnostic procedures. Immunohistochemistry methods with panels of recommended antibodies are used for immunophenotyping of subtypes. Molecular testing of lung cancer samples revealed specific driver gene mutations (EGFR, ALK, KRAS), which became the basis for the development of modern targeted immune therapy. The use of this therapy has greatly improved the prognosis of the disease.

Keywords: *NSCLC, immunohistochemistry, EGFR, ALK, KRAS, PD-L1*

2. UVOD

Karcinomi pluća su jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu. U 2020. godini u Bosni i Hercegovini potvrđena su 14673 novootkrivena karcinoma od čega 2513 (17,1%) čine upravo karcinomi pluća. U odnosu na pol češće se javljaju kod muškaraca gdje zauzimaju prvo mjesto sa 1984 (24,8%) novootkrivena slučaja, dok se kod žena nalaze na trećem mjestu (529- 7,9%) iza karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma. Takođe, nalaze se na prvom mjestu po broju smrtnih ishoda od svih karcinoma sa 2240 slučaja (24,3%) [1].

Tokom decenija istraživanja identifikovani su mnogi faktori rizika za obolijevanje od karcinoma pluća, uključujući pušenje zapaljivih duvanskih proizvoda, radon u zatvorenim prostorima i rudnicima, zagađenje vazduha na otvorenom [2]. Rizik kod pušača raste sa dužinom konzumiranja i brojem cigareta dnevno upotrebljenih da bi progresivno opao nakon prestanka konzumiranja [3]. Karcinomi sa EGFR mutacijama češće se javljaju kod žena, nepušača i sa prostora Istočne Azije [4].

Na osnovu patohistološke slike podijeljeni su u dvije velike grupe: mikrocelularni karcinom pluća (*small cell lung carcinomas*- SCLC) i nemikrocelularni karcinom pluća (*non-small cell lung carcinomas*- NSCLC) [5]. Nemikrocelularni karcinom pluća čini oko 87% svim karcinoma pluća [6]. Najčešći podtipovi NSCLC-a su adenokarcinom (40%), skvamozni (30%), krupnoćelijski (15%) i nešto rjeđi tipovi kao što su neuroendokrini tumori pluća, pleomorfni karcinom, mukoepidermoidni, neklasifikovani itd. [5].

U slučaju gdje se ne može odrediti podtip NSCLC-a, samo na osnovu HE bojenih uzoraka, koriste se paneli preporučenih antitijela (TTF1, CK7, napsin A, CK5/6 i/ili p63, p40, synaptophysin, chromogranin, CD56) za imunofenotipizaciju nemikrocelularnog karcinoma pluća.

Tumorskim ćelijama, da bi opstale i dalje se razvijale, potrebne su *driver* mutacije (fenomen onkogene zavisnosti) [5]. Prekomjerna ekspresija receptora, kao i navedene genetske i epigenetske promjene (npr. inverzija, translokacija i metilacija) su ključni faktori za pristupe otkrivanju individualne biologije tumora i donošenju odluka o lečenju [7].

Molekularnim testovima otkriveno je nekoliko *driver* mutacija gena kod NSCLC, uključujući EGFR [8-10], KRAS, BRAF [11,12], ERBB2/HER2 [13,14], ALK [15], ROS1 [16], RET [17-19], NTRK1 [20] i NRG1 [21]. Od svih navedenih mutacija, EGFR i ALK su klinički najznačajnije, zato što su odobreni molekularni *target* lijekovi za pacijente čije tumorske ćelije pokazuju ove mutacije.

3. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA

Za postavljanje dijagnoze NSCLC potrebno je na adekvatan način uzorkovati materijal i dostaviti na patohistološko analiziranje. Uzorci mogu biti sitne biopsije, citološki blokovi, citološki materijal, *liquid* biopsije i materijal dobijen hirurškom ekscizijom primarnog tumora kao i metastaza. Histološki tip tumora određuje se na standardnim hematoksilin-eozin bojenjima (HE bojenje), a to su: adenokarcinom, skvamozni karcinom, neuroendokrini karcinom, krupnoćelijski karcinom, adenoskvamozni karcinom, mukoepidermoidni karcinom, neklasifikovani karcinomi.

3.1. Adenokarcinom

Adenokarcinom je maligni epitelijalni tumor sa glandularnom diferencijacijom, produkcijom mucina ili ekspresijom markera pneumocita. Podtipovi adenokarcinoma su: acinarni, lepidični, (mikro)papilarni, solidni, invazivni mucinozni, fetalni i koloidni (mucinozni) [5].

Za razliku od karcinoma skvamoznih ćelija, adenokarcinom je lokalizovan u perifernim dijelovima i u gornjim režnjevima pluća [22], dok je 33% predominantno solidnih, 25% mikropapilarnih i 20% acinarnih adenokarcinoma centralno lokalizovano [23,24]. Kao primarna lezija, karcinom pluća obično se prezentuje kao čvorić. Multipli primarni karcinomi pluća nisu neuobičajeni, posebno multipli invazivni mucinozni adenokarcinomi. Konsolidacije slične pneumoniji mogu se naći kod invazivnih mucinoznih adenokarcinoma i skvamoznih karcinoma.

Mogu se širiti hematogenim, limfogenim putem i *per continuitatem*. Limfogeno širenje dovodi do zahvatanja ipsilateralnih i kontralateralnih hilarnih i medijastinalnih limfnih čvorova. Hematogene metastaze su najčešće lokalizovane u jetri, kostima, mozgu, nadbubrežnim žlijezdama i plućima. Širenje preko površine pleure je još jedan od mogućih načina širenja tumora [5].

Većina invazivnih adenokarcinoma prezentuju se kao bjeličasto-sivkasti čvorić sa centralnom fibrozom i antrakotičnim pigmentom [25]. Periferna lepidična komponenta može rezultovati slabijom diferencijacijom, i individualni očuvani alveolarni prostori mogu biti vidljivi.

Žljezdana morfologija se može manifestovati kroz različite rasporede ćelija [26]. Jedro je

potisnuto na periferiju ćelije sa vezikularnim hromatinom i izraženim jedarcetom. Citoplazma je vakuolizovana sa prisustvom mucina [5]. Slabo diferentovane adenokarcinome solidne građe ponekad je nemoguće razlikovati od nekeratinizujućih karcinoma skvamoznih ćelija bez upotrebe imunohistohemijskih analiza [27]. Uvođenjem imunohistohemijskog bojenja sa TTF-1 i skvamoznim markerima umnogome je poboljšalo diferencijaciju različitih NSCLC [28].

Na invazivni adenokarcinom otpada 70-90% svih hirurški odstranjenih tumora. Invazivni adenokarcinom se karakteristično sastoji od kompleksnog heterogenog miksa histoloških podtipova [23,24,29,30]. Prema novoj klasifikaciji SZO, uvodi se pojam „predominantno“ koji se odnosi na sve kategorije invazivnih nemucinoznih adenokarcinoma. Iako je u teoriji moguće postojanje procentualno jednakih komponentata, u praksi, trebalo bi da se odabere jedna predominantna komponenta [5].

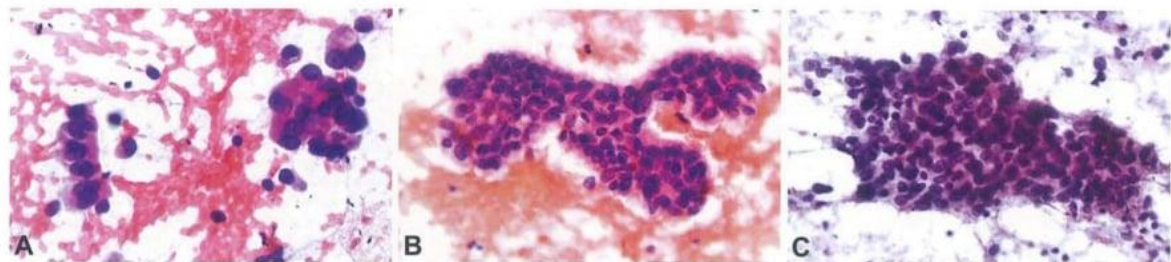
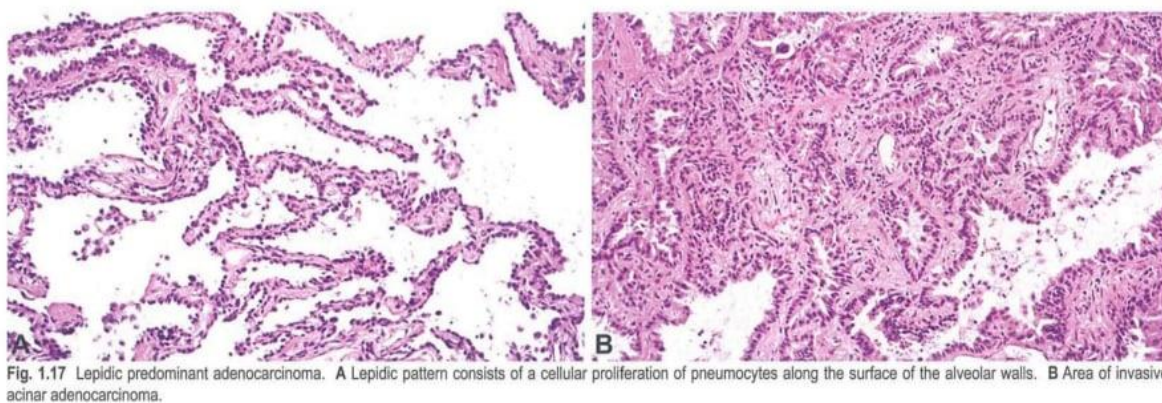


Fig. 1.16 Adenocarcinoma. **A** Columnar cells with eccentric nuclei, open pale chromatin, and prominent nucleoli. The cells line up to form a picket-fence appearance, with a shared luminal edge. Some cells have cytoplasmic mucin. **B** A branching group with a smooth border is a cytological reflection of papillary architecture. **C** Poorly differentiated adenocarcinoma can manifest as groups of overtly malignant cells with no clear morphological features of differentiation; this morphology is indistinguishable from poorly differentiated squamous cell carcinoma in the absence of ancillary studies.

Slika 1. Patohistološka slika adenokarcinoma

3.1.1. Lepidični adenokarcinom

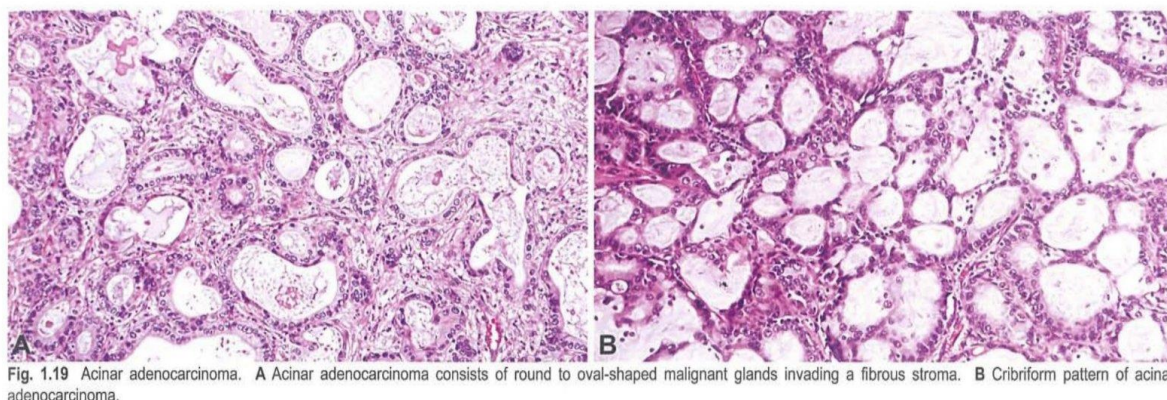
Ovaj podtip se tipično sastoji od blijedih pneumocitnih ćelija (pneumociti tip II ili Klara ćelije) koje rastu uz površinu alveolarnih zidova. Komponenta invazivnog adenokarcinoma se prezentuje u najmanje jednom fokusu najmanje 5mm u svom najvećem dijametri. Dijagnoza predominantno lepidičnog adenokarcinoma postavlja se ukoliko karcinom invadira limfatike, krvne sudove ili pleuru, ima prisutnu tumorsku nekrozu, sadrži invazivnu komponentu veću od 5mm, širi se alveolarnim putevima. Prognoza je odlična za stadijum I predominantno lepidičnog podtipa adenokarcinoma [24,25,29,31].



Slika 2. Patohistološka slika lepidnog adenokarcinoma

3.1.2. Acinarni adenokarcinom

Ovaj podtip sastoji se većinski od žljezdane komponente koja je okruglog ili ovalnog oblika sa centralnim lumenskim prostorom okruženim tumorskim ćelijama i može sadržati mucin. Kada je alveolarna struktura izbrisana ili je prisutna miofibrozna stroma, smatra se da je riječ o acinarnom adenokarcinomu [32].



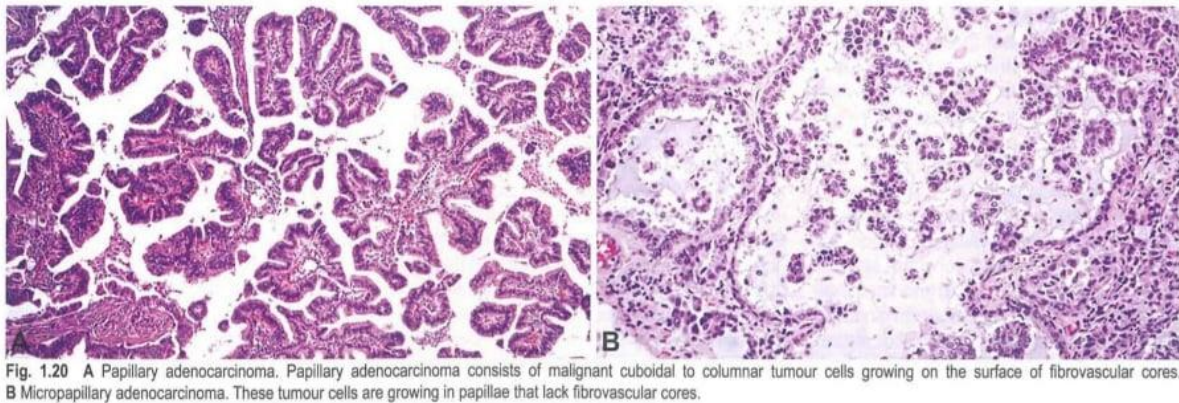
Slika 3. Patohistološka slika acinarnog karcinoma

3.1.3. Papilarni i mikropapilarni adenokarcinom

Glavnu komponentu papilarnog podtipa čini rast glandularnih ćelija duž centralne fibrovaskularne srži [28,33,34]. Ukoliko su tumorski acinusi ili alveolarni prostori ispunjeni papilarnom ili mikropapilarnom strukturom, tumor se klasifikuje kao papilarni ili mikropapilarni adenokarcinom.

Mikropapilarni adenokarcinom ima tumorske ćelije koje rastu u papilarnim čupercima kojima nedostaje fibrovaskularna srž [28,33,34]. Mogu se pojaviti odvojeno i/ili povezano sa

alveolarnim zidovima. Tumorske ćelije su obično male i kubične sa varijabilnom atipijom jedra. Tipične su i vaskularna i stromalna invazija. Mogu se naći i *Psamomska* tjelašca. Prisustvo mikropapilarnog podtipa je loš prognostički faktor za sveukupno preživljavanje [35].



Slika 4. Patohistološka slika papilarnog adenokarcinoma

3.1.4. Solidni adenokarcinomi

Glavnu komponentu ovog podtipa čine poligonalne tumorske ćelije koje formiraju listove kojima nedostaju prepoznatljivi obrasci adenokarcinoma (acinusi, papile, lepidna komponenta) [28,33,34]. Ako je tumor 100% solidan, intracelularni mucin treba biti prisutan u najmanje 5 tumorskih ćelija u svakom vidnom polju i dokazan IHH bojenjem na mucin. Tumori inače klasifikovani kao krupnoćelijski tumori koji pokazuju ekspresiju pneumocitnih markera, čak i ako mucin nije prisutan, se sada klasifikuju kao solidni adenokarcinomi.

3.2. Skvamozni karcinom pluća

Skvamozni karcinom je maligni epitelijalni tumor, koji ili ispoljava keratinizaciju i/ili intracelularne mostiće, ili je morfološki nediferentovan nesitnoćelijski tumor koji samo ispoljava imunohistohemijske markere tumora skvamoznih ćelija [5].

Ovi tumori su čvrsto povezani sa pušenjem cigareta, a incidencija pojave tumora širom svijeta ogleda se u pušačkim navikama stanovništva [36]. Studije su pokazale da je pojava karcinoma skvamoznih ćelija povezana sa količinom, dužinom, kao i godinama početka pušenja cigareta, te sa nivoom katrana prisutnog u cigaretama [37]. Produžena izloženost arsenu, kao i teškim metalima i radonu može biti povezana sa pojavom ovog karcinoma [38-41].

Karcinomi skvamoznih ćelija su agresivni tumori koji se šire slično ostalim nesitnoćelijskim tumorima pluća, tako da su udaljene metastaze uobičajene. Lokalno su takođe agresivni, šire se na susjedne strukture direktnom invazijom.

Najčešće su sive ili bijele boje, te meke konzistencije. Mogu dostići velike dimenzije, kada se stvaraju kavitacije usljed centralne nekroze. Centralni tumori formiraju intraluminalne polipoidne mase, mogu da infiltriraju bronhijalni zid i okolna tkiva ili da dovedu do okluzije bronhijalnog lumena [42-45].

Dobro diferentovani skvamozni karcinomi pokazuju jasnu keratinizaciju, ali za razliku od drugih lokalizacija, kod plućnih karcinoma obično ne postoji difuzna, nego samo fokalna citoplazmatska keratinizacija u vidu keratinskih perli, međućelijskih mostića i vlakana keratina. Izrazita nekroza i inflamacija su uobičajeni, zbog čega mogu ličiti na nekrotizirajuće granulome. Jedro uglavnom ima taman hromatin, bez prominentnog jedarceta.

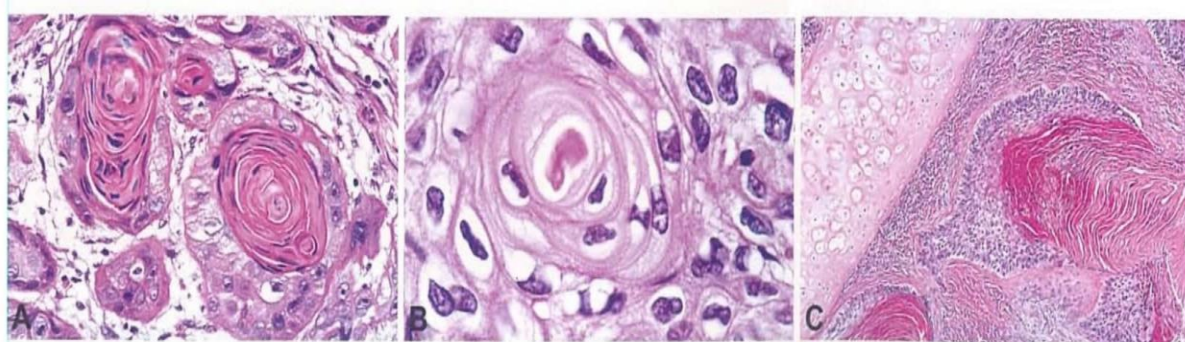
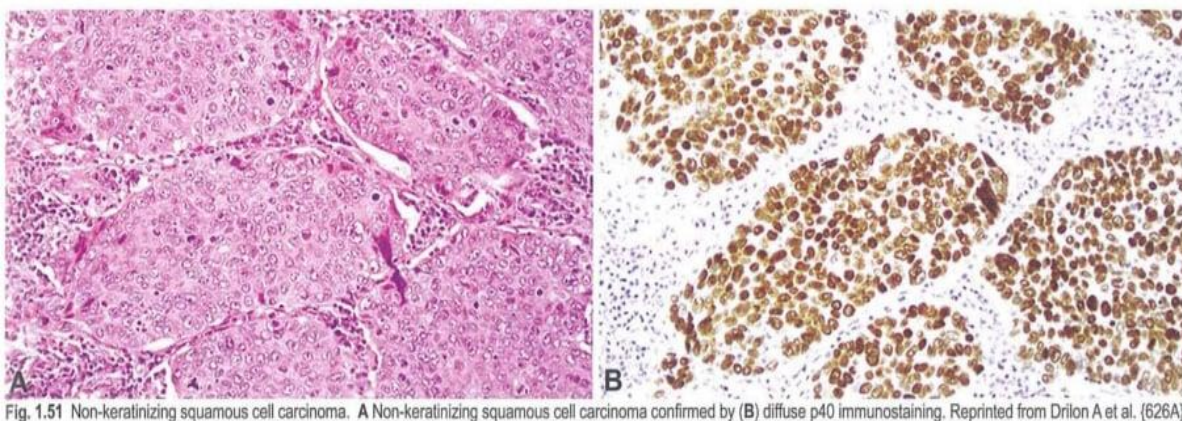


Fig. 1.50 Keratinizing squamous cell carcinoma. Squamous differentiation in these cytologically malignant cells is manifest by: (A) squamous pearls, (B) distinct intercellular bridges, or (C) layers of keratin. Reprinted from Travis WD et al. [2678].

Slika 5. Patohistološka slika keratinizirajućeg skvamoznog karcinoma

Slabije diferentovani skvamozni karcinomi pokazuju značajna morfološka preklapanja sa loše diferentovanim adenokarcinomom: citoplazmatska keratinizacija odsutna ili nevidljiva, a jedro može imati otvoren mjehurast hromatin i prominentno jedarce.

Kod nekeratinizirajućih tumora potrebni su imunohistohemijski testovi da bi se razlikovali od drugih, npr. krupnoćelijskih karcinoma sa nultim fenotipom. Prisustvo mucina u nekoliko ćelija ne isključuje da tumor pripada ovoj kategoriji. Neki nekeratinizirajući skvamozni tumori mogu morfološki biti slični tranziciocelularnim tumorima urotrakta [33].



Slika 6. Patohistološka slika nekeratinizirajućih skvamoznih karcinoma

Kod vrlo dobro diferentovanih karcinoma centralnih disajnih puteva sa papilarnim izgledom, razlikovanje od papiloma može biti otežano, kada se traže znakovi invazije. Razlikovanje primarnog skvamoznog karcinoma pluća od metastatskih depozita kod pacijenata koji imaju istoriju skvamoznih karcinoma drugih lokalizacija takođe predstavlja izazov. U ovim slučajevima radi se poređenje TP53 mutacije/p53 statusa između pluća i primarnog tumora druge lokalizacije [46-50].

3.3. Neuroendokrini karcinom pluća

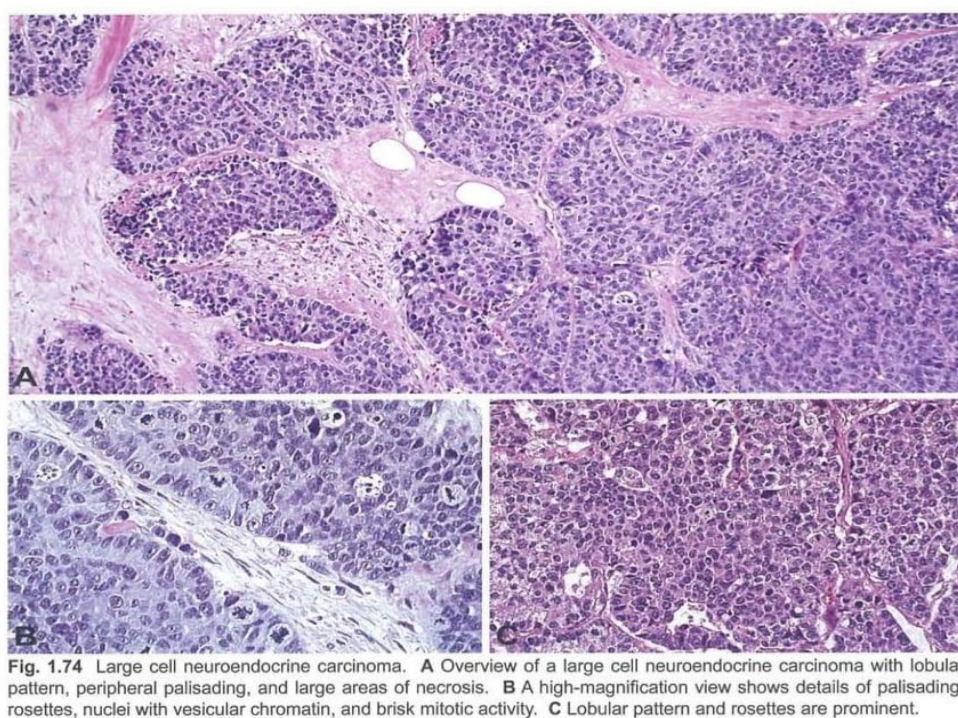
Neuroendokrini karcinom velikih ćelija (*Large cell neuroendocrine carcinoma* -LCNEC) je nesitnoćelijski karcinom pluća koji pokazuje histološke odlike neuroendokrinih tumora (rozete i periferne palisade) kao i ekspresiju imunohistohemijskih markera ovih tumora. Kombinovani neuroendokrini karcinom je vrsta LCNEC koja ima komponente adenokarcinoma, skvamoznog i/ili karcinoma džinovskih ćelija. Pojava LCNEC je snažno povezana sa pušenjem cigareta, naime preko 90% ovih tumora javlja se kod teških pušača [51,52].

U pogledu genetskog profila tumora, učestale su TP53 i RB mutacione inaktivacije, kao i mutacije CREBBP i EP300 i MLL gena. Neuroendokrini tumori pokazuju izuzetno visoku stopu mutacija- više od 7.4 protein-izmjenjujućih mutacija po milionu baznih parova [53].

Često je tumor lokalizovan u perifernom plućnom tkivu (84%) te dugo može biti asimptomatski [54]. Centralnu lokalizaciju nalazimo u oko 20% slučajeva i tada se mogu javiti opstruktivne promjene kao atelektaze ili pneumonija. Neuroendokrini karcinomi imaju značajan potencijal širenja, uglavnom u regionalne i udaljene limfne čvorove, ipsilateralne i kontralateralne dijelove plućnog tkiva, jetru, mozak i kosti. Često se širi na pleuru, torakalni

zid i okolne strukture.

U praksi se predloženi citološki kriterijumi za dijagnozu LCNEC preklapaju sa onima drugih neuroendokrinih tumora kao i sa adenokarcinomom, čineći tako postavljanje dijagnoze otežanom [55]. Nakon bojenja vidljivi su rastresiti sincicijalni agregati, a ukoliko je izgled preparata jednoličan to ukazuje na neoplazmu niskog gradusa. Međutim ukoliko se vide polja nekroze ili apoptotični debris radi se o tumoru visokog gradusa. Nuklearna hiperhromazija može ukazivati na sitnoćelijski karcinom, ali jedarca su obično jasno vidljiva u većini (ako ne i svim) ćelijama.



Slika 7. Patohistološka slika LCNEC

Za postavljanje dijagnoze LCNEC potrebna je imunohistohemijska potvrda tumora sa odgovarajućim antitijelima.

LCNEC pokazuje neuroendokrinu morfologiju kao što su trabekularni rast, strukture slične rozetama i periferni palisadni oblici. Tumorske ćelije su generalno velike, a mitotski indeks bi trebalo da bude veći od 10 na 2mm² (prosječno iznosi 75).

Kombinovani LCNEC je oblik neuroendokrinog tumora sa pridodatim karakteristikama adenokarcinoma, skvamoznog ili karcinoma džinovskih ćelija.

3.4. Krupnoćelijski karcinom pluća

Krupnoćelijski karcinom je nediferentovani nesitnoćelijski karcinom kojem nedostaju citološke, histološke i imunohistohemijske odlike sitnoćelijskog, skvamoznog ili adenokarcinoma. Za postavljanje dijagnoze potreban je resekat tumora te se ne može potvrditi samo na osnovu citološkog uzorka.

Nedavne studije pokazale su smanjenje učestalosti krupnoćelijskog karcinoma pluća sa 9.4% na 2.3% u odnosu na sve karcinome pluća [5]. Ovo smanjenje pripisuje se promjenama u pristupu patohistološkoj dijagnozi zbog imunohistohemijskih analiza ovih tumora i klasifikacije pod druge tipove kao što su adeno ili skvamozni karcinom. Pacijenti sa dijagnozom krupnoćelijskog karcinoma uglavnom su muškarci i to iznad 60 godina starosti. Etiologija je slična kao za ostale tumore pluća, tako da su oboljeli najčešće pušači.

Ovi tumori su tipično lokalizovani na periferiji plućnog parenhima. Obično se javljaju u vidu velikih, cirkumskriptnih, solidnih masa sa zonama nekroze. Mogu se širiti hematogenim i limfogenim putem, kao i direktno preko površine pleure [56-59].

Obično su ćelije ovog karcinoma velike i kohezivne, imaju visoko maligne citološke karakteristike, slične onima kod ostalih loše diferentovanih nesitnoćelijskih tumora. Imaju voluminoznu citoplazmu sa ekscentrično postavljenim jedrom i velikim jedarcetom [60-63].

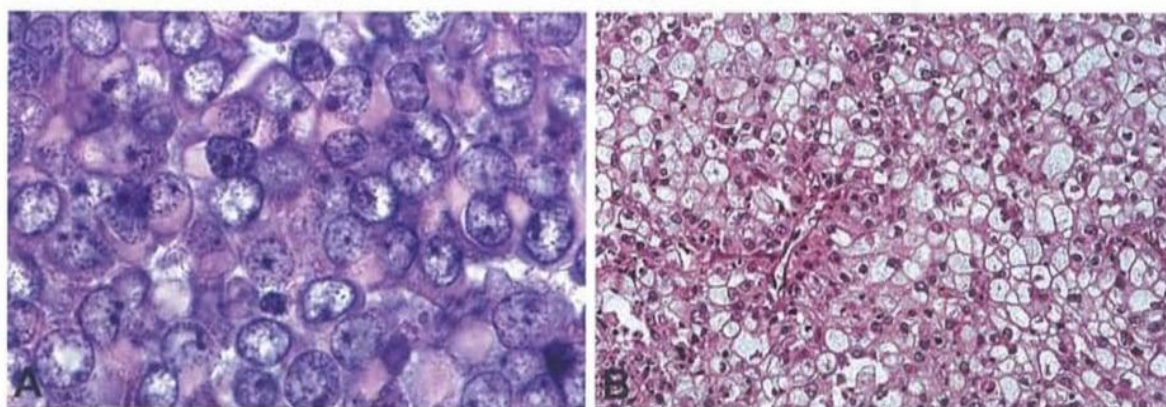


Fig. 1.91 Large cell carcinoma. **A** Rhabdoid cytology, with tumour cells that have large globular eosinophilic cytoplasmic inclusions; the nuclear chromatin is vesicular and nucleoli are prominent. Reprinted from Travis et al. (2678). **B** Clear cell cytology, with numerous tumour cells showing clear cytoplasm; the cytological features should be noted. Classification as a large cell carcinoma requires morphological and immunohistochemical exclusion of other tumour types, as both cytological appearances can occur in other types of NSCLC.

Slika 8. Patohistološka slika krupnoćelijskih karcinoma

Do dijagnoze se dolazi nakon što se isključi prisustvo morfoloških komponenti

skvamoznog, sitnoćelijskog ili adenokarcinoma, te prisustvo imunohistohemijskih odlika skvamoznog i adenokarcinoma [64-66]. Koristeći imunohistohemijske analize i prisustvo mucina, 18-41% tumora koji imaju morfologiju krupnih ćelija ostaju negativni ili ne mogu biti reklasifikovani, te se s toga trenutno klasifikuju kao krupnoćelijski karcinomi [67].

Diferencijalna dijagnoza krupnoćelijskih karcinoma primarno uključuje [64-69]:

1. solidne adenokarcinome koji imaju 5 ili manje intracitoplazmatskih kapljica u najmanje dva vidna polja, te kojima nedostaju pneumocitni markeri;
2. solidne adenokarcinome koji imaju samo imunohistohemijske potvrde adenokarcinomske diferencijacije;
3. nekeratinizirajuće skvamozne karcinome u kojima je oskudno prisustvo intracitoplazmatskih mostića;
4. nekeratinizirajuće skvamozne karcinome sa samo imunohistohemijskim odlikama skvamozne diferencijacije;
5. adenoskvamozne karcinome.

3.5 Adenoskvamozni karcinom pluća

Adenoskvamoznim karcinomom nazivamo onaj koji posjeduje komponente i skvamoznog i adenokarcinoma, sa zastupljenošću od najmanje 10% od svake komponente [70]. Spadaju u agresivne tumore, čija se učestalost procjenjuje na 0.4-4% od svih karcinoma pluća [71-73], a njihova pojava je takođe povezana sa pušenjem. Dominantno se javljaju kod muškaraca u starijoj životnoj dobi [74,75]. Petogodišnje preživljavanje nakon resekcije iznosi oko 40% [65,76].

Uobičajeno se javljaju na perifernim dijelovima plućnog parenhima [74,75], iako su prijavljeni slučajevi i sa centralnom lokalizacijom [77]. Njihova veličina, kao i patološke karakteristike slične su onima kod drugih nesitnoćelijskih karcinoma pluća [74].

Citološki uzorci kao i mali biopsijski uzorci imaju određena ograničenja u pogledu postavljanja definitivne dijagnoze adenoskvamoznog karcinoma, te se u ove svrhe koriste uzorci dobijeni resekcijom tumora. U samom tumoru može postojati predominacija adenokarcinomatoznih kao i skvamoznih komponenti, difuzno ili fokalno. Tako da mali uzorci tkiva mogu dovesti do pogrešne dijagnoze u smjeru jednog ili drugog karcinoma, a ne njihove kombinacije [27,70,78].

Kada su dobro definisane, komponente i skvamoznog i adenokarcinoma mogu biti vidljive i na svjetlosnoj mikroskopiji. Ove dvije komponente mogu u samom tumoru biti razdvojene, spojene ili pomiješane, a stepen diferencijacije može varirati u svakoj komponenti posebno.

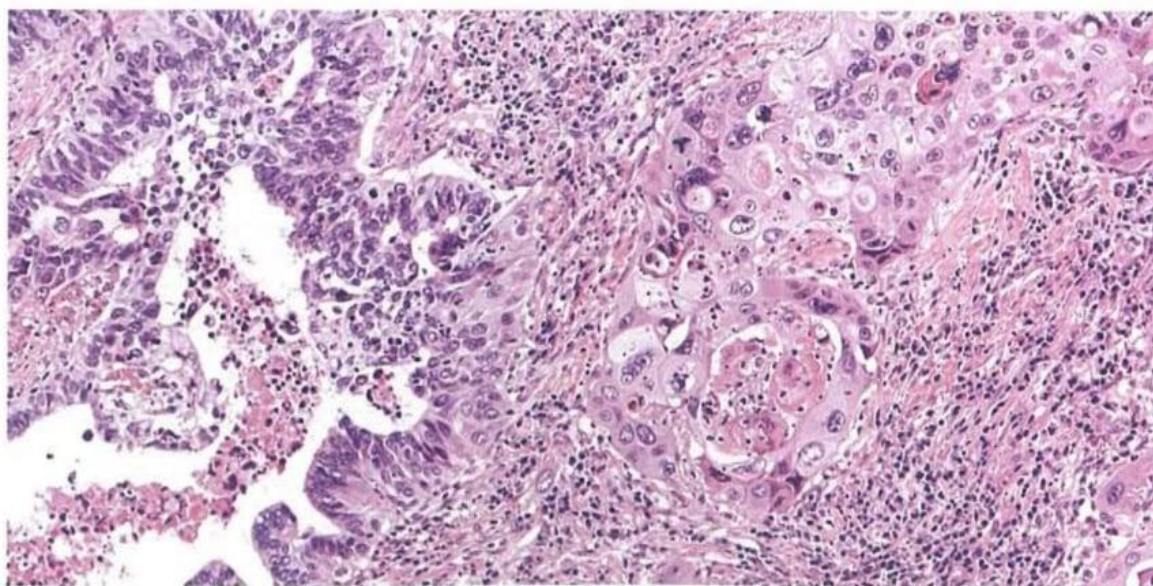


Fig. 1.95 Adenosquamous carcinoma, with adenocarcinoma (left) and squamous cell carcinoma (right).

Slika 9. Patohistološka slika adenokarcinoma

U diferencijalnoj dijagnozi ga je teško razlikovati od mukoepidermoidnog karcinoma visokog gradusa. Ipak postoje osobine na osnovu kojih se mogu razlikovati, kao što su: prisustvo mucinskih ćelija, proksimalna egzofitična endobronhijalna lokalizacija, nedostatak keratinizacije i sl. koje nalazimo kod mukoepidermoidnih karcinoma za razliku od adenoskvamoznih [79,80].

4. IMUNOHISTOHEMIJSKA DIJAGNOSTIKA

Imunohistohemija (IHH) je kombinacija tri samostalne nauke- imunologije, histologije i hemije. Zasniva se na principu vezivanja antitijela za ciljne specifične regione antigena tzv. epitope [81]. Antitijela su obilježena sa fluorescentnim jedinjenjima ili su konjugovana sa enzimima što možemo detektovati sa imunofluorescencijom ili specifičnim bojenjem vidljivim svjetlosnim mikroskopom. IHH koristi se u patologiji za identifikaciju i klasifikaciju neoplazmi, određivanje fenotipa- primarni ili metastatski kao i za prognozu i terapijske protokole. Razlikovanje adenokarcinoma od skvamoznih sa metodom IHH izuzetno je praktično i jeftino [82].

4.1. Markeri diferencijacije adenokarcinoma pluća

Adenokarcinomi pluća ispoljavaju pneumocitne markere kao što su TTF-1 (*Thyroid transcription factor-1* ili NKx2-1), Napsin A i CK7 (*cytokeratin 7*) [83,84]. TTF-1 je transkripcijski faktor koji reguliše razvoj, diferencijaciju i gensku ekspresiju ćelija štitne žlijezde, pluća i CNS-a (diencefalona) [85]. Gen za ovaj faktor nalazi se na kratkom kraku hromozoma 14 [82]. U plućima pokazuje ekspresiju na pneumocitima tip II (Klara ćelije) i slabije na epitelnim ćelijama trahealne mukozе [86]. Zadužen je za regulaciju stvaranja sekretornog Klara proteina i ATP vezujućeg transportera A3 [87].

Tabela 1. Prikaz ekspresije TTF-1

EKSPRESIJA KOD KARCINOMA PLUĆA	EKSPRESIJA KOD OSTALIH KARCINOMA	EKSPRESIJA NA NORMALNIM ĆELIJAMA
Adenokarcinom pluća Bronhoalveolarni karcinom SCLC	Karcinom štitne žlijezde Holangiokarcinom SCLC drugih lokalizacija Ependimom Meningeom Pituicitom	Klara ćelije Diencefalon Pituitarna žlijezda Folikularne i parafolikularne ćelije štitne žlijezde

Postoje dva monoklona antitijela za TTF-1: 8G7G3/1 i SPT24. Drugo antitijelo detektuje predominantno primarne karcinome pluća, uključujući o skvamozni i krupnoćelijski karcinom [88]. Adenokarcinomi pokazuju ekspresiju TTF-1 u oko 75% slučajeva [89,90,91]. Među svim podtipovima adenokarcinoma, najčešće lepidni i papilarni su pozitivni na TTF-1 [92]. Bliska veza između EGFR mutacija i TTF-1 u adenokarcinomima pluća je također dokazana [93].

Napsin A je pepsinu slična aspartatna proteinaza 4 koja učestvuje u proteolitičkim procesima stvaranja prosurfaktanta [94]. Pokazuje ekspresiju samo kod adenokarcinoma i u dobroj je korelaciji sa TTF-1. U izuzetnim slučajevima postoje odstupanja od ovoga.

Tabela 2. Ekspresija Napsina A

EKSPRESIJA KOD KARCINOMA PLUĆA	EKSPRESIJA KOD OSTALIH KARCINOMA	EKSPRESIJA KOD NORMALNIH ĆELIJA
--------------------------------	----------------------------------	---------------------------------

Adenokarcinom	Renalni papilarni karcinom	Klara ćelije
	Endometrijalni karcinom	Respiratorni epitel bronhiola
	Holangiokarcinom	Pankreasni acinusi
	Ovarijalni <i>clear cell</i> tumor	Ćelije proksimalnih tubula bubrega

Za Napsin A postoje monoklonalna i poliklonalna antitijela kao što su TMU-Ad02, IP64, KCG 1.1, MRQ60 [83,95]. Kao rezultat reakcija vezivanja antitijela imamo granulirano obojenu citoplazmu. U 11 studija sa 836 ispitanika sa adenokarcinomom pluća, 627 (75%) bilo je pozitivno na Napsin A, dok je 623 (74,4%) pozitivno na TTF-1 [83]. Potrebno je odraditi oba markera jer postoje situacije u kojima se dešava pozitivnot na jedan marker, dok je kod drugog negativan rezultat [96,97].

CK 7 (*Cytokeratin 7*) je keratin sredje veličine sa ekspresijom na bronhialnom i alveolarnom epitelu, dok se CK 20 ne nalazi na respiratornom epitelu. U slučaju da je adenokarcinom TTF-1 negativan za dokazivanje primarne plućne lokalizacije može se koristiti CK 7 koji je pozitivan, uz negativnost na CK 20. Čak 95% adenokarcinoma pozitivno je na CK7, kao i 20% skvamoznih karcinoma [98], te stoga ovaj marker nije preporučeno koristiti za razlikovanje skvamoznog od adenokarcinoma [99].

4.2. Markeri skvamozne diferencijacije

Većina dobro diferentovanih skvamoznih karcinoma ne predstavlja problem za postavljanje dijagnoze, što nije slučaj kod slabo diferentovanih ili nediferentovanih skvamoznih karcinoma gdje ne postoje patohistološke odlike ovih tumora kao što su intercelularni mostići ili keratinizacija. Višeslojni plućni epitel pokazuje visok stepen ekspresije citokeratina velike molekulske mase (*HMW-CKs – high molecular weight cytokeratins*), *p63* i *p40*.

Gen *p63* ima dva promotora koji stvaraju dvije klase proteina: pune dužine TAp63, koji sadrži N-terminalni transaktivacioni domen TA, i izoformu proteina Δ Np63 bez transakcionog domena [100]. Najčešći klon 4A4 prepoznaje oba domena dok *p40* prepoznaje samo Δ Np63 [101,102]. Pored skvamoznih karcinoma pluća detektovana je ekspresija ovog gena još kod tranziciocelularnog karcinoma urotela, karcinoma timusa i bazocelularnog karcinoma kože [103]. *ALK* mutirani adenokarcinomi često pokazuju *p63* ekspresiju [104].

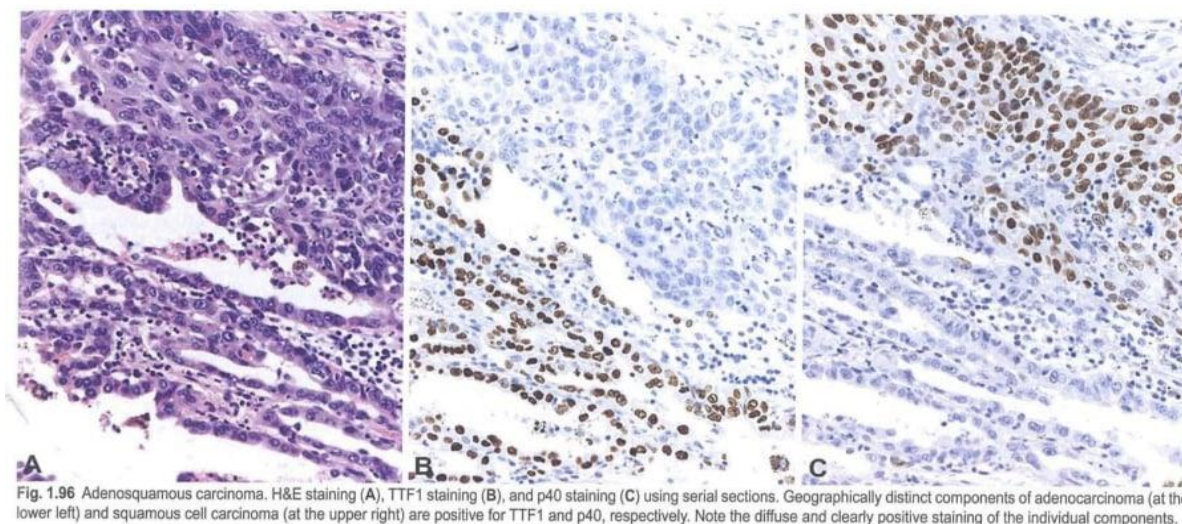
Mnoge studije pokazale su da *p40* ima visoku senzitivnost i specifičnost za skvamoznu diferencijaciju [101,102,105]. Ekspresija *p40* je uglavnom odsutna kod adenokarcinoma. Kod svega 3% adenokarcinoma pronađen je *p40* [102]. Ekspresija *p40* je odličan marker za razlikovanje skvamoznih od adenokarcinoma pluća i ekvivalentna je ekspresiji *p63* kod skvamoznih karcinoma [106].

Antitijela na CK 5/6 reaguju sa istoimenim antigenima na bazalnim ćelijama skvamoznog epitela. Postoji obrnuto proporcionalan odnos između gradusa tumora i CK 5/6 ekspresije, što je veći gradus to je niža zastupljenost ovog markera [107]. Senzitivnost ovog markera kreće se između 53 i 100% . Oko 20% slabo diferentovanih skvamoznih tumora ima <10% CK 5/6 reaktivnost [85]. U istom procentu nalazi se i kod adenokarcinoma, ali je uglavnom fokalna i slaba [89,108-115].

Za nekeratinizirajuće skvamozne karcinoma karakteristično je difuzno pozitivno bojenje skvamoznim markerima, tj. *p40*, *p63*, CK5 ili CK5/6, te negativnost na TTF-1. Nekeratinizirajući skvamozni tumori bi trebali da pokažu difuzno pozitivno bojenje sa *p40*, koje je specifičnije od ostalih markera. Kod keratinizirajućih bi TTF-1 takođe trebao biti negativan [5].

Negativnost *p63* i CK 5/6 isključuje skvamozni čak i ako su TTF-1 i Napsin A negativni. Ovi tumori su uglavnom CK 7 pozitivni i treba razmišljati u pravcu adenokarcinoma [116]. Fokalna ekspresija *p63* ne isključuje adenokarcinom (negativan TTF-1, Napsin A, *p40*, CK 5/6).

Imunofenotip adenoskvamoznih karcinoma bi trebalo da podupire prisustvo dvostruke populacije ćelija u tumoru. Za diferencijaciju morfološki nejasnih komponenti služimo se imunohistohemijskim testovima, obuhvatajući markere i skvamoznih i adenokarcinoma (TTF-1 i *p40* su se pokazali kao najbolji markeri u ovom slučaju) [117,118].

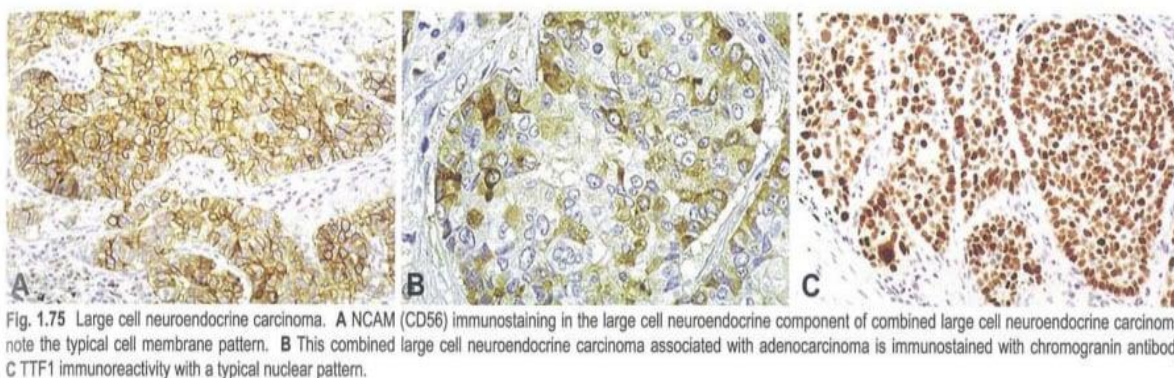


Slika 10. Adenoskvamozni karcinomi- HE bojenje i IHH

4.3. Markeri neuroendokrine diferencijacije

Dijagnoza LCNEC zahtijeva imunohistohemijsku potvrdu, upotrebom markera kao što su: NCAM/CD56 (prisutan kod 92-100% pacijenata), zatim hromogranin A (80-85%), i sinaptofizin (50-60%). Upravo su sinaptofizin i hromogranin A najvjerodostojniji markeri za razlikovanje LCNEC od ne neuroendokrinih tumora [119-124].

Neuroendokrini karcinomi takođe proizvode amin-peptidne hormone, a oko 50% ih pokazuje ekspresiju TTF-1 [119,120,125,126]. Više od 70% ovih karcinoma pokazuje CD117 imunoreaktivnost, što se može povezati sa smanjenom stopom preživljavanja i povećanom stopom relapsa [127,128]. Čitav spektar ovih markera može biti koristan, ali je samo jedan pozitivan marker dovoljan ukoliko je bojenje jasno u više od 10% tumorskih ćelija.



Slika 11. IHH bojenje neuroendokrinih karcinoma

4.4. Markeri za krupnoćelijske karcinome pluća

Novije studije pokazale su da se otprilike 80% tumora iz ove grupe nakon IHH testiranja može klasifikovati kao neki drugi tip- varijanta adenokarcinoma (60%) ili skvamozni karcinom (20%). U pogledu imunohistohemijskih testiranja, nakon analiza senzitivnosti i specifičnosti potrebno je isključiti prisustvo sljedećih markera:

- TTF-1 i napsin A - koji govore u prilog adenokarcinoma
- p40 ili p63 i CK5/6 - koji govore u prilog skvamoznog karcinoma.

Samo oni tumori koji su ili negativni na ove markere ili pokazuju nejasne rezultate mogu da se klasifikuju kao krupnoćelijski karcinomi- nulti tip (TTF-1 i p40 negativan) [65,90,129-132].

5. MOLEKULARNA TESTIRANJA

Molekularnim testovima otkriveno je nekoliko *driver* mutacija gena kod NSCLC, uključujući EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2/HER2, ALK, ROS1, RET, NTRK1 i NRG1. Od svih navedenih mutacija, EGFR i ALK su klinički najznačajnije, zato što su odobreni molekularni *target* lijekovi za pacijente čije tumorske ćelije pokazuju ove mutacije.

Najjača histološko-molekularna veza nađena je kod invazivnog mucinoznog adenokarcinoma kod kog je pronađen visok procenat KRAS mutacija i manjak EGFR mutacija. EGFR i KRAS mutacije, kao i ALK rearanžmani, se mogu vidjeti kod većine podtipova invazivnih adenokarcinoma. EGFR mutacije su najčešće viđene kod nemucinoznih adenokarcinoma koji predominantno imaju lepidnu ili papilarnu formu [133-135]. KRAS mutacije su obično nađene kod solidnih podtipova adenokarcinoma i mogu se prezentovati kod tumora koji produkuju ekstracelularni mucin [136-138]. ALK rearanžmani su većini slučajeva nađeni kod acinarnog podtipa adenokarcinoma [139,140].

5.1. EGFR testiranje

Jedno od najvažnijih otkrića je pronalazak receptora za epidermalni faktor rasta (*epidermal growth factor receptor*- EGFR) kao terapijske mete u liječenju pacijenata sa mutacijama EGFR-a [141]. Epidermalni faktor rasta pripada porodici receptora tirozin kinaze (ErbBs) i ima važnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji i preživljavanju [142].

EGFR mutacije su češće kod žena, nepušača i iz Istočne Azije [143]. Ovi parametri se ne

koriste za selekciju pacijenata koji će primiti terapiju sa TKI [28,141,144].

Test Roche cobas® EGFR v2, zasnovan na RT-PCR u realnom vremenu, pouzdana je opcija za ispitivanje EGFR mutacija u kliničkoj praksi, bilo korištenjem DNK ekstrahirane iz tkiva ili cfDNA dobijene iz plazme. Ovaj test detektuje 43 poznate mutacije na egzonima 18-21 [145]. Kvalitet nekih epitopa DNK / RNK može se izgubiti (u roku od nekoliko sati / dana) u slučaju da se ne iskoriste odmah za testiranje [146]. Rezultati testiranja mogu zavisi i od veličine uzorka kao i od procenta sačuvanih tumorskih ćelija, koji ne bi trebao biti ispod 20% [147].

Test v2 (44)	
Exon	EGFR mutation
Exon 18	G719X
Exon 19	Ex19Del
Exon 20	S768I
	T790M
	Ex20Ins
Exon 21	L858R
	L861Q

EGFR, epidermal growth factor receptor.

Slika 12. Najčešće EGFR mutacije

Preko 90% mutacija očituje se kao delecija na egzonu 19 ili supstitucija na egzonu 21 (L858R), dok su mutacije na egzonu 18 i 20 daleko rjeđe zastupljene [147-153].

Mutacije na egzonu 19 su dobar prognostički pokazatelj zbog boljeg terapijskog odgovora na TKI, dok su mutacije na 21. egzonu imale kao posljedicu povećanu stopu smrtnosti [151]. Pacijenti sa minimalno invazivnim i lepidnim adenokarcinomima svrstani su u grupu niskog rizika sa visokom stopom mutacije EGFR, dok su pacijenti sa mikropapilarnim i solidnim adenokarcinomima klasifikovani su kao visoko rizični sa nižom stopom mutacije EGFR [154].

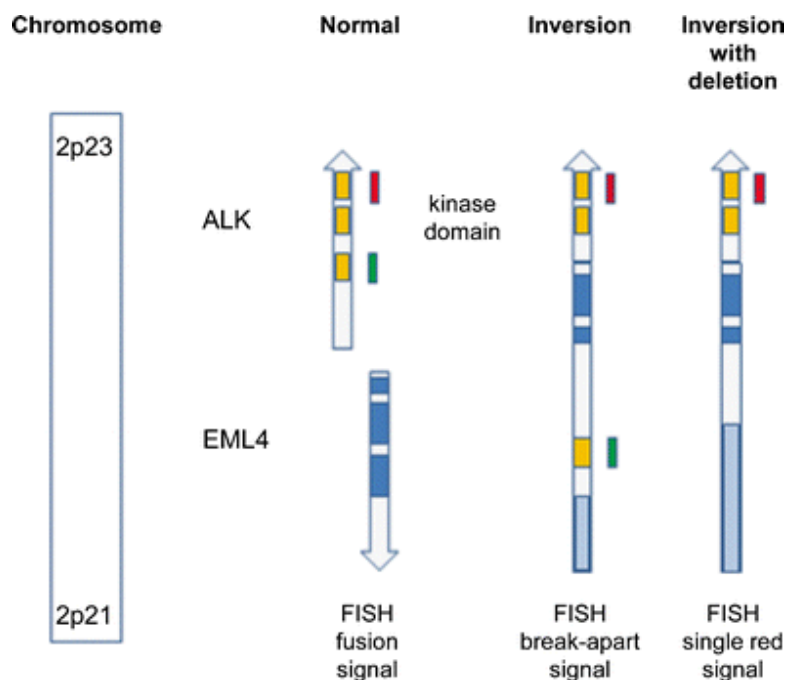
Kao prva linija u liječenju pacijenata sa NSCLC koji imaju mutacije EGFR-a koriste se reverzibilni inhibitori tirozin kinaze (TKI) (erlotinib i gefitinib) i ireverzibilni TKI (afatinib) [141]. Posljednjih godina, brzi razvoj tehnologije *liquid* biopsije omogućio je upotrebu neinvazivnih metoda za praćenje mutacija rezistentnih na lijekove u realnom vremenu. S tim u vezi, razvijena je treća generacija TKI Osimertinib (AZD9291) i Rociletinib (CO-1686) za pacijente sa primarnom rezistencijom na TKI izazvanom T790M EGFR mutacijom [155].

Brojne publikovane studije pokazuju prevalencu EGFR mutacija u rasponu od 7,5% u

Norveškoj [156,157] do 19,8% u Rusiji [158]. Prevalenca EGFR mutacija u Bosni i Hercegovini iznosi oko 9,75%, što je ubraja u grupu nižih prevalenci u Evropi. Za razliku od Evrope učestalost mutacija kod Azijske populacije daleko je veća i iznosi od 42,6% do 66,3% [143,159-161]. Slične studije rađene su i u našem okruženju te su EGFR mutacije pronađene u 15,7% [162] i 19,8% [163] slučajeva u Hrvatskoj, dok je u Srbiji taj postotak 11,7 [164]. Velika INSIGHT studija koja je uključivala uzorke iz šest zemalja Centralne Evrope sa 1785 analiziranih pacijenata, od kojih je 1393 sa adenokarcinomima, pokazuje prevalencu od 13,8 % [165]. Najopsežnija studija u nešto daljem okruženju (Poljska), a u koju je bilo uključeno 2450 uzoraka, govori o prevalenci od 9% [153] što je najbliže prevalenci u našoj državi.

5.2. Anaplastična limfomska kinaza (ALK)

Anaplastična limfomska kinaza (ALK) je enzim kodiran od strane istoimenog ALK gena. Pronađena je prvi put 1994. godine u anaplastičnom krupnoćelijskom non-Hoćkin limfomu [166]. Aktivirajuće mutacije ili translokacije ALK-a identifikovane su kod nekoliko različitih karcinoma, uključujući i NSCLC [167]. Translokacija na kratkom kraku drugog hromozoma (2p) rezultovala je fuzijom ALK-a i EML4 gena (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*), koja se najčešće javlja kod NSCLC [167].



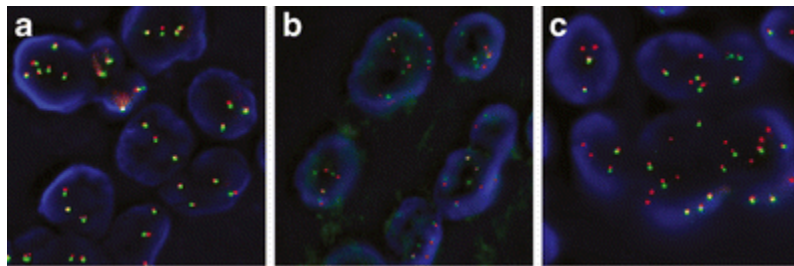
Slika 13. Translokacija EML4-ALK

Rearanžman EML4-ALK prisutan je kod 3-6% NSCLC u zavisnosti od ispitivane populacije i metoda detekcije koje su korištene [167,168,169], a češće se dešava kod nepušača

i pasivnih pušača kao i kod pacijenata sa podtipom adenokarcinoma [170] . Kod NSCLC pronađene su i druge, daleko rjeđe, translokacije sa AML-om kao što su KIF5B (*Kinesin Family Member 5B*) i TFG (*TRK-fused gene*) [171].

5.2.1. Florescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Trenutni dijagnostički pristupi u detekciji ALK rearanžmana uključuju imunohistohemiju (IHH), florescentnu *in situ* hibridizaciju (FISH) kao i reakciju lančane polimerizacije reverznom transkripcijom (RT-PCR) [168]. Trenutno, „zlatnim standardom“ i jedinim klinički odobrenim testom (FDA) za detekciju ALK rearanžmana smatra se Vysis/Abbott ALK FISH test razdvajanja [172,173].



Slika 14. FISH

Ćelije se smatraju ALK FISH pozitivnim kada:

- ≥ 1 skupa crvenih i zelenih signala koji su udaljeni ≥ 2 prečnika signala
- jedan crveni signal bez odgovarajućeg zelenog signala pored spojenih (normalnih) signala .

Uzorak se smatra negativnim ako je < 5 ćelija ($< 10\%$) pozitivno, a pozitivno ako je > 25 ćelija ($> 50\%$) pozitivno. Uzorak se smatra dvosmislenim ako je 5–25 ćelija (10–50%) pozitivnih.

Preporučuje se da uzorak ne prelazi 2cm dužine i 3 mm debljine. Obrađuju se prema standardizovanim protokolima. Od uzoraka se prave presjeci na 3 do 5 μm , obrađuju i na kraju suše na 60°C jedan sat ili na 45°C tokom noći [168]. Maksimalno vrijeme za skladištenje tkiva ili citoloških blokova je 1-6 mjeseci ili 6-12 mjeseci za standardne citološke uzorke kako bi se izbjeglo neuspješno očitavanje ili lažno-pozitivni ili lažno-negativni rezultati [174].

Ovaj test i interpretacijski algoritam dizajnirani su za netaknute formalin fiksirane i parafin ugrađene (FFPE) patohistološke uzorke dobijene biopsijom ili resekcijom [175]. Zaštitni sloj

parafina na histološkim presjecima sprečava gubitak antigenosti fotooksidacijom i isušivanjem tkiva [176].

Test ima i određene nedostatke kao što su posebno dizajnirani optički filteri za očitavanje rezultata, zelena boja blijedi brže od crvene povećavajući vjerovatnoću lažno pozitivnih nalaza.

5.2.2. Imunohistohemija ALK

Upotreba IHH poboljšala je dijagnostičku tačnost u klasifikaciji karcinoma pluća, ali tumačenje rezultata ostaje izazov u nekim slučajevima. Prednosti IHH u odnosu na FISH i RT-PCR su izuzetno mali troškovi, brzina izvođenja testa kao i veoma laka integracija u dijagnostičke protokole. Iako je IHH minimalno kvantitativan test, u praksi se koristi kao semikvantitativan test [177]. Tokom izvođenja testa susrećemo se sa određenim izazovima kao što su priprema tkiva, odabir antitijela, scoring sistem. Iako nije zlatni standard u otkrivanju rearanžmana ALK gena, IHH sa 5A4 i D5F3 antitijelima bila bi od koristi kao skrining metoda iz prethodno navedenih razloga [178,179]. Mnogi autori utvrdili su visoku senzitivnost (90-100%) i specifičnost (87,5-100%) IHH u odnosu na FISH [178-182].

Od izuzetnog je značaja da se uzorak tkiva adekvatno preanalitički obradi. Mogući su lažno-negativni rezultati kod uzoraka gdje je loše urađeno fiksiranje sa formalinom [183]. Koncentracija proteina u rearanžiranom ALK NSCLC je izuzetno niska. Standardna metoda detekcije ALK-a kod anaplastičnog limfoma je nedovoljna za sve slučajeve NSCLC. Trenutno su u upotrebi 3 vrste antitijela: 5A4, ALK1 i D5F3 [184].

Tabela 3. IHH scoring

0	1 (+)	2 (++)	3 (+++)
Bez bojenja	Slabo citoplazmatsko prebojavanje	Umjereno, glatko citoplazmatsko prebojavanje	Intenzivno, granularno citoplazmatsko prebojavanje ($\geq 10\%$ tumorskih ćelija)

5.2.3. Reakcija lančane polimerizacije sa reverznom transkriptazom (RT-PCR)

RT-PCR pruža izuzetno osjetljivu tehniku u kojoj se može otkriti vrlo mali broj molekula RNK. Test se može koristiti na mRNA / cDNA za direktno otkrivanje EML4-ALK. Zbog toga

se koristi kao zlatni standard za procjenu osjetljivosti i specifičnosti IHH [185], FISH [185,186] i CISH [186,187].

Međutim, RT-PCR ima nekoliko nedostataka zbog kojih je malo vjerovatno da će postati standardni test za ovu mutaciju. Potreban je kvalitetan RNK [186]: neki od amplicona su veći od 1.000 bp i zahtijevaju odgovarajuću krioprezervaciju uzoraka tumora koji možda nedostaju u rutinskoj praksi [185]. U odjeljcima FFPE, RT-PCR iznad 300 bp nije pouzdan. Mogu se testirati samo poznate promjene (najmanje 10 je trenutno poznato za ALK) [188].

RT-PCR je pogodna metoda za otkrivanje ALK translokacija pomoću citoloških uzoraka pacijenata sa primarnim karcinomom pluća, posebno kada uzorci tkiva nisu dostupni [189]. Pokazalo se da je RT-PCR test visoko osjetljiv (100%) u poređenju sa FISH i IHH. Sekvenciranje RNK detektovalo je ALK transkripte pune dužine ili EML4-ALK i KIF5B-ALK fuzijske varijante u slučajevima u kojima je ALK RT-PCR test detektovao ALK ekspresiju, ali FISH i IHH su negativni. Ukupna specifičnost RT-PCR testa za otkrivanje ALK u slučajevima bez ekspresije ALK pune dužine bila je 94% u poređenju sa FISH i IHH. Ovi podaci podržavaju ALK RT-PCR test kao visoko efikasan i pouzdan pristup dijagnostičkom skriningu za identifikovanje pacijenata sa ALK NSCLC [190].

5.3. KRAS testiranje

Gen KRAS dobio je naziv po onkogenom virusu (*Kirsten RAt Sarcoma virus*) gdje je prvi put detektovan 1982. godine [191]. Gen je lociran na hromozomu 12 kod ljudi. KRAS daje instrukcije za stvaranje istoimenog proteina koji učestvuje u RAS/MAPK signalnom putu. Protein funkcioniše kao sekundarni glasnik sa GTP-aznom aktivnošću i prenosi signale sa površine ćelije u jedro. Ovi signali podstiču ćeliju na rast, sazrijevanje i diferencijaciju.

Frekvencija KRAS mutacija je između 25-30% [192,193] sa jakom povezanošću sa pušenjem cigareta [194]. Upravo dvije najčešće mutacije kod NSCLC su KRAS i EGFR mutacije [195]. Najzastupljenija KRAS mutacija je G12D gdje je došlo do supstitucije aminokiseline glicin na poziciji 12 sa aspartatnom kiselinom [196].

Karcinomi pozitivni i na KRAS i EGFR imaju <5% terapijski odgovor na TKI [195,197,198]. Nije utvrđena povezanost između ekspresije KRAS mutacija i stope preživljavanja [199], dok je prognoza kod ovih karcinoma i dalje loša [200]. Danas se testiranja na KRAS koristi u svrhu predviđanja ishoda hemoterapije, terapije sa TKI i anti-EGFR monoklonalnim antitijelima [201].

5.4. PD-L1 (Programmed death-ligand 1)

PD-L1 ili CD 274 (*cluster of differentiation 274*) je transmembranski protein kodiran od strane istoimenog gena. Ovaj protein ima važnu ulogu u supresiji imunskog odgovora u stanjima kao što su trudnoća, autoimunske bolesti, tkivnih alograftova [202]. PD-L1 ostvaruje svoju funkciju vezujući se za PD-1, inhibitorni *checkpoint* molekul, koji za posljedicu ima smanjenje stvaranja T- ćelija u limfnim čvorovima. Upravo ovaj mehanizam koriste određene karcinomske ćelije kako bi izbjegle imuni odgovor domaćina [203] .

Tabela 3. Ekspresija PD-L1

EKSPRESIJA PD-L1 KOD KARCINOMA	EKSPRESIJA PD-L1 KOD NORMALNIH ĆELIJA
Karcinom jednjaka i želuca Hepatocelularni karcinom Karcinom pankreasa Karcinom jajnika Karcinom mokraćne bešike Karcinom dojke Karcinom Merkelovih ćelija Kolorektalni karcinom Karcinom pluća	T- ćelije NK ćelije (<i>natural killer cells</i>) Makrofagi B- ćelije Epitelne ćelije Vaskularne endotelne ćelije

Imunohistohemija je najčešći tip PD-L1 testa. Do sada, nisu dokazane povezanosti između ekspresije PD-L1 i pola, starosti, istorije pušenja, histologije tumora (adenokarcinom u odnosu na karcinom skvamoznih ćelija) ili patološkog stepena tumora. U nekoliko studija, visoka ekspresija PD-L1 bila je povezana sa kraćim preživljavanjem u poređenju sa niskom ekspresijom. Ekspresiju PD-L1 regulišu i onkogeni pokretači u NSCLC, kao što su EGFR, EML4-ALK i KRAS [204]. PD-L1 trenutno je jedini biomarker odobren za kliničku upotrebu u monoterapiji prvog i drugog reda i stoga igra centralnu ulogu u donošenju odluka o liječenju pacijenata sa naprednim NSCLC [205].

Većina dokaza ukazuje na to da je verovatnije da će pacijenti sa visokom ili niskom ekspresijom PD-L1 iskusi koristi od lečenja anti-PD-1 / PD-L1 agensima (nivolumab, pembrolizumab, durvalumab, atezolizumab i avelumab) u naprednom NSCLC [206] . Liječenje atezolizumabom rezultovalo je znatno dužim ukupnim preživljavanjem od

hemoterapije zasnovane na platini kod pacijenata sa NSCLC sa visokom ekspresijom PD-L1, bez obzira na histološki tip [207]. Terapija blokadom PD-1 ili PD-L1 poželjnija je opcija liječenja u odnosu na konvencionalnu terapiju za pacijente koji su PD-L1 pozitivni i PD-L1 negativni [208].

6. ZAKLJUČAK

Karcinomi pluća su jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu. Dijagnoza karcinoma pluća uglavnom se kasno postavlja, kada je tumor već u odmaklom stadijumu što predstavlja značajan problem u pogledu terapijskih mogućnosti i prognoze bolesti. Za odabir terapijskih protokola potrebna je histološka i imunohistohemijska diferencijacija karcinoma. U posljednjih nekoliko godina primjećen je napredak na polju genetskih otkrića koji su bili temelj za stvaranje specifične imunoterapije koja je umnogome popravila prognozu bolesti.

7. LITERATURA

[1] Globocan 2020 BiH

[2] Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, et al (2013). Epidemiology of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest 143:e1S-29S.

[3] Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL et al (2008). Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. PloS Med, 5:e185.

[4] Y C Zhou , Y P Lin , Q Li , L Y Ma , X Liu , X X Wang, et al. Analysis of EGFR mutation and clinical features of lung cancer in Yunnan. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2020 Sep 23;42(9):729-734. doi: 10.3760/cma.j.cn112152-20200313-00201.

[5] William D. Travis, Elisabeth Brambilla, Allen P. Burke, Alexander Marx, Andrew G. Nicholson. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2015.

[6] Grapatsas K, Leivaditis V, Tsiologianni Z, et al. Epidemiology, risk factors, symptomatology, TNM classification of Non Small Cell Lung Cancer. An overview while waiting the 8th TNM classification. Oncomedicine 2017; 2:14-23. doi:10.7150/oncm.17097.

[7] T Mairinger. Histology, cytology and molecular diagnostics of lung cancer. Pathologe 2019 Nov;40(6):649-661. doi: 10.1007/s00292-019-00677-8

[8] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med. 350:2129-39.

[9] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. 304:1497-500.

[10] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from „never smokers“ and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA. 101:13306-11.

[11] Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res. 62:6997-7000.

[12] Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. (2011). Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. J Clin Oncol. 29:2046-51.

[13] Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, et al. (2012). Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. Clin Cancer Res. 18:4910-8.

[14] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. (2007) Identification of the transforming EML4-ALK

fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 448:561-6.

[15] Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. (2004) Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*. 431:525-6.

[16] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 131:1190-203.

[17] Lipson D, Capelleliti M, Yelensky R, et al. (2012). Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 18:382-4.

[18] Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. (2012) RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 18:378-81.

[19] Yokota K, Sasaki H, Okuda K, et al. (2012) KIF5B/RET fusion gene in surgically-treated adenocarcinoma of the lung. *Oncol Rep*. 28:1187-92.

[20] Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. (2013) Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangement in lung cancer. *Nat Med*. 19:1469-72.

[21] Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, et al. (2014). CD74-NRG1 Fusions in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 4:415-22.

[22] Shimosato Y, Suzuki A, Hashimoto T, et al. (1980). Prognostic implications of fibrotic focus (scar) in small peripheral lung cancers. *Am J Surg Pathol*, 4:365-73.

[23] Russell PA, Barnelt SA, Walkiewicz M, et al. (2013). Correlation of mutations status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol*, 8:46-8.

[24] Russell PA, Wainer Z, Wright GM, et al. (2011). Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicalpathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol*, 6:1496-504.

[25] Tsuta K, Kawago M, Inoue E, et al. (2013). The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cncer*, 81:371-6.

[26] Travis WD, Rekhtman N (2011). Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Semin Respir Crit Care Med*, 32:22-31.

[27] Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, et al. (2011). Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigmus in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol*, 6:451-8.

[28] Travis WD, Brambilla, Noguchi M, et al. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international

multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6:244-85.

[29] Warth A, Muley T, Meister M, et al. (2012). The novel histological International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol*, 30:1438-46.

[30] Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, et al. (2013). Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol*, 8:52-61.

[31] Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. (2011). Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*, 24:653-64.

[32] Kadota K, Yeh YC, Sima C, et al. (2014) The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Mod Pathol*. 27:690-700.

[33] Travis WD, Brambilla E, Muller-Hernelink HK, et al. (2004). WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart 3rd ed Lyon: IARC.

[34] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. (2013). Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected spec... implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*, 137:665-705.

[35] Cha MJ, Lee HY, Lee KS, et al. (2014). Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: clinical predictors of histopathology and outcome. *J. Thorac Cardiovasc Surg*. 147:921-8.

[36] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*. 83:584-94.

[37] Park SK, Cho LY, Yang JJ, et al. (2010). Lung cancer risk and cigarette smoking, lung tuberculosis according to histologic type and gender in a population based case-control study. *Lung cancer*, 68:20-6.

[38] Guo HR, Wang NS, Hu H, et al. (2004) Cell type specificity of lung cancer associated with arsenic ingestion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13:638-43.

[39] Huang HH, Huang JY, Lung CC, et al. (2013) Cell-type specificity of lung cancer associated with low-dose soil heavy metal contamination in Taiwan: an ecological study, *BMC Public Health*. 13:330.

[40] Martinez VD, Buys TP, Adonis M, et al. (2010) Arsenic-related DNA copy-number alteration in lung squamous cell carcinomas. *Br J Cancer*. 103:1277-83.

- [41] Taeger D, Johnen G, Wiethage T, et al. (2009). Major histopathological patterns of lung cancer related to arsenic exposure in German uranium miners. *Int Arch Occup Environ Health*, 82:867-75.
- [42] Colby TV, Koss MN, Travis WD (1995). *Tumors of the Lower Respiratory Tract. AFIP Atlas of Tumor Pathology*. 3rd ed. Volume 13. Washington, DC: American Registry of Pathology.
- [43] Corrin B, Symmers WSIC (2014). *Systemic Pathology: The Lungs*. Volume 5 3rd ed London: Churchill Livingstone.
- [44] Steger C, Steiner HJ, Moser K, et al. (2010). A typical thymic carcinoid tumour within a thymolipoma: report of a case and review of combined tumours of the thymus. *BMJ Case Rep*.
- [45] Travis WD, Gal AA, Colby TV, et al. (1998). Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification. *Hum Pathol*, 29:272-9.
- [46] Geurts TW, Nederlof PM, van den Brekel MW, et al. (2005) Pulmonary squamous cell carcinoma following head and neck squamous cell carcinoma: metastasis or second primary? *Clin Cancer Res*, 11:6608-14.
- [47] Geurts TW, van Velthuysen ML, Broekman F, et al. (2009) Differential diagnosis of pulmonary carcinoma following head and neck cancer by genetic analysis. *Clin Cancer Res*, 15:980-5.
- [48] Leong PP, Rezai B, Koch WM, et al. (1998) Distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Ins*. 90:972-7.
- [49] van der Sijp Jr, van Meerbeeck JP, Maat AP, et al. (2002). Determination of the molecular relationship between multiple tumors within one patient is of clinical importance. *J Clin Oncol*, 20:1105-14.
- [50] Yanagawa N, Wang A, Kohler D, et al. (2013). Human papilloma virus genome is rare in North American non small-cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer*, 79:215-20.
- [51] Park KS, Liang MC, Raiser DM, et al. (2011). Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle*, 10:2806-15.
- [52] Sutherland KD, Proost N, Brouns I, et al. (2011). Cell of origin of small lung cancer: activation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell*, 19:754-64.
- [53] Fernandez-Cuesta L, Peifer M, Lu X, et al. (2014) Cross-entity mutation analysis of lung neuroendocrine tumors sheds light into their targets. Abstract nr 1531. *Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Apr 5-9; 2014 San Diego, CA.
- [54] Oshiro J, Kusomoto M, Matsuno Y, et al. (2004). CT finding of surgically resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung in 38 patients. *AJR Am J Roentgenol*, 182:87-91

- [55] Nicholson SA, Ryan MR (2000). A review of cytologic findings in neuroendocrine carcinomas including carcinoid tumors with histologic correlation, *Cancer*. 90:148-61.
- [56] Kadota K, Nitadori J, Sima C, et al. (2015) Tumor spread through air spaces is an important pattern of invasion and impacts the frequency and location of recurrences following limited resection for small stage I lung adenocarcinomas. *J Thoracic Oncol*. Forthcoming
- [57] Onozato ML, Kovach AE, Yeap BY, et al (2013). Tumor islands in resected early-stage lung adenocarcinomas are associated with unique clinicopathologic and molecular characteristics and worse prognosis. *Am J Surg Pathol*, 37:287-94.
- [58] Sardari Nia P, Colpaert C, Vermuelen P, et al (2008). Different growth patterns of non-small cell lung cancer represent distinct biologic subtypes. *Ann Thorac Surg*, 85:395-405.
- [59] Sardari Nia P, Van Loo S, Weyler J, et al (2010). Prognostic value of a biologic classification of non-small cell lung cancer into the growth patterns along with other clinical, pathological and immunohistochemical factors. *Eur J Cardiothorac Surg*, 38:628-36.
- [60] Burns TR, Underwood RD, Greenberg SD, et al. (1989). Cytomorphometry of large cell carcinoma of the lung. *Anal Quant Cytol Histol*. 11:48-52.
- [61] Geisinger KR, Stanley MW, Raab SS, et al. (2003) *Modern Cytopathology Philadelphia: Churchill Livingstone*.
- [62] Johnston WW, Elson CE (1991) Respiratory tract. In: Bibbo M, Day L, eds *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia: WB Saunders, pp 325-402
- [63] Silverman JF, Geisinger KR (1996). *Fine needle aspiration cytology of the thorax and abdomen*. New York: Churchill Livingstone.
- [64] Pardo J, Martinez-Penuela AM, Sola JJ, et al (2009). Large cell carcinoma of the lung: an endangered species? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 17:383-92.
- [65] Rekhtman N, Tafe LJ, Chaft JE, et al (2013). Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod Pathol*. 26:511-22.
- [66] Rossi G, Mengoli MC, Cavazza A, et al (2014). Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch*, 464:61-8.
- [67] Barbareaschi M, Cantaloni C, Del Vescovo V, et al (2011). Heterogeneity of large cell carcinoma of the lung: an immunophenotypic and miRNA-based analysis. *Am J Clin Pathol* 136:773-82.
- [68] Monica V, Ceppi P, Righi L, et al (2009). Desmocollin-3; a new marker of squamous differentiation in undifferentiated large-cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol*, 22:709-17.
- [69] Thunnissen E, Boers E, Heidemann DA et al (2012). Correlation of immunohistochemical staining p63 and TTF-1 with EGFR and K-ras mutational spectrum and diagnostic

reproducibility in non small cell lung carcinoma. *Virchows Arch*, 461:629-38.

[70] Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, et al (2012). Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of the lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res*. 18:1167-76.

[71] Gawrychowski J, Brulinski K, Malinowski E, et al. (2005) Prognosis and survival after radical resection of primary adenosquamous lung carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg*. 27:686-92.

[72] Maeda H, Matsumura A, Kawabata T, et al. (2012) Adenosquamous carcinoma of the lung: surgical results as compared with squamous cell and adenocarcinoma cases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 41:357-61.

[73] Shimizu J, Oda M, Hayashi Y, et al (1996). A clinicopathological study of resected cases of adenosquamous carcinoma of the lung. *Chest* 109:989-94.

[74] Takamori S, Noguchi M, Morinaga S, et al. (1991) Clinicopathologic characteristics of adenosquamous carcinoma of the lung. *Cancer*. 67:649-54.

[75] Watanabe Y, Tsuta K, Kusumoto M et al (2014). Clinicopathologic features and computed tomographic findings of 52 surgically resected adenosquamous carcinomas of the lung. *Ann Thorac Surg*, 97:245-51.

[76] Goya T, Asamura H, Yoshimura H, et al. (2005) Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: a Japanese lung cancer registry study. *Lung Cancer*. 50:227-34.

[77] Leslie KO, Wick MR (2005) *Practical Pulmonary Pathology: A diagnostic approach*. Philadelphia: Churchill Livingstone.

[78] da Cunha Santos G, Lai SW, Saiegh MA, et al. (2012). Cyto-histologic agreement in pathologic subtyping of non small cell lung carcinoma: review of 602 fine needle aspirates with follow-up surgical specimens over a nine year period and analysis of factors underlying failure to subtype. *Lung Cancer*. 77:501-6.

[79] Yousem SA, Hochholzer L (1987). Mucoepidermoid tumors of the lung. *Cancer*, 60:1346-52.

[80] Shilo K, Foss RD, Frans TJ, et al (2005). Pulmonary mucoepidermoid carcinoma with prominent tumor-associated lymphoid proliferation. *Am J Surg Pathol*, 29:407-11.

[81] Alexander E. Kalyuzhny. *Immunohistochemistry- Essential Elements and Beyond*, Springer, Switzerland, 2016

[82] Muin SA Tuffaha, Han Guski, Glen Kristiansen. *Immunohistochemistry in Tumor Diagnostics*, Springer, Switzerland 2018

[83] Ordonez NG. Napsin A, expression in lung and kidney neoplasia: a review and update. *Adv Anat Pathol*, 2012; 19:66-73.

- [84] Ordonez NG. Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012; 20:429-44.
- [85] Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J*. 1990;9:3631-9.
- [86] Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26:767-73.
- [87] Boggram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKx2.1/TITFI) gene regulation in the lung. *Clin Sci*. 2009, 116:27-35.
- [88] Matoso A, Singh K, Jacob R, et al. Comparison of thyroid transcription factor-1 expression by 2 monoclonal antibodies in pulmonary and nonpulmonary primary tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010; 18:142-9.
- [89] Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, et al. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocollin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol*. 2011; 6:1190-9.
- [90] Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, et al (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of the lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol*, 24:1348-59.
- [91] Steger CM, Hager T, Ruttman E (2012). Primary cardiac tumours: a single-center 41-year experience. *ISRN Cardiol*, 2012:906109.
- [92] Kadota K, Nitadori J, Sarkaria IS, et al. (2013) Thyroid transcription factor-1 expression is an independent predictor of recurrence and correlates with the IASLC/ATS/ERS histologic classification in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Cancer* . 119:931-8.
- [93] Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, et al. (2005) EGFR mutation in specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 29:633-9.
- [94] Brasch F, Ochs M, Kahne T, et al. Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II pneumocytes of the human lung. *J Biol Chem*. 2003; 278:49006-14.
- [95] Mukhopadhyay , Katzenstein AL. Comparison of monoclonal napsin A, polyclonal napsin A, and TTF-1 for determining lung origin in metastatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2012; 138:703/11.
- [96] Stoll Lm, Johnson MW, Gabrielson E, Askin F, Clark DP, Li QK. The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. *Cancer Cytopathol*. 2010; 118:441-9.
- [97] Yang M, Nonaka D. A study of immunohistochemical differential expression in pulmonary and mammary carcinomas. *Mod Pathol*. 2010; 23:654-61.

- [98] Warth A, Muley T, Herpel E, et al. Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. *Histopathology*. 2012; 61:1017-25.
- [99] Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK 5/6. *Am J Surg Pathol*. 2011; 35:15-25.
- [100] Candi E, Cipollone R, Rivetti D, Gonfloni S, Melino G, Knight R. P63 in epithelial development. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65:3126-33.
- [101] Nonaka D. A study of DeltaNp63 expression in lung non-small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36:895-9.
- [102] Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. P40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2012; 25:405-15.
- [103] Ivan D, Hafeez DA, Prieto VG. Expression of p63 in primary cutaneous adnexal neoplasms and adenocarcinoma metastatic to the skin. *Mod Pathol*. 2005; 18:137-42.
- [104] Yoshida A, Tsuta K, Watanabe S, et al. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer*. 2011; 72:309-15.
- [105] Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, et al. DeltaNp63 (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small biopsies or cellblocks for typing non-small cell lung cancer: a novel two-hit, sparing-material approach. *J Thorac Oncol*. 2012; 7:281-90.
- [106] Khairunisa Ahmad Affandi, Nur Maya Sabrina Tizen, Muaatamarulain Mustangin, Reena Rahayu MdReena Rahayu Md Zin (2018) p40 Immunohistochemistry Is an Excellent Marker in Primary Lung Squamous Cell Carcinoma. *J Pathol Transl Med* 52(5):283-289. doi: 10.4132/jptm.2018.08.14.
- [107] Chen Y, Cui T, Yang L, et al. The diagnostic value of cytokeratin 5/6, 14,17, and 18 expression in human non-small cell lung cancer. *Oncology*. 2011; 80:333-40.
- [108] Loo PS, Thoma SC, Nicolson MC, Fyfe MN; Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol*. 2015; 5:442-7.
- [109] Kargi A, Gurel D, Tuna B. The diagnostic value of TTF-1, Ck 5/6, adn p63 immunostaining in classification of lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007; 15:415-20.
- [110] Khayyata S, Yun S, Pasha T, et al. Value of p63 and CK 5/6 in distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung fine-needle aspiration specimens. *Diagn Cytopathol*. 2009; 37:178-83.
- [111] Kim MJ, Shin HC, Shin KC, Ro JY. Best immunohistochemical panel in distinguishing

adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of lung: tissue microarray assay in resected lung specimens. *Ann Diagn Pathol*. 2013; 17:85-90.

[112] Nicholson AG, Gonzales D, Shah P, et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and p63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol*. 2010; 5:436-41.

[113] Noh S, Shim H. Optimal combination of immunohistochemical markers for subclassification of non-small cell lung carcinomas: A tissue microarray study of poorly differentiated areas. *Lung Cancer*. 2012; 76:51-5.

[114] Ordonez NG. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study. *Mod Pathol*. 2006; 19:417-28.

[115] Pelosi G, Rossi G, Bianchi F, et al. Immunohistochemistry by means of widely agreed-upon markers (cytokeratins 5/6 and 7, p63, thyroid transcription factor-1, and vimentin) on small biopsies of non-small cell lung cancer effectively parallels the corresponding profiling and eventual diagnoses on surgical specimens. *J Thorac Oncol*. 2011; 6:1039-49.

[116] Andre Luis Moreira, Anjali Saqi. *Diagnosing Non-small Cell Carcinoma in Small Biopsy and Cytology*. Springer, London, 2015.

[117] Nonaka D (2012). A study of DeltaNp63 expression in lung non-small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 36:895-9.

[118] Terry J, Leung S, Laskin J et al (2010). Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol*, 34:1805-11.

[119] Rossi G, Marchioni A, Milan M, et al (2004). TTF-1, cytokeratin 7, 34betaE12, and CD56/NCAM immunostaining in the subclassification of large cell carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol*, 122:884-93.

[120] Rossi G, Mengoli MC, Cavazza A, et al (2014). Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch*, 464:61-8.

[121] Travis WD (2010). Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol* 21 Suppl, 7:v165-71.

[122] Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG et al (1991). Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. *Am J Surg Pathol*, 15:529-53.

[123] Travis WD, Rush W, Flieder DB et al (1998). Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol*, 22:934-44.

- [124] Iyoda A, Travis WD, Sarkaria IS, et al. (2011) Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pilmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. *Exp Ther Med.* 2:1041-5.
- [125] Sturm N, Lantuejoul S, Laverriere MH et al (2001). Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34betaE12) expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Hum Pathol*, 32:918-25.
- [126] Sturm N, Rossi G, Lantuejoul S et al (2002). Expression of thyroid transcription factor-1 in the spectrum of neuroendocrine cell lung proliferations with special interest in carcinoids. *Hum Pathol*, 33:175-82.
- [127] Casali C, Stefani A, Rossi G, et al. (2004). The prognostic role of c-kit protein expression in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg.* 77:247-52
- [128] Pelosi G, Masullo M, Leon ME, et al (2004). CD117 immunoreactivity in high-grade neuroendocrine tumors of the lung: a comparative study of 39 large-cell neuroendocrine carcinomas, *Virchows Arch*, 445:449-55.
- [129] Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, wt al. (2012) p40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 25:405-15.
- [130] Mukhopadhyay S, Katzenstein AL (2011). Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol*, 35:15-25.
- [131] Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, et al (2012). DeltaNp63 (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small cell biopsies or cellblocks for lyping non-small cell cancer: a novel two-hit, sparing-material approach. *J Thorac Oncol*, 7:281-90.
- [132] Pelosi G, Rossi G, Bianchi F, et al (2011). Immunohistochemistry by means of widely agreed-upon markers (cytokeratins 5/6 and 7, p63, thyroid transcription factor-1, and vimentin) on small cell biopsies of non-small cell lung cancer effectively parallels the corresponding profiling and eventual diagnoses on surgical specimens. *J Thorac Oncol*, 6:1039-49.
- [133] De Oliveira Duarte Achcar R, Nikiforova MN, Yousam SA (2009). Micropaapillary lung adenocarcinoma: EGFR, K-ras, and BRAF mutational profile. *Am J Clin Pathol.* 131:694-700.
- [134] Motoi N, Szoke J, Riely GJ, et al (2008). Lung adenocarcinoma: modification of the (2004) WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol.* 32:810-27.
- [135] Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, et al. (2005) EGFR mutation in specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 29:633-9.
- [136] Rekhelman N, Ang DC, Riely GJ, et al (2013). KRAS mutations are associated with solid growth patlern and tumor-infiltrating leukocytes in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 26:1307-19.

- [137] Russell PA, Barnelt SA, Walkiewicz M, et al (2013). Correlation of mutations status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol*, 8:46-8.
- [138] Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M et al (2013). Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol*. 8:52-61.
- [139] Leer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, et al (2012). Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol*. 7:348-54.
- [140] Yoshida A, Tsuta K, Watanabe S, et al. (2011) Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer*. 72:309-15.
- [141] Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, et al. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated nonsmall cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomised trials. *Clin Lung Cancer* 2012; 13:107-114
- [142] Wieduwilt M.J, Moasser M.M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(10): 1566-1584. Doi:10.1007/s00018-008-7440-8
- [143] Y C Zhou , Y P Lin , Q Li , L Y Ma , X Liu , X X Wang,et al. Analysis of EGFR mutation and clinical features of lung cancer in Yunnan. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2020 Sep 23;42(9):729-734. doi: 10.3760/cma.j.cn112152-20200313-00201.
- [144] Lee CK, Brown C, Grala RJ, et a. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival:a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105:595-605
- [145] Umberto Malapelle, Rafael Sirera, Eloísa Jantus-Lewintre, Pablo Reclusa, Silvia Calabuig-Fariñas, Ana Blasco, et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017 Mar;17(3):209-215. doi: 10.1080/14737159.2017.1288568.
- [146] Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S (2004) Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 52:893–901
- [147] Aisner DL, Marshall CB. Molecular pathology of non-small cell lung cancer: a practical guide. *Am J clin Pathol* 2012; 138:332-346
- [148] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13:239-246

- [149] Boch C, Kollmeier J, Roth A, et al. The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *MBJ Open* 2013; 3:e002560
- [150] Gahr S, Stoeher R, Geissinger E, et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br J Cancer* 2013; 109:1281-1288
- [151] Hee-Young Yoon , Jeong-Seon Ryu , Yun Su Sim , Dojin Kim , Sung Yong Lee , Juwhan Choi, et al. Clinical significance of EGFR mutation types in lung adenocarcinoma: A multi-centre Korean study. *PLoS One* 2020 Feb 13;15(2):e0228925. doi: 10.1371/journal.pone.0228925.
- [152] Philip TC, Timothy CA. Lung cancer Genotype- Based Therapy and Predictive Biomarkers. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136:1482-1492
- [153] Krawczyk P, Ramlau R, Chorostowska J, et al. The efficacy of EGFR gene mutation testing various samples from non-small cell lung cancer patients:a multicentric retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015; 141:61-68. doi:10.1007/s00432-014-1789-x
- [154] Huiyan Deng , Junying Liu , Xiaojin Duan , Yueping Liu. The relationship between EGFR mutation status and clinic-pathologic features in pulmonary adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2018 Mar; 214(3):450-454. doi: 10.1016/j.prp.2017.09.008.
- [155] Shiyang Yuan , Yeqing Zou , Junping Xie. Progress in Non-invasive Detection of EGFR Mutation in Non-small Cell Lung Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2018 Dec 20;21(12):912-917. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2018.12.09.
- [156] Helland Å, Skaug HM, Kleinberg L, et al. EGFR gene alterations in a Norwegian cohort of lung cancer patients selected for surgery. *J Thorac Oncol.* 2011; 6:947-50. doi:10.1097/JTO.0b013e31820db209.
- [157] Berg J, Fjellbirkeland L, Suhrke P, et al. EGFR mutation testing of lung cancer patients-Experiences from Vestfold Hospital Trust. *Acta Oncol.* 2016; 55:149-55. doi:10.3109/0284186X.2015.1062537.
- [158] Moiseyenko VM, Procenko SA, Levchenko Ev, et al. High efficacy of first-line gefitinib in non-Asian patients with EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Onkologie* 2010; 33:231-8
- [159] Xia N, An J, Jiang QQ, Li M, Tan J, Hu CP. Analysis of EGFR, EML4-ALK, KRAS and c-MET mutations in Chinese lung adenocarcinoma patients. *Exp Lung Res.* 2013 ;39:328-35. doi:10.3109/01902148.2013.819535.
- [160] Gao B, SunY, Zhang J, et al. Spectrum of LKB1, EGFR, and KRAS mutations in Chinese lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2010; 5:1130-5. doi:10.1097/JTO.0b013e3181e05016.
- [161] Huiyan Deng , Junying Liu , Xiaojin Duan , Yueping Liu. The relationship between EGFR mutation status and clinic-pathologic features in pulmonary adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2018 Mar;214(3):450-454. doi: 10.1016/j.prp.2017.09.008.

- [162] Brcic L, Jakopovic M, Misic M, et al. Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. *Diagnostic Pathology* 2016; 11:90. doi:10.1186/s13000-016-0544-9.
- [163] Mohar B, Smojver Ježek S, Rajković Molek K, et al. Detection of an EGFR mutation in cytological specimens of lung adenocarcinoma. *Cytopathology* 2016 18 Mar 2016; doi:10.1111/cyt.12325
- [164] Zaric B, Stojic V, Kovacevic T, et al. Clinical characteristics, tumora, node, metastasis status, and mutation rate in domain of epidermal growth factor receptor gene in serbian patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014; 9:1406-10. doi:10.1097/JTO.0000000000000242.
- [165] Ramlau R, Cufer T, Berzinec P, The INSIGHT Study, et al. Epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small-cell lung cancer in the real-world setting in Central Europe. *J Thorac Oncol.* 2015; 10:1370-4. doi:10.1097/JTO.0000000000000621.
- [166] Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281–1284
- [167] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-566
- [168] Erik Thunnissen, Lukas Bubendorf, Manfred Dietel, Göran Elmberger, Keith Kerr, Fernando Lopez-Rios, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2012 Sep; 461(3):245-57, doi: 10.1007/s00428-012-1281-4
- [169] Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. (2008) Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 14:6618–6624
- [170] Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. (2009) KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:3143–3149
- [171] Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009;115:1723-1733
- [172] Zhenya Tang, Lu Wang, Guilin Tang, Jeffrey Medeiros. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Detecting Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Rearrangment in Lung Cancer: Clinically Relevant Technical Aspects *Int J Mol Sci.* 2019 Aug; 20(16):3939, doi: 10.3390/ijms20163939
- [173] Abbot Molecular, Inc. Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Summary of Safety and Effectiveness Data (SSED), available online: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/P110012b.pdf

- [174] Savic S, Glatz K, Schoenegg R, Spieler P, Feichter G, Tamm M, Bubendorf L (2006) Multitarget fluorescence in situ hybridization elucidates equivocal lung cytology. *Chest* 129:1629–1635
- [175] Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, et al. (2011) Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 35:1226-1234
- [176] Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, et al. (2012) The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 76:1–18
- [177] Prinsen CF, Klaassen CH, Thunnissen FB (2003) Microarray as a model for quantitative visualization chemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:168–173
- [178] Long Jiang , Haihong Yang, Ping He, Wenhua Liang, Jianrong Zhang, Jingpei Li, et al. Improving Selection Criteria for ALK Inhibitor Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pooled-Data Analysis on Diagnostic Operating Characteristics of Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2016 May; 40(5):697-703. doi: 10.1097/PAS.0000000000000604
- [179] Jin Ho Paik , Gheeyoung Choe, Hyojin Kim, Ji-Young Choe, Hyun Ju Lee, Choon-Taek Lee, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 2011 Mar;6(3):466-72. doi: 10.1097/JTO.0b013e31820b82e8
- [180] Eunhee S Yi , Jennifer M Boland, Joseph J Maleszewski, Anja C Roden, Andre M Oliveira, Marie-Christine Aubry, et al.. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011 Mar;6(3):459-65. doi: 10.1097/JTO.0b013e318209edb9
- [181] Anne McLeer-Florin , Denis Moro-Sibilot, Adrien Melis, Dimitri Salameire, Christine Lefebvre, Françoise Ceccaldi, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 2012 Feb;7(2):348-54. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182381535
- [182] Chris M J Conklin , Kenneth J Craddock, Cherry Have, Janessa Laskin, Christian Couture, Diana N Ionescu. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. *J Thorac Oncol* 2013 Jan;8(1):45-51. doi: 10.1097/JTO.0b013e318274a83e
- [183] Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24:1016–1019
- [184] Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011 6:459-465
- [185] Just PA, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-

rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer* 2011 76(3):309-315

[186] Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, Hatanaka Y, Asamura H, Sekine I, et al. Bright-field dual-color chromogenic in situ hybridization for diagnosing echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2011 6:1677-1686

[187] Kim H, Yoo SB, Choe JY, Paik JH, Xu X, Nitta H, et al. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression. *J Thorac Oncol* 2011 6:1359-1366

[188] Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2010 46:1773-1780

[189] Shinji Nakamichi, Masahiro Seike, Akihiko Miyanaga, Mika Chiba, Kuniko Matsuda, Kenichi Kobayashi, et al. RT-PCR for Detecting ALK Translocations in Cytology Samples from Lung Cancer Patients. *Anticancer Res* 2017 Jun;37(6):3295-3299. doi: 10.21873/anticancer.11696

[190] David R Hout, Brock L Schweitzer, Kasey Lawrence, Stephan W Morris, Tracy Tucker, Rosetta Mazzola, et al. Performance of a RT-PCR Assay in Comparison to FISH and Immunohistochemistry for the Detection of ALK in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2017 Aug 1;9(8):99. doi: 10.3390/cancers9080099.

[191] Tsuchida N, Ryder T, Ohtsubo E (1982). Nucleotide sequence of the oncogene encoding p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science*. 217(4563):937-939

[192] Riely G, Kris M, Rosenbaum D, et al. (2008). Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research* 14 (18), 5731-5734.

[193] Riely G, Johnson M, Medina C, et al. (2011). A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *Journal of Thoracic Oncology* 6 (8), 1435-1437.

[194] Dogan S, Shen R, Ang D, et al. (2012). Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clinical cancer research* 18(22), 6169-6177.

[195] Riely G, Marks J, Pao W (2009). KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society* 6 (2), 201-205.

[196] Lozano MD; Zulueta JJ, Echeveste JI, et al. (2011). Assessment of epidermal growth factor receptor and K-ras mutation status in cytological stained smears of non-small cell lung cancer patients: correlation with clinical outcomes. *Oncologist*. 16:877-85.

[197] Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. (2005). KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLOS Medicine*. 2 (1): e17.

- [198] Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T (2010). Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Reviews*. 29 (1):49-60.
- [199] Nagy A, Pongor LS, Szabo A, et al. (2016). KRAS driven expression signature has prognostic power superior to mutation status in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 140 (4): 930-937.
- [200] Gautschi O, Huegli B, Ziegler A, et al. (2007). Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer letters*. 254 (2) 265-273.
- [201] Roberts P, Stinchcombe T (2013). KRAS Mutation: Should We Test for it, and Does It Matter? *Journal of clinical oncology*. 31 (8), 1112-1121.
- [202] Xinxin Zhu, Jinghe Lang. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget* 2017; 8(57):97671-97682. doi: 10.18632/oncotarget.18311.
- [203] Xin Wang, Feifei Teng, Li Kong, Jinming Yu. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* 2016; 9:5023-39. doi: 10.2147/OTT.S105862.
- [204] Maria Bassanelli, Stefano Sioletic, Maurizio Martini, Silvana Giacinti, Antonella Viterbo, Anita Staddon. Heterogeneity of PD-L1 Expression and Relationship with Biology of NSCLC. *Anticancer Res* 2018; 38(7):3789-3796 doi: 10.21873/anticancer.12662.
- [205] Lorena Incorvaia, Daniele Fanale, Giuseppe Badalamenti, Nadia Barraco, Marco Bono, Lidia Rita Corsini, et al. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) as a Predictive Biomarker for Pembrolizumab Therapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Adv Ther* 2019 Oct; 36(10):2600-2617. doi: 10.1007/s12325-019-01057-7.
- [206] Robert Brody, Yiduo Zhang, Marc Ballas, Mohd Kashif Siddiqui, Palvi Gupta, Craig Barker. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer* 2017 Oct;112:200-215. doi:10.1016/j.lungcan.2017.08.005.
- [207] Roy S Herbst, Giuseppe Giaccone, Filippo de Marinis, Niels Reinmuth, Alain Vergnenegre, Carlos H Barrios. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* 2020; 383(14):1328-1339. doi: 10.1056/NEJMoa1917346.
- [208] Xian Shen, Bin Zhao. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* 2018; 362:k3529. doi: 10.1136/bmj.k3529.