



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET

KLINIČKA MEDICINA

**PROTEINSKA EKSPRESIJA I GENSKA AMPLIFIKACIJA  
RECEPTORA HUMANOG EPIDERMALNOG FAKTORA RASTA  
2 (HER2) KOD ADENOKARCINOMA PLUĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

**Prof. dr Živka Eri**

**Doc. dr Ljiljana Vučković**

Kandidat:

**dr Mirjana Miladinović**

Novi Sad, 2018. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET****KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mirjana Miladinović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof.dr Živka Eri Doc. dr Ljiljana Vučković
Naslov rada: NR	Proteinska ekspresija i genska amplifikacija receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) kod adenokarcinoma pluća
Jezik publikacije: JP	Srpski / latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	10 poglavlja, 125 stranica, 33 slike, 4 grafikona, 60 tabela, 310 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Patologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	adenokarcinom; neoplazme pluća; receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2; imunohistohemija; genska amplifikacija; histološki tipovi neoplazmi; polni faktori; starosni faktori; pušenje; stadijum neoplazmi

UDK	616.24-006.6-091.8:577.2
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) pripada porodici receptora protein-tirozin kinaze čija je aktivacija povezana sa proliferacijom malignih ćelija, inhibicijom apoptoze, tumorskom angiogenezom i sposobnosti invazije i metastaziranja. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora može nastati kao posledica amplifikacije gena i/ili transkripcijskih promena. Ekspresija HER2 receptora u humanim tumorima povezuje se sa agresivnijim ponašanjem i lošijom prognozom. Učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u nesitnoćelijskim karcinomima pluća (NSCLC) je najviše zastupljena u adenokarcinomu u odnosu na druge histološke tipove. Identifikacija HER2 pozitivnih NSCLC omogućava određivanje grupe pacijenata koji bi bili kandidati za specifičnu terapiju. Problem predstavlja izbor metode detekcije HER2 receptora i nepostojanje utvrđenog protokola za očitavanje rezultata kao što postoji kod karcinoma dojke i želuca. Osnovni ciljevi ove doktorske disertacije su bili: da se odredi učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u adenokarcinomu pluća; da se uporede rezultati povećane proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene korišćenjem HER2 antitela „Hercep Test Dako“ i „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“ antitela; da se upoređi prisustvo amplifikacije HER2 gena pomoću in situ hibridizacije (ISH) (Dual IHC HER2 kit; Ventana Medical Systems) retestiranjem uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora ocenjena sa 2+ i 3+ dobijena „Hercep Test Dako“ sa prisustvom amplifikacijom HER2 gena na uzorcima koji su pomoću „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“ ocenjeni sa 2+ i 3+; da se upoređi učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora i prisustva HER2 genske amplifikacije kod različitih histoloških podtipova</p>

adenokarcinoma pluća; da se utvrdi da li je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora u adenokarcinomu pluća i/ili prisustvo genske amplifikacije povezano sa demografskim (starost i pol pacijenta) parametrima, pušačkim statusom, pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno stadijumom bolesti. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora u adenokarcinomu pluća iznosi 7,4% za Hercep Test Dako i 2,7% za Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitelo. Kod pozitivne ekspresije slažu se u 2%, dok se kod negativne ekspresije slažu u 91,9% slučajeva, što je ukupno 93,9%. Učestalost amplifikacije HER2 gena kod adenokarcinoma pluća je 17,6%, od toga je kod 2,7% slučajeva prisutna *high grade* amplifikacija. Postoji statistički značajna povezanost između povećane proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene upotrebom HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i amplifikacije HER2 gena. Amplifikacija HER2 gena prisutna je kod 90,9% pacijenata sa povećanom proteinskom ekspresijom HER2 receptora koja se dobije upotrebom HercepTest Dako i kod 75% upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena pomoću HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela je najčešća kod solidnog predominantnog tipa adenokarcinoma u patološkom T2a deskriptoru i IB stadijumu i acinarnog predominantnog tipa adenokarcinoma u patološkom T1b deskriptoru i IA stadijumu. Amplifikacija HER2 gena je najčešća kod solidnog a zatim kod acinarnog i papilarnog predominantnog tipa adenokarcinoma. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena pomoću HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i amplifikacija HER2 gena se najčešće javljaju kod muškaraca, pušača, u starosnoj dobi od 61-70 godina, tumora veličine 31-50 mm, N0 i M0 statusu bolesti, bez prisustva tumorske infiltracije pleure i okolnih struktura.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	16.11.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije /status) KO	

University of Novi Sad  
ACIMSI  
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D Thesis, Medical faculty
Author: AU	Mirjana Miladinović
Mentor: MN	Prof.dr Živka Eri Assist. Prof. dr Ljiljana Vučković
Title: TI	Protein expression and gene amplification of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) with lung adenocarcinoma
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Ph.D Thesis contents: chapters: 10; pages: 125; pictures 33; graphs: 4; tables: 60; literature 310
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathology
Subject, Key words SKW	Adenocarcinoma; Lung Neoplasms; Receptor, ErbB-2; Immunohistochemistry; Gene Amplification; Neoplasms by Histologic Type; Sex Factors; Age Factors; Smoking; Neoplasm Staging

UC	616.24-006.6-091.8:577.2
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Human epidermal growth factor 2 (HER2) is a member of the epidermal growth factor family having tyrosine kinase activity, which is directly linked to malignant cells proliferation, apoptosis inhibition, tumor angiogenesis and ability for invasion and metastasis. Increased protein expression of HER2 receptors can be the consequence of gene amplification and/or transcription changes. Expression of HER2 receptors in human tumors is associated with more aggressive behavior and worse prognosis. Incidence of increased protein expression of HER2 receptors in non-small-cell lung carcinoma (NSCLS) is mainly represented in adenocarcinoma, in comparison with other histological types. Identification of HER2 positive NSCLC enables determination of a group of patients who would be candidates for specific therapy. The problem occurs in choosing the method of detection of HER2 receptors and non-existence of determined protocol for reading the results, as the one ones which exist for breast and gastric carcinoma. The main objectives of this PhD dissertation were: to determine the incidence of increased protein expression of HER2 receptors in lung adenocarcinoma; to compare the results of the increased protein expression of HER2 receptors obtained by using HER2 antibodies "HercepTest Dako" and "Ventana anti-HER2/neu (4B5)" antibodies; to compare the presence of HER2 gene amplification by in situ hybridization (ISH) (Dual IHC HER2 kit: Ventana Medical Systems) by retesting the samples in which the increased protein expression of HER2 receptors was graded with 2+ and 3+, obtained by "HercepTest Dako" with present gene HER2 amplification on samples obtained by "Ventana anti-HER2/neu (4B5) and graded with 2+ and 3+; to compare the incidence of increased protein expression of HER2 receptors and presence of HER2 gene amplification in different histological subtypes</p>

of lung adenocarcinoma; to determine if the increased protein expression of HER2 receptors in lung adenocarcinoma and/or presence of gene amplification is related to demographic (age and sex of the patient) parameters, smoking status, appearance of metastases in regional lymphatic nodes, distant organs, infiltration of pleura and surrounding structures, and stage of the disease. Increased protein expression of HER2 in lung adenocarcinoma is 7.4% for HercepTest Dako and 2.7% for Ventana anti-HER2/neu (4B5) antibody. In positive expression they are correlated in 2%, while in negative expression they are correlated in 91.9% cases, which is overall 93.9%. The incidence of HER2 gene amplification in lung adenocarcinoma is 17.6%, from that in 2.7% of the cases high grade amplification is present. There is a statistically significant correlation between increased protein expression of HER2 receptors obtained by use of HercepTest Dako and Ventana anti-HER2 /neu (4B5) antibody and amplification of HER2 genes. Amplification of HER2 genes is present in 90.9% of patients with increased protein expression of HER2 receptors, which is obtained by using HercepTest Dako and in 75% patients by using Ventana anti-HER2/neu (4B5) antibody. Increased protein expression of HER2 receptors obtained by HercepTest Dako and Ventana anti-Her2/neu (4B5) antibody is most common in solid predominant type of adenocarcinoma in pathological T2a descriptor and IB stadium and acinar predominant type of adenocarcinoma in pathological T1b descriptor and IA stadium. Amplification of HER2 genes is most common in solid, and then in acinar and papillary predominant type of adenocarcinoma. Increased protein expression of HER2 receptors obtained by HercepTest Dako and Ventana anti-HER2/neu (4B5) antibody and amplification of HER2 genes most commonly occurs in men, smokers, at the age of 61-70 years, tumor size 31-50 mm, NO and MO disease status, without presence of tumor infiltration of pleura and surrounding structures.



Accepted on Senate on: AS	16.11.2017.
Defended: DE	
Thesis defend Board: DB	

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA.....	1
1.2. PREVENCIJA NASTANKA KARCINOMA PLUĆA.....	4
1.2.1. Primarna prevencija.....	4
1.2.2. Sekundarna prevencija.....	5
1.3. FAKTORI RIZIKA U NASTANKU KARCINOMA PLUĆA.....	6
1.3.1. Pušenje.....	6
1.3.2. Radon.....	7
1.3.3. Familijarni faktor.....	7
1.3.4. Ishrana.....	8
1.3.5. Alkohol.....	8
1.3.6. Azbest.....	8
1.3.7. Aerozagađenje.....	8
1.3.8. Druge bolesti.....	9
1.4. TNM KLASIFIKACIJA I STADIJUM KARCINOMA PLUĆA.....	9
1.5. ADENOKARCINOM PLUĆA.....	12
1.5.1. Najnovija klasifikacija adenokarcinoma pluća.....	12
1.5.1.1. Adenokarcinom on situ (AIS) i minimalno invazivni adenokarcinom (MIA).14	
1.5.1.2. Invazivni adenokarcinom.....	16
1.5.1.2.1. Lepidično predominantni tip.....	17
1.5.1.2.2. Acinarno predominantni tip.....	17
1.5.1.2.3. Papilarno predominantni tip.....	18
1.5.1.2.4. Mikropapilarno predominantni tip.....	18
1.5.1.2.5. Solidno predominantni tip.....	19
1.5.1.3. Varijante invazivnog adenokarcinoma.....	20
1.5.1.3.1. Invazivni mucinozni adenokarcinom.....	20
1.5.1.3.2. Koloidni adenokarcinom.....	20
1.5.1.3.3. Fetalni adenokarcinom.....	21
1.5.1.3.4. Adenokarcinom sa enteričnom diferencijacijom.....	22
1.5.1.4. Prognostički značaj nove klasifikacije adenokarcinoma pluća.....	23
1.5.2. Morfološka dijagnoza adenokarcinoma pluća.....	23

1.5.3. Imunohistohemijska dijagnoza adenokarcinoma pluća.....	24
1.6. GENETSKE OSNOVE KARCINOMA PLUĆA.....	25
1.6.1. Familija receptora epidermalnog faktora rasta .....	27
1.6.1.1. Interakcije HER receptora i liganda.....	29
1.6.1.2. Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2.....	31
1.6.1.3. Proteinska ekspresija HER2 receptora kod karcinoma pluća.....	32
1.6.1.4. Mutacija i amplifikacija HER2 gena u karcinomu pluća.....	33
1.6.1.5. Metode određivanja HER2 statusa .....	34
1.6.1.5.1. Imunohistohemijska metoda.....	34
1.6.1.5.2. Fluorescentna in situ hibridizacija.....	35
1.6.1.5.3. Hromogena in situ hibridizacija.....	35
1.6.1.5.4. Silver in situ hibridizacija.....	36
1.6.1.6. Značaj proteinske ekspresije HER2 receptora i genske amplifikacije u NSCLC.....	38
1.6.1.7. Anti-HER2 terapija kao terapijska perspektiva kod karcinoma pluća.....	38
2. CILJEVI.....	40
3. HIPOTEZA RADA.....	41
4. MATERIJAL I METODE.....	42
4.1. NAČIN IZBORA, VELIČINA I KONSTRUKCIJA UZORKA.....	42
4.2. PATOHISTOLOŠKA EVALUACIJA TKIVNIH UZORAKA.....	43
4.3. IZRADA TKIVNIH MIKROEREJ (Tissue microarray) KALUPA.....	44
4.4. IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE.....	46
4.4.1. Hercep Test Dako.....	46
4.4.2. Ventana anti-HER2/neu (4B5).....	47
4.4.3. Analiza i interpretacija imunohistohemijski obrađenih uzoraka.....	48
4.5. IN SITU HIBRIDIZACIJA.....	50
4.5.1. Analiza i interpretacija amplifikacije HER2 gena Silver in situ hibridizacijom..	51
4.6. STATISTIČKA OBRADA I ANALIZA PODATAKA.....	54
5. REZULTATI.....	55
5.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA I KARAKTERISTIKE PRIMARNOG TUMORA.....	55
5.1.1. Pol i starost pacijenata.....	55
5.1.2. Pušačke navike.....	56

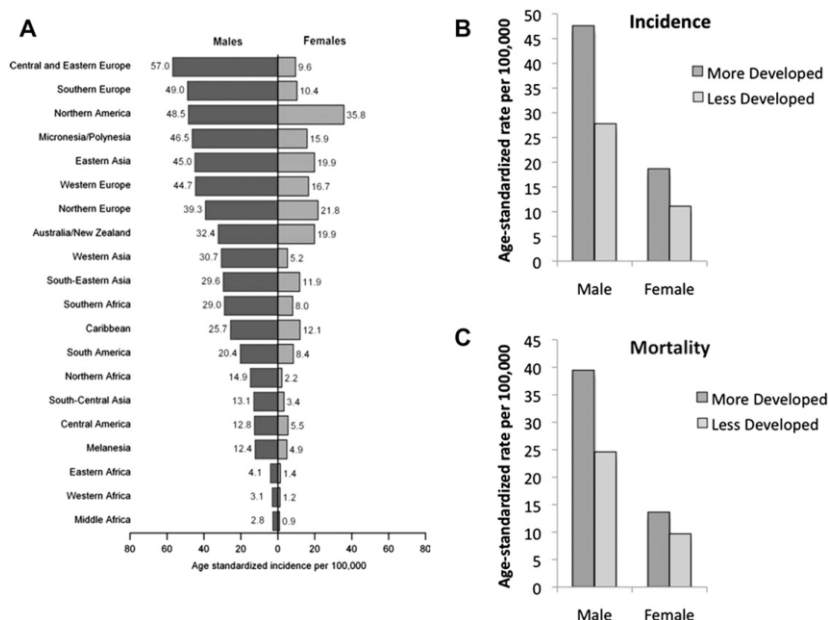
5.1.3. Veličina tumora.....	57
5.1.4. Infiltracija pleure i okolnih struktura (u odnosu na veličinu tumora).....	58
5.1.5. Patološki T deskriptor, status limfnih čvorova (N) i prisustvo metastaza (M)....	59
5.1.6. Stadijum bolesti.....	60
5.1.7. Predominantni histološki tip.....	61
5.1.7.1. Povezanost predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama pacijenata.	62
5.1.7.2. Povezanost predominantnog tipa sa karakteristikama primarnog tumora....	64
5.1.8. Prognostičke grupe.....	68
5.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA EVALUACIJA PROTEINSKE EKSPRESIJE HER2 RECEPTORA.....	68
5.2.1. Hercep Test Dako.....	69
5.2.2. Ventana anti-HER2/neu (4B5).....	74
5.3. ANALIZA DOBIJENIH REZULTATA PROTEINSKE EKSPRESIJE HER2 RECEPTORA DOBIJENE KORIŠĆENJEM HER2 ANTITELA „Hercep Test Dako“ i „Ventana anti-HER2/neu (4B5).....	79
5.4. AMPLIFIKACIJA HER2 GENA POMOĆU IN SITU HIBRIDIZACIJE.....	80
5.4.1. Amplifikacija HER2 gena kod uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena korišćenjem Hercep Test Dako.....	85
5.4.2. . Amplifikacija HER2 gena kod uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena korišćenjem Ventana anti-HER2/neu (4B5) .....	86
5.5. ANALIZA AMPLIFIKACIJE HER2 GENA KOD PACIJENATA SA POVEĆANOM PROTEINSKOM EKSPRESIJOM HER2 RECEPTORA OCENJENOM SA 2+ i 3+ PRIMENOM “Hercep Test Dako“ I „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“.....	87
6. DISKUSIJA.....	89
7. ZAKLJUČCI.....	105
8. PRILOG.....	106
9. LITERATURA.....	107
10. LISTA SKRAĆENICA .....	124

# 1. UVOD

## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA

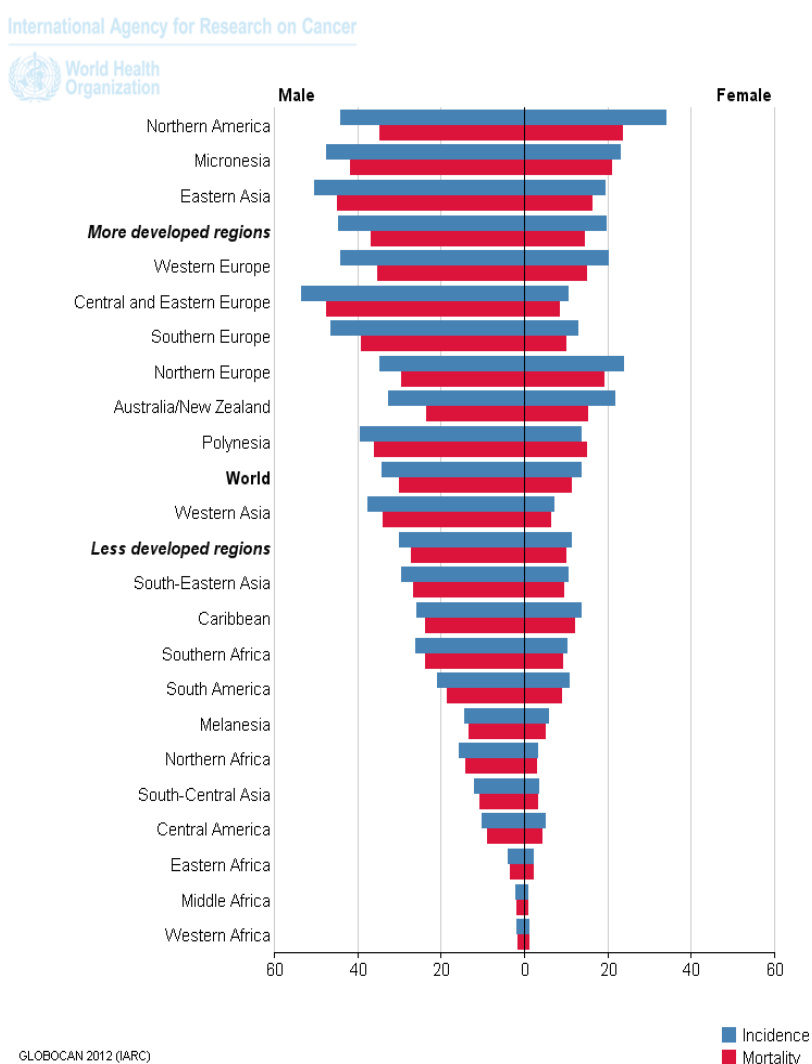
Karcinom pluća je najčešći uzrok oboljevanja i umiranja od malignih tumora širom sveta, a njegova učestalost je u stalnom porastu. Procenjeno je da je karcinom pluća uzrok smrtnosti kod 159.260 slučajeva u 2014. godini, što čini 27% od ukupnog broja umrlih od malignih tumora u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (1). Nestnoćelijski karcinomi pluća (NSCLC) čine oko 85% svih karcinoma pluća, a adenokarcinom je najčešći histološki tip (2). Najčešće obolevaju stariji od 60 godina (3, 4) sa većom zastupljenošću kod muškaraca u odnosu na žene zbog aktuelnih trendova u pušenju (5). Uprkos ulaganju svih napora u ranom otkrivanju i lečenju karcinoma pluća, petogodišnje preživljavanje je oko 15,7% (6).

U 2008. godini karcinom pluća je u svetu bio najčešće dijagnostikovani karcinom i najčešći uzrok smrtnosti od karcinoma kod muškaraca (7). Kod žena je karcinom pluća bio na četvrtom mestu po učestalosti, a na drugom mestu po smrtnosti od malignih bolesti. Ukupno je bilo 1,6 miliona novih slučajeva (13% od ukupnog broja) i 1,4 miliona smrtnih slučajeva od karcinoma pluća (18% od ukupnog broja). Stopa incidence i mortaliteta karcinoma pluća su bili najveće u SAD i razvijenim zemljama, dok su nerazvijena geografska područja, uključujući Centralnu Ameriku i većinu Afrike imala nižu stopu incidence (Grafikon 1- A). Razvijene zemlje imaju veću stopu incidence i mortaliteta karcinoma pluća kod oba pola od manje razvijenih zemalja (Grafikon 1- B,C). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) procenjuje da će mortalitet od karcinoma pluća širom sveta nastaviti da raste kao rezultat globalne upotrebe duvana, posebno u Aziji (8).



Grafikon 1. Standardizovana stopa incidence i mortaliteta uzrokovana karcinomom pluća kod muškaraca i žena u Svetu, 2008. (A). Incidenca i mortalitet uzrokovani karcinomom pluća u razvijenim i manje razvijenim zemljama kod muškaraca i žena (B, C). (Izvor: Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69–90.)

U 2012. godini karcinom pluća je bio u svetu najčešći karcinom kod muškaraca (1,2 miliona ili 16,7% od ukupnog broja) sa najvišom stopom učestalosti u centralnoj i istočnoj Evropi (53,5 na 100.000) i istočnoj Aziji (50,4 na 100.000), dok je najniža stopa učestalosti bila u srednjoj i zapadnoj Africi (2,0 i 1,7 na 100.000) (9). Kod žena je karcinom pluća bio na četvrtom mestu po učestalosti posle karcinoma dojke, debelog creva i grlića materice sa najvišom stopom učestalosti u Severnoj Americi (33,8 na 100.000) i severnoj Evropi (23,7 na 100.000) i najnižom stopom učestalosti u zapadnoj Africi i Bliskom Istoku (1,1 i 0,8 na 100.000). Ukupno je bilo 1,8 miliona novih slučajeva (12,9% od ukupnog broja) i 1,59 miliona smrtnih slučajeva od karcinoma pluća (19,4% od ukupnog broja) (Grafikon 2).



Grafikon 2. Stopa učestalosti i mortaliteta uzrokovana karcinomom pluća kod muškaraca i žena u Svetu (Izvor: GLOBOCAN 2012)

U 2014. godini zabeleženo je 224.100 novoobolelih i 159.260 umrlih od karcinoma pluća. U periodu od 2010. do 2014.godine u SAD je zabeležen pad incidence i mortaliteta od karcinoma pluća kao rezultat uspešno sprovedene kampanje protiv pušenja. Smanjenje incidence se javljalo 5 godina posle prestanka pušenja (10), a posle 10 godina bivši pušači su imali 50% manji rizik da obole od pušenja u odnosu na osobe koje su nastavile da puše (11).

Stopa incidence karcinoma pluća se razlikuje i po etničkoj pripadnosti. U 2009. godini Afroamerikanci su imali najveću stopu incidence 69 na 100.000, dok su Španci imali najnižu stopu od 30 na 100.000 (12).

Stope incidence kod muškaraca na jugu i u zemljama istočne Evrope, Japanu i Kini i za žene iz najrazvijenijih zemalja i dalje rastu ili su dostigle plato (13-17). Podaci o trendu su manji za manje razvijene zemlje ali dokazi upućuju na to da stopa incidence karcinoma pluća u Latinskoj Americi raste (18) i očekuje se povećanje incidence karcinoma pluća u Aziji i Africi, posebno kod muškaraca (19).

Karcinom pluća je kod oba pola na vrhu liste po broju godišnje procenjenih smrtnih slučajeva, i to 85.600 ili 28% svih smrtnih slučajeva karcinoma za muškarce i 71.340 ili 26% svih smrtnih slučajeva karcinoma za žene (20).

*Siegel i sarad.* (20) su 2011. godine u pregledu statistike umrlih od karcinoma ukazali na smanjenje stope mortaliteta od karcinoma pluća kod muškaraca za 2,0% godišnje u periodu od 1994. do 2006. godine. Kod žena je stopa mortaliteta karcinoma pluća nastavila da raste za 0,3% godišnje u periodu od 1995. do 2005. godine, dok podaci iz perioda od 2003. do 2006. godine pokazuju ohrabrujući trend sa početkom u padu od 0,9% godišnje. Učestalost karcinoma pluća kod žena je u poslednjih nekoliko decenija opala sa 5,6% između 1975. i 1982. godine, na 3,4% između 1982. i 1990. godine, 0,4% između 1991. i 2006. godine sve do -2,3% od 2006. do 2008. godine. Zbog promene u incidenci karcinoma pluća kod žena, smrtnost od karcinoma pluća se prvi put smanjuje posle više od jedne decenije nakon smanjenja kod muškaraca (21).

U Evropi najviša stopa učestalosti karcinoma pluća 2012. godine je za muškarce bila u Mađarskoj (76,6 na 100.000), Makedoniji (71,3 na 100.000) i Srbiji (70,3 na 100.000), dok je najniža stopa učestalosti zabeležena na Kipru i u Švedskoj (26,0 i 19,4 na 100.000) (9).

Najviša stopa učestalosti karcinoma pluća u Evropi za 2012. godinu za žene je bila u Danskoj (37,6 na 100.000), Mađarskoj (33,2 na 100.000) i Holandiji (31,5 na 100.000), dok je najniža stopa učestalosti zabeležena u Belorusiji i Ukrajini (6,2 i 6,1 na 100.000) (9).

Srbija se ne razlikuje od ostalih zemalja u razvoju u pogledu vodećih lokalizacija karcinoma. U Srbiji godišnje oboli oko 25.000 osoba od malignih bolesti. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „ dr Milan Jovanović Batut“ u 2012. godini je od malignih bolesti obolelo 26218 osoba, a umrla 15231 osoba. Od karcinoma pluća obolelo je 4076 osoba (3117 muškaraca i 959 žena), a umrla 3541 osoba (2588 muškaraca i 963 žene). Kod muškaraca karcinom pluća je na prvom mestu po učestalosti oboljevanja u odnosu na sve maligne bolesti i čini 22,5% , a iza njega su karcinom prostate (12,6%) i karcinom kolorektuma (12,4%). Kod žena karcinom pluća je po učestalosti oboljevanja na četvrtom mestu i čini 7,8% posle karcinoma dojke (25,8%), karcinoma kolorektuma (8,5%) i karcinoma grlića materice (8,0%). Standardizovana stopa incidence karcinoma pluća kod muškaraca iznosila je 65,0 na 100.000, dok je kod žena iznosila 18,2 na 100.000. Karcinom pluća je vodeći uzrok mortaliteta obolelih od malignih bolesti kod muškaraca i iznosi 29,8%, dok je kod žena na

drugom mestu i iznosi 14,7% iza karcinoma dojke (18%). Standardizovana stopa mortaliteta karcinoma pluća kod muškaraca iznosila je 51,6 na 100.000, a kod žena 17,1 na 100.000. Muškarci su najčešće obolevali u prvoj polovini sedme decenije a žene u šestoj deceniji. U osmoj deceniji je zabeleženo najviše umrlih i muškaraca i žena (22).

U Vojvodini je prema podacima Registra malignih i benignih tumora pluća u periodu od 2002. do 2012. godine ukupno registrovano 16 994 malignih tumora pluća sa udelom 76,63% kod muškaraca i 23,77% kod žena. Stopa incidence beleži rast i kod muškaraca (sa 74,09/100.000 na 82,02/100.000) i kod žena (sa 15,57/100.000 na 27,0/100.000). Kod muškaraca karcinom pluća je vodeći uzrok mortaliteta obolelih od malignih bolesti (32,6%) i drugi najčešći uzrok smrtnosti kod žena (14,6%) iza karcinoma dojke (18,3%). Stopa mortaliteta u istom periodu beleži rast i kod muškaraca (sa 64,30/100.000 na 72,20/100.000) i kod žena (sa 12,72/100.000 na 21,72/100.000) (23, 24).

Incidencija i mortalitet uzrokovan karcinomom pluća su u stalnom porastu od tridesetih godina prošlog veka, pretežno zbog popularnosti pušenja cigareta (25). U poslednjih 100 godina karcinom pluća se transformisao iz retke bolesti u globalni problem (26). Uloženi naponi za poboljšanje ishoda nisu doveli samo do boljeg razumevanja etiologije tumora pluća nego do boljeg razumevanja histoloških i molekularnih karakteristika individualnih karcinoma pluća.

## **1.2. PREVENCIJA NASTANKA KARCINOMA PLUĆA**

Najznačajniji faktor rizika za nastanak karcinoma pluća je pušenje cigareta sa relativnim rizikom od 20% do 25% i pripisivim rizikom od 85% do 90% (27). Drugi značajniji faktori koji doprinose nastanku karcinoma pluća su duvanski dim, profesionalno izlaganje azbestu, radonu i ishrana. Incidencija karcinoma pluća a samim tim i smrtnost od karcinoma pluća može se smanjiti sprečavanjem inicijacije pušenja, prestankom pušenja, ranim otkrivanjem, lečenjem bolesti i hemoprevencijom (27).

### **1.2.1. Primarna prevencija**

Primarna prevencija obuhvata sve mere koje se preduzimaju, a mogu sprečiti nastanak ove, potencijalno preventabilne, maligne bolesti u opštoj populaciji. Mere koje se mogu preduzeti su uticaj na smanjenje ili eliminaciju faktora rizika za nastanak karcinoma pluća, kao i prihvatanje zdravih stilova života što većeg broja pojedinaca (28).

Primarna prevencija karcinoma pluća znači pre svega sprečavanje inicijacije pušenja i prestanak pušenja kao glavnog faktora rizika za nastanak bolesti. Zbog sve većeg broja ljudi koji širom sveta nastavljaju da puše naponi za sprečavanje inicijacije pušenja posebno kod tinejdžera i dece su od izuzetnog značaja. Pored toga, prestajanje pušenja kao druga metoda primarne prevencije mora biti kontinuirano ojačana. Pušači koji prestanu da puše više od 15 godina imaju smanjenje rizika od 80% do 90% za nastanak karcinoma pluća u poređenju sa osobama koje i dalje puše. Pušači koji prestanu da puše čak i u srednjem dobu izbegavaju većinu svog kasnijeg rizika za nastanak karcinoma, a prestankom pušenja pre srednjih godina



izbegava se više od 90% rizika koji se može pripisati duvanu (29). Rizik za nastanak karcinoma pluća kod bivših pušača se smanjuje sa dužim trajanjem apstinencije pušenja (30). Rizik za nastanak karcinoma pluća kod pasivnih pušača koji žive sa pušačem povećan je za čak 20–30% (28).

Mere primarne prevencije su intervencije na nivou pojedinaca, na nivou škole i zajednice u vidu: unapređenja i primene zakona i drugih propisa kako bi sva javna i radna mesta bila bez duvanskog dima, podizanje svesti stanovništva o štetnosti pasivnog pušenja kroz medijske kampanje i edukativne programe, podizanje nivoa znanja u populaciji o štetnosti pušenja, sprovođenje odredbi Zakona o zabrani prodaje duvanskih proizvoda maloletnim licima, sprovođenje odredbi Zakona o zabrani reklamiranja i promocije duvanskih proizvoda, kao i sponzorstva javnih događaja od strane duvanske industrije, podizanje cena duvanskih proizvoda, psihosocijalni tretman i farmakoterapija u lečenju zavisnosti od pušenja (31, 32).

Prihvatanjem do sada objavljenih rezultata širom sveta koji govore da se zloupotreba duvana ne može lako i brzo eliminisati dat je akcenat na područje hemoprevencije karcinoma pluća. Hemoprevencija je upotreba specifičnih prirodnih ili sintetičkih hemijskih agenasa za inhibiciju razvoja karcinoma blokirajući oštećenje DNK koje inicira karcinogenezu (33). Hemoprevencija se može primeniti za prevenciju nastanka karcinoma pluća kod osoba sa poznatim faktorima rizika (primarna hemoprevencija), kod osoba sa premalignim promenama (sekundarna hemoprevencija) ili kod osoba sa prethodno dijagnostikovanim karcinomom i kurativnim tretmanom (tercijarna hemoprevencija) (27). Hemoprevencija se koristi sa uspehom kod karcinoma dojke (tamoxifen), karcinoma prostate (finasterid) i karcinoma debelog creva (celokoksib), međutim do sada se nijedan hemijski agens nije pokazao kao efikasna hemoprevencija za karcinom pluća (34, 35). U toku su studije novih hemijskih agenasa i procenjivanje njihove efikasnosti u hemoprevenciji, a kontrola duvana i prestanak pušenja ostaju i dalje glavni oblici prevencije karcinoma pluća.

### **1.2.2. Sekundarna prevencija**

Rano otkrivanje ili skrining karcinoma pluća predstavlja sekundarnu prevenciju. Skrining je kod karcinoma pluća kontroverzno pitanje. Za sada ne postoji jedinstven ustanovljen test koji bi bio standard za detekciju karcinoma pluća (28). Preporuka je da se kod pacijenata sa visokim rizikom za karcinom pluća, primenjuje skrining i to je poželjno u sklopu dobro dizajniranih kliničkih studija (36). Dugogodišnji pušači, posebno od svoje 55-te godine života, trebalo bi da odlaze na redovne preglede, tj. na niskodozni skener pluća (CT) najmanje jednom u dve godine, a poželjno bi bilo jednom godišnje (37). Sva dosadašnja istraživanja pokazuju da daleko duže žive pacijenti kod kojih je karcinom pluća otkriven u ranom stadijumu. Ukoliko se bolest dijagnostikuje u početnoj fazi, lečenje je efikasnije i jeftinije.

### 1.3. FAKTORI RIZIKA U NASTANKU KARCINOMA PLUĆA

#### 1.3.1. Pušenje

Duvan je prvobitno žvakan u Kolumbiji i bio je deo kulturne i ekonomske strukture ove zemlje. Sredinom XIX veka postao je široko dostupan u formi cigareta nakon razvoja mašina za zavijanje cigareta (8).

Pre Prvog svetskog rata, upotreba cigareta u SAD je bila skromna. Prosečna odrasla osoba pušila je manje od 100 cigareta godišnje u 1900. godini, a 50 godina kasnije ovaj broj je porastao na oko 3500 cigareta po osobi godišnje i dostigao maksimum 1960-ih na oko 4400 cigareta po osobi godišnje (38).

Prvi naučni izveštaj koji povezuje pušenje cigareta sa povećanim rizikom od prerane smrti objavljen je 1938. godine (39). *Ochsner* i *DeBakey* su 1941. godine u svom radu naveli sledeće "naše definitivno uverenje je da je povećanje incidence karcinoma pluća u velikoj meri rezultat povećanja pušenja" (40). Nakon toga objavljen je veći broj studija koje ukazuju na uzročnu povezanost pušenja i nastanka karcinoma pluća (41). Kod ljudi koji nisu nikada pušili ali koji su živeli sa pušačem relativni rizik od nastanka karcinoma pluća je između 1.14 i 5.20 (42, 43), a pasivno pušenje u toku detinjstva povećava rizik za nastanak karcinoma pluća u odraslom dobu za 3,6 puta (44).

Prema podacima istraživanja Instituta za javno zdravlje "Dr Milan Jovanović Batut" sprovedenog 2014. godine u Srbiji od ukupnog broja ispitanika najveći broj (49%) nije nikada pušio, dok je 37% bilo u kategoriji pušača, tj. pušili su povremeno ili svakodnevno, pri čemu je bio veći procenat muškaraca koji puše u poređenju sa ženama. Sve veći broj pušača je registrovan među mladima, i to 25% u starosnoj dobi od 18-29 godina. Najveći procenat po 36% je bio u starosnim grupama 30-44 godine i 45-59 godina, dok je 22% pušača bilo zastupljeno kod osoba starijih od 60 godina. Od ukupnog broja pušača i bivših pušača 13% je navelo da je ograničenje mogućnosti pušenja na javnim mestima uticalo na to da prestanu da puše, dok je 14% iz istog razloga smanjilo broj cigareta koje popuše u toku dana. Podaci ukazuju na to da svaki drugi pušač ima želju da prestane da puši, a kao glavnu prepreku za prestanak pušenja 72% pušača navodi jaku naviku (45).

Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je identifikovala najmanje 50 kancerogena u duvanskom dimu (46, 47). Policiklični aromatični ugljovodonici, kancerogena jedinjenja prisutna u duvanskom dimu, indukuju mutaciju p53 gena i dovode do disregulacije ćelijskog ciklusa i indukuju karcinogenezu (48). N-nitroso jedinjenja su još jedna glavna grupa hemikalija pronađenih u duvanskom dimu i mogu se naći u urinu pušača (49). Povećanje nitrozamina je uzrok promene dominantnog ćelijskog tipa karcinoma pluća od skvamoznog do adenokarcinoma. NNK (4-(metilnitrozoamino)-1(3-piridil)-1-butanone) je

povezan sa mutacijama DNK što rezultira aktiviranjem K-ras onkogen (50, 51). Aktivacija K-ras onkogen otkrivena je kod 24% osoba obolelih od adenokarcinoma pluća (52) i prisutna je u adenokarcinomu pluća kod bivših pušača, što ukazuje na to da takve mutacije predstavljaju uvod u karcinogenezu i sa prestankom pušenja duvana (53). Pored toga, specifična hemijska komponenta duvanskog dima, benzo [a] piren metabolit, može oštetiti različite p53 tumor-supresorne genske lokuse za koje se zna da su mutirani u približno 60% slučajeva primarnog karcinoma pluća. (54).

Rizik za nastanak karcinoma pluća je proporcionalan količini potrošnje cigareta, jer faktori, kao što je broj pakovanja cigareta po danu, dužina pušačkog staža, stepen inhalacije, količina katrana i nikotina u cigaretama, upotreba nefiltriranih cigareta, su važni u proceni rizika (55, 56).

### 1.3.2. Radon

Radon se smatra drugim najvažnijim uzrokom karcinoma pluća. Procenjeno je da je radon odgovoran za 2–9% pojava karcinoma pluća u zemljama Evrope. Radon (radon 222) je prirodni proizvod raspadanja radijuma 226, koji je i sam proizvod raspadanja uranijuma 238. Uran i radijum su prisutni u zemljištu i stenama u visokim koncentracijama. Dokazi iz epidemioloških studija pokazuju linearnu povezanost između izloženosti radona kod podzemnih rudara i rizika za nastanak karcinoma pluća (57-60). Agencija za zaštitu životne sredine je utvrdila da će radon biti drugi vodeći uzrok karcinoma pluća posle pušenja cigareta (61). Povećan rizik pripisan radonu je usled difuzije radona iz zemljišta. Inhalirani radon ima kancerogeno dejstvo na pluća zbog emisije  $\alpha$  čestica nakon raspadanja (62, 63) i dodatno ima sinergistički efekat sa inhalacijom duvanskog dima (64).

### 1.3.3. Familijarni faktori

Povećan rizik za nastanak karcinoma pluća imaju osobe sa porodičnom istorijom ranog karcinoma pluća, pre 60 godine života (65). Dvostruko povećan rizik za nastanak karcinoma pluća imaju nepušači sa porodičnom istorijom karcinoma pluća (66). *Bailey-Wilson i sarad.* (67) su koristeći pristup porodičnim vezama prvi prijavili povezanost familijarnog karcinoma pluća sa promenama lokusa 6q23-25p (146cM-164cM). Nakon toga su objavljene studije koje pokazuju povezanost familijarnog karcinoma pluća sa promenama lokusa 6q23-25p i promenama T790M u receptoru epidermalnog faktora rasta EGFR (68, 69, 70). *Amos i sarad.* (71) su identifikovali lokus koji bi mogao imati značajnu ulogu u nastanku karcinoma pluća (15q25.1), koji sadrži nikotinske gene koji kodiraju acetilholinski receptor. Dodavanje istorije pušenja na učinak ovog nasleđa povezano je sa 3 puta većim rizikom od karcinoma pluća. Sa napretkom nauke i tehnologije moguće je identifikovati ciljne podgrupe koje imaju genetski visok rizik za nastanak karcinoma pluća i sprovesti specifične intervencije uključujući intenzivne napore u prestanku pušenja, sprovođenje skrininga i preventivnih programa.

#### 1.3.4. Ishrana

Voće i povrće kao bogat izvor vitamina i drugih mikronutritienata, korisni su u održavanju i unapređenju zdravlja i smanjenju rizika od nastanka karcinoma pluća i drugih malignih tumora (72-75). Pokazalo se da niske serumske koncentracije antioksidanata, kao što su vitamini A, C i E su povezane sa razvojem karcinoma pluća (76, 77). Vitamin A biljnog porekla, odnosno karotenoidi imaju protektivni efekat za nastanak karcinoma pluća, dok je za  $\beta$ - karoten dokazano da ima najveći zaštitini efekat (78). Određeni prehrambeni proizvodi, uključujući crveno meso, mlečni proizvodi, zasićene masti, lipidi, hrana koja sadrži nitrozodimetilamine i nitrite koji se nalaze u salamama i dimljenim mesnim proizvodima povećavaju rizik za nastanak karcinoma pluća (79-84). Opšta preporuka većine studija je uravnotežen unos voća i povrća u ishranu, uključujući i one koje sadrže  $\beta$ - karoten jer dosadašnje studije nisu pokazale značajniji efekat hemoprevencije suplementacijom vitaminima.

#### 1.3.5. Alkohol

Analizom 7 prospektivnih studija sa 399.767 učesnika i 3137 slučajeva karcinoma pluća, ustanovljeno je da je veći rizik za nastanak karcinoma pluća kod osoba koje su konzumirali najmanje 30 g alkohola dnevno u odnosu na osobe koje su se uzdržavale od alkohola (85).

#### 1.3.6. Azbest

Azbest je najpoznatiji i najčešći profesionalni kancerogen koji dovodi do nastanka karcinoma pluća (86, 87). Azbest se komercijalno koristi od kasnih 1800-ih, a njegova čvrstina i otpornost na visoke temperature učinile su ga korisnim u građevinskim i izolacionim materijalima. Profesionalno izlaganje azbestu dovodi do pleuralnih i plućnih promena. Pleuralne manifestacije su u vidu efuzija, pleuritisa ili pleuralnih ploča koje obično zahvataju parijetalnu pleuru i često kalcifikuju. Udisanje azbestnih vlakana može dovesti do oboljenja plućnog parenhima, posebno intersticijske plućne bolesti, poznate kao azbestoza. Svi glavni tipovi azbesta mogu izazvati intersticijsku bolest pluća, iako amfibolna vlakna mogu biti više fibrogenska od krizotilnih vlakana. Azbestoza se razvija kod izloženosti iznad granične doze vlakna od približno 25 do 105 vlakana po ml godišnje, gde je granična doza obično dostignuta samo kod rudara, mlinara, tekstilnih radnika koji imaju jaku radnu ekspoziciju zbog korišćenja azbestnih izolatora (88). Razvoj intersticijske fibroze obično zahteva produženo izlaganje više meseci tokom godine. Period latencije od izloženosti do prezentacije bolesti je obrnuto proporcionalan nivou izloženosti. Relativni rizik od nastanka karcinoma pluća izlaganjem azbestu je 6 puta, dok je rizik kod pučaća 11 puta, a ukoliko su osobe koje su izložene azbestu i pušači relativni rizik je čak 59 puta (8).

#### 1.3.7. Aerozagadenje

Karcinom pluća može biti jedan od neželjenih efekata dugotrajne kumulativne izloženosti zagađenom vazduhu, kroz proces zapaljenja, oksidativnog stresa, indukcije prokoagulantnog

stanja i disfunkcije autonomnog nervnog sistema (89,90). Procenat karcinoma pluća koji se mogu pripisati urbanom zagađenju vazduha u Evropi je 11% (91).

### 1.3.8. Druge bolesti

Neke nemaligne bolesti su povezane sa povećanim rizikom od nastanka karcinoma pluća. Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) značajno je povezana sa povećanim rizikom od karcinoma pluća, naročito kod muškaraca (92, 93, 94). Nosioци deficita  $\alpha$ 1- antitripsina (95), intersticijska fibroza (96, 97), plućna tuberkuloza (98, 99) i sistemske bolesti vezivnog tkiva (100) povećavaju rizik za nastanak karcinoma pluća. Infekcije HPV i HIV virusima, citomegalovirus, virus malih boginja takođe povećavaju rizik za nastanak karcinoma pluća (101-107).

## 1.4. TNM KLASIFIKACIJA I STADIJUM KARCINOMA PLUĆA

Određivanje stadijuma proširenosti karcinoma u vreme postavljanja dijagnoze je najvažniji prediktivni faktor preživljavanja a ujedno i jedan od glavnih činioca koji utiču na izbor vrste i dužine lečenja pacijenta. TNM klasifikacija je metod procene raširenosti tumora koji uključuje karakteristike primarnog tumora (oznaka T), regionalnih limfnih čvorova (oznaka N), kao i prisustvo udaljenih metastaza (oznaka M). Svakom od ovih slova se pridodaje broj koji u slučaju primarnog tumora označava veličinu ili lokalnu proširenost primarnog tumora, a u slučaju regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza broj označava prisustvo ili odsustvo tumora kao i njihovu anatomsku lokalizaciju. Od uvođenja TNM klasifikacije koju je postavio *Pierre Denoix* između 1943. i 1952. godine, došlo je do značajnih promjena uključujući i TNM klasifikaciju karcinoma pluća. TNM klasifikaciju su nastavile da razvijaju dve najveće svetske organizacije, Međunarodna unija za borbu protiv karcinoma (*Union Internationale Contre le Cancer- UICC*) i Američki udruženi komitet za karcinom (*American Joint Comitete for Cancer- AJCC*) (108, 109). Sedmo izdanje TNM klasifikacije karcinoma pluća objavljeno je septembra 2009. godine (110, 111) koje je u upotrebi od januara 2010. godine (112, 113) (Tabela 1). Sedma revizija je donela promene koje su bile zasnovane na predlozima Međunarodnog udruženja za proučavanje karcinoma pluća (*International Association for the Study of Lung Cancer- IASLC*) koje je osnovalo Međunarodni stejdžing komitet (*International Staging Comitete- ISC*) (114, 115). Projekat je organizovan i finansiran od strane IASLC koji je prikupio i analizirao više od 100.000 slučajeva karcinoma pluća prijavljenih iz 46 centara i 19 zemalja širom sveta (116).

Na osnovu TNM klasifikacije tumora određuje se i opšti stadijum proširenosti bolesti, pa se pacijenti svrstavaju u jedan od četiri osnovna, od kojih su stadijumi I, II I III podeljeni u podgrupe a i b (117, 118) (Tabela 2).

Tabela 1. Sedma revizija TNM klasifikacije karcinoma pluća

<b>T (Primarni tumor)</b>	
T0	Nema primarnog tumora
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor ≤ 3cm okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopske evidencije o invaziji proksimalno od lobarnog bronha.
T1a	Tumor ≤ 2 cm u najvećem dijametri
T1b	Tumor > 2 cm i ≤ 3 cm u najvećem dijametri
T2	Tumor > 3 cm u najvećem dijametri ili tumor sa bilo kojom od sledećih karakteristika: zahvata glavni bronh ≥ 2 cm distalno od karine, zahvata visceralnu pleuru, udružen sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji zahvataju hilarnu regiju, ali ne zahvataju celo pluće.
T2a	Tumor > 3cm i ≤ 5 cm
T2b	Tumor > 5cm i ≤ 7 cm
T3	Tumor > 7 cm u najvećem dijametri ili tumor sa bilo kojom od sledećih karakteristika: direktno zahvata zid grudnog koša, dijafragmu, frenični nerv, medijastinalnu pleuru, parijetalni perikard, glavni bronh na manje od 2 cm od karine bez njenog zahvatanja, atelektaza ili pneumonitis celog pluća, odvojeni tumorski nodusi u istom režnju.
T4	Tumor bilo koje veličine koji zahvata: medijastinum, srce, velike krvne sudove, traheju, povratni nerv, jednjak, kičmene pršljenove, karinu ili sa odvojenim tumorskim nodusima u drugom ipsilateralnom režnju.
<b>N (Regionalni limfni čvorovi)</b>	
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaze bilo u ipsilateralnim peribronhijalnim ili hilarnim limfnim čvorovima, bilo i u jednim i u drugim, uključujući i direktno zahvatanje
N2	Metastaze u ipsilateralnim medijastinalnim i/ili subkarinalnom limfnom čvoru
N3	Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim i hialnim; u ipsilateralnim i/ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima.
<b>M (Udaljene metastaze)</b>	
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze
M1a	Odvojeni tumorski nodus(i) u kontralateralnom režnju; tumor sa pleuralnim nodusima ili maligni pleuralnii/ili perikardni izliv
M1b	Udaljene metastaze

Tabela 2. Stadijum bolesti

Okultni karcinom	T <sub>x</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum 0	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IA	T <sub>1a,b</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IB	T <sub>2a</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IIA	T <sub>1a,b</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2a</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2b</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IIB	T <sub>2b</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IIIA	T <sub>1, T2</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1, N2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4</sub>	N <sub>0, N1</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IIIB	T <sub>4</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	bilo koji T	N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
Stadijum IV	bilo koji T	bilo koji N	M <sub>1a,b</sub>

Nedavno je revidirana sedma TNM klasifikacija karcinoma pluća koja je usvojena od strane IUCC i AJCC, a novo 8. izdanje je objavljeno u januaru 2017. godine (119).

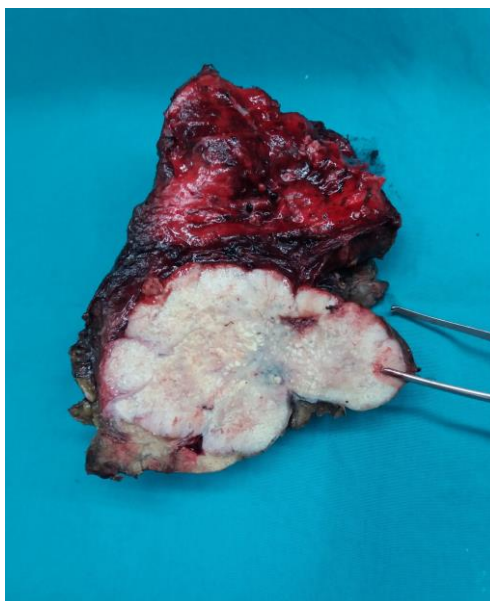
Osmo izdanje TNM klasifikacije karcinoma pluća zasnovano je na analizama Međunarodne asocijacije za istraživanje baze podataka o karcinomu pluća, koja je uključila 77156 pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom pluća u periodu od 1999. do 2010. godine iz 35 centara i 16 zemalja (120). Ažurirano izdanje uvodi nekoliko važnih promena u odnosu na sedmo izdanje. U odnosu na T deskriptor pojavile su se nove grupe veličine tumora: T<sub>1a</sub>, ≤ 1 cm; T<sub>1b</sub>, >1 do 2 cm; T<sub>1c</sub>, >2 do 3 cm; T<sub>2a</sub>, >3 do 4 cm; T<sub>2b</sub>, >4 do 5 cm; T<sub>3</sub>, >5 do 7 cm; T<sub>4</sub>, >7 cm. T<sub>is</sub> i T<sub>1mi</sub> su uvedeni za adenokarcinom in situ i minimalno invazivni adenokarcinom. Endobronhialni tumori koji se nalaze na udaljenosti manjoj od 2cm od karine imaju bolju prognozu nego oni sa bilo kojim drugim T<sub>3</sub> deskriptorom i klasifikovani su kao T<sub>2</sub>. Totalna atelektaza/pneumonitis se sada klasifikuju kao T<sub>2</sub>. Zahvatanje dijafragme je sada T<sub>4</sub>. Invazija visceralne pleure ostaje nepromenjena, dok invazija medijastinalne pleure nestaje kao T deskriptor. Deskriptori limfnih čvorova (N) su ostali nepromenjeni, ali broj zahvaćenih limfnih čvorova ima prognostički značaj. M<sub>1a</sub> (intratorakalne metastaze) kategorija ostaje nepromenjena ali ekstratorakalne metastaze su podeljene na M<sub>1b</sub> (jedna ekstratorakalna metastaza) i M<sub>1c</sub> (više ekstratorakalnih metastaza u jednom ili više organa).

Što se tiče stadijuma bolesti stadijum IA je sada podeljen na IA1, IA2 i IA3; T1-T2N1M0 je stadijum IIB dok je T3-T4N1M0 stadijum IIIA; novi stadijum IIIC određen je za T3-T4N3M0 tumore; i IV stadijum je podeljen na IVA (M1a i M1b) i IVB (M1c) (121).

## 1.5. ADENOKARCINOM PLUĆA

Adenokarcinom je najčešći histološki tip karcinoma pluća. Po definiciji SZO adenokarcinom je maligni tumor epitelnog porekla koji pokazuje glandularnu diferencijaciju, produkciju sluzi ili ekspresiju pneumocitnih imunohistohemijskih markera (122).

Adenokarcinom pluća najčešće raste u vidu perifernog, subpleuralnog, solitarnog tumorskog čvora, nejasno ograničenih zvezdastih ili lobuliranih ivica sa retrakcijom pleure (Slika 1). Naziv “tumor u ožiljku” koji je primenjivan za subpleuralne adenokarcinome povezane sa ožiljkom izgubio je klinički značaj jer je ustanovljeno da je u većini slučajeva ožiljak rezultat sekundarnog dezmodoplastičnog stromalnog odgovora na tumor a ne uzrok lezije. Veći tumori podležu nekrozi i krvarenju pa tumor ima izgled “tumorske kaverne”. Ređe tumor može rasti duž pleuralne površine podsećajući na pleuralni mezoteliom, kao endobronhijalni plak ili polip ili difuzno-mrežasto (123).



Slika 1. Makroskopski izgled adenokarcinoma pluća.

### 1.5.1. Najnovija klasifikacija adenokarcinoma pluća

Nova klasifikacija adenokarcinoma pluća od strane međunarodne asocijacije za proučavanje karcinoma pluća (IASLC/ATS/ERS) iz 2011. godine donosi značajne promene u odnosu na klasifikaciju SZO iz 2004. godine.



Promene u klasifikaciji adenokarcinoma pluća u hirurški reseciranim uzorcima su uključivale:

1. Ukidanje pojmova bronhioloalveolarni karcinom (BAC) i mešoviti podtip adenokarcinoma.
2. Dodavanje pojmova adenokarcinom in situ (AIS) i atipične adenomatozne hiperplazije kao preinvazivne lezije.
3. Dodavanje pojma minimalno invazivni adenokarcinom (MIA).
4. Klasifikacija invazivnih adenokarcinoma prema dominantnom histološkom podtipu određenom semikvantitativno procentualnom procenom i dodavanje ostalih podtipova koji su prisutni u više od 5%.
5. Uvođenje termina "lepidični" za neinvazivnu komponentu (ranije klasifikovanu kao BAC) prisutne kao deo invazivnog adenokarcinoma.
6. Uvođenje termina "invazivni mucinozni adenokarcinom" za adenokarcinome ranije klasifikovane kao mucinozni BAC, isključujući tumore koji ispunjavaju kriterijume za AIS ili MIA.
7. Ukidanje podtipova "clear cell" i "signet ring" adenokarcinoma jer je značaj njihovog prepoznavanja u bilo kojoj procentualnoj zastupljenosti mali.
8. Ukidanje termina mucinozni cistadenokarcinom, uključujući i one pod kategorijom koloidnog adenokarcinoma (122, 124, 125).

SZO je 2015. godine donela novu klasifikaciju karcinoma pluća u hirurški reseciranim uzorcima i u sitnim biopsijama i citološkim uzorcima, koja je gotovo u potpunosti prihvatila preporuke IASLC/ATS/ERS iz 2011. godine (Tabela 3, Tabela 4) (124).

Tabela 3. IASLC/ATS/ERS terminologija adenokarcinoma pluća u sitnim biopsijama i/ili citološkim uzorcima.

Adenokarcinom <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lepidični</li> <li>• Acinarni</li> <li>• Papilarni</li> <li>• Mikropapilarni</li> <li>• Solidni</li> <li>• Drugi</li> </ul>
Nemikrocelularni karcinom verovatno adenokarcinom
Nemikrocelularni karcinom sa morfoloijom svamoznog karcinoma i adenokarcinoma
Nemikrocelularni karcinom, ne može se dalje klasifikovati

Ove smernice su izuzetno važne jer dve trećine pacijenata sa karcinomom pluća su u uznapredovalom stadijumu bolesti a njihova dijagnoza se postavlja na sitnim biopsijama i citološkim uzorcima (125).

Tabela 4. IASLC/ATS/ERS klasifikacija adenokarcinoma i preinvazivnih lezija u hirurški reseciranim uzorcima.

<b>Preinvazivne lezije</b>
Atipična adenomatozna hiperplazija
Adenokarcinom in situ (AIS) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nemucinozni</li> <li>• Mucinozni</li> <li>• Mešani</li> </ul>
<b>Minimalno invazivni adenokarcinom (MIA)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nemucinozni</li> <li>• Mucinozni</li> <li>• Mešani</li> </ul>
<b>Invazivni adenokarcinom</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lepidično predominantni</li> <li>• Acinarno predominantni</li> <li>• Papilarno predominantni</li> <li>• Mikropapilarno predominantni</li> <li>• Solidno predominantni</li> </ul>
<b>Varijante invazivnog adenokarcinoma</b>
Invazivni mucinozni Koloidni Fetalni Crevni

### 1.5.1.1. Adenokarcinom in situ (AIS) i minimalno invazivni adenokarcinom (MIA)

Kriterijumi za dijagnozu AIS (Slika 2) i MIA (Slika 3) dati su u Tabeli 5 (124, 125).

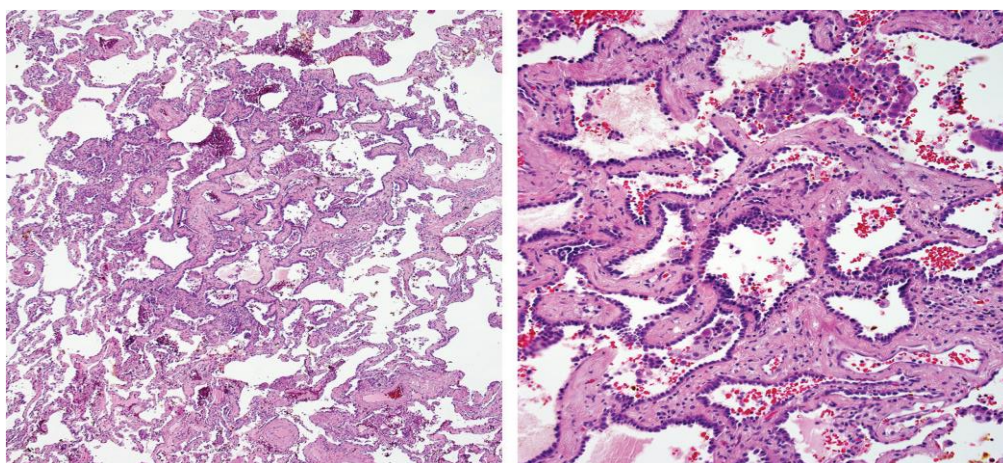
Tabela 5. Kriterijumi za dijagnozu AIS i MIA.

<b>Adenokarcinom in situ (AIS)</b>	<b>Minimalno invazivni adenokarcinom (MIA)</b>
Veličina tumora $\leq 3$ cm	Veličina tumora $\leq 3$ cm
Solitarni adenokarcinom	Solitarni adenokarcinom
Čist lepidični tip rasta	Predominantno lepidični tip rasta
Odsustvo stomalne, vaskularne i pleuralne invazije	Invazivna komponenta $\leq 5$ mm u najvećoj dimenziji u jednom fokusu
Odsustvo obrasca rasta invazivnih adenokarcinoma (acinarni, papilarni, mikropapilarni, solidni, koloidni, enterični, fetalni, mucinozni)	Izmerena invazivna komponenta uključuje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• bilo koji histološki podtip izuzev lepidičnog</li> <li>• infiltraciju miofibroblastne strome tumorskim ćelijama</li> </ul>

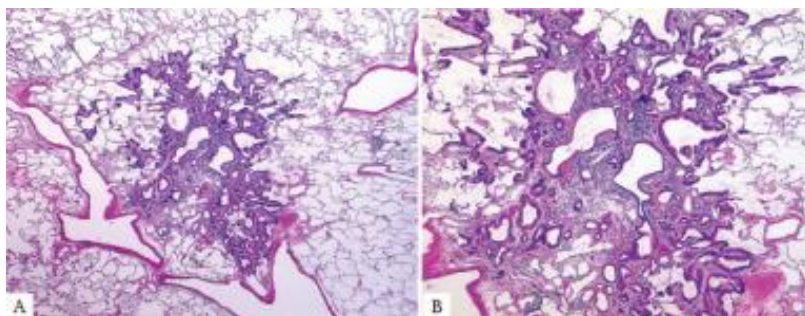
Odsustvo širenja kroz vaskularne prostore	Dijagnoza MIA je isključena ako tumor: <ul style="list-style-type: none"> <li>• infiltruje limfne i krvne sudove, vazdušne prostore i pleuru</li> <li>• sadrži područja nekroze</li> <li>• širi se kroz vazdušne prostore</li> </ul>
Uglavnom nemucinozni tip ćelija (pneumociti tip II i Klara ćelije), retko mogu biti prisutne mucinozne ćelije (visoko cilindrične ćelije sa bazalno smeštenim jedrima i obilnim citoplazmatskim mucinom, mogu podsećati na peharaste ćelije)	Uglavnom nemucinozni tip ćelija (pneumociti tip II i Klara ćelije), retko mogu biti prisutne mucinozne ćelije (visoko cilindrične ćelije sa bazalno smeštenim jedrima i obilnim citoplazmatskim mucinom, mogu podsećati na peharaste ćelije)
Nuklearna atipija je odsutna ili neupadljiva	
Proširene septe sa sklerozom/elastozom su uobičajene, naročito u nemucinoznom AIS	

Resecirani primarni invazivni adenokarcinom pluća u kojem dominira lepidični obrazac rasta treba nazvati “adenokarcinom lepidičnog podtipa” ili “lepidični adenokarcinom” sa navođenjem procenta lepidične komponente i procentualne zastupljenosti svih ostalih obrazaca rasta.

Merenje veličine invazivne komponente u tumorima sa lepidičnim obrascem može biti izazov. Ako postoji jedan fokus invazije u malom tumoru, invazija se može meriti mikroskopom. Ako postoji više fokusa invazije ili ako je tumor većih dimenzija nego jedno vidno polje onda najnovije preporuke sugerišu drugi način procene veličine invazije: ukupni procenat invazivnih komponenti pomnožiti sa ukupnim prečnikom tumora (tj. ukupna veličina tumora od 2,0 cm sa 20% invazivnih komponenti i 80% lepidične komponente bi imali procenjenu invazivnu veličinu od  $2,0 \times 0,2 = 0,4$  cm). U odnosu na MIA, ako je invazivna komponenta veća od 5 mm, dijagnoza je invazivni lepidični adenokarcinom (126).



Slika 2. Nemucinozni tip AIS. (A) Ograničeni nemucinozni tumor sa lepidičnim obrascem rasta, bez vidljivih fokusa invazije ili ožiljka (H&E, 4x), (B) Proliferacija atipičnih pneumocita duž alveolarnih zidova (H&E, 40x). (Preuzeto: Travis WD, Brambilla E, Rielyhistolo GJ. New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. J Clin Oncol. 2013;31:992-1001.)



Slika 3. Mucinozni MIA. (A) Mucinozni MIA koji pokazuje lepidični obrazac rasta i fokus invazije manji od 5mm. (B) Tumorske ćelije su mucinozne, cilindrične, oblažu alveolarne zidove. Tumorska invazija je u području stromalne fibroze i acinarnog obrasca rasta. (Preuzeto: Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thoracic Oncol.* 2011;6(2):244–85.)

Dijagnoza AIS i MIA se može postaviti jedino na resektatima koji su u potpunosti uzeti za histološku evaluaciju jer se samo potpunim pregledom mogu tražiti žarišta invazije. Kada imamo sitnu biopsiju sa nemucinoznim tumorom lepidičnog obrasca rasta dijagnoza bi trebala biti “adenokarcinom sa lepidičnim obrascem rasta” uz napomenu da bi to mogla biti lezija koja odgovara AIS, MIA ili invazivnom adenokarcinomu lepidičnog podtipa (127).

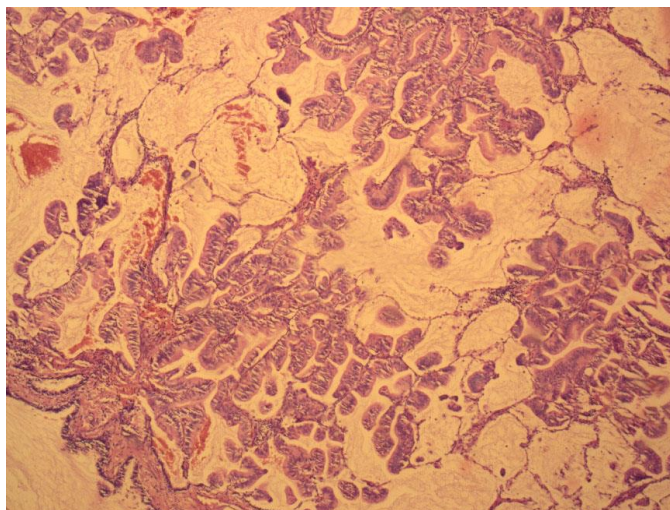
### 1.5.1.2. Invazivni adenokarcinom

U klasifikaciji SZO za 2015. godinu, termin "predominantan" nije naveden u nazivu podtipa invazivnog adenokarcinoma kao što je to slučaj u klasifikaciji IASLC/ATS/ERS iz 2011. godine. Međutim, ove tumore i dalje treba klasifikovati prema dominantnom podtipu nakon evaluacije tumora i semikvantitativne procene svih histoloških obrazaca rasta koji su zastupljeni u više od 5%. Najčešće su adenokarcinomi sastavljeni od mešavine različitih obrazaca rasta sa dominacijom jednog od njih. Veoma je korisno notirati ove procenete u patološkom izveštaju jer su određene i manje zastupljene komponente (mikropapilarni obrazac) povezane sa lošijom prognozom (128).

Od 2011. godine IASLC/ATS/ERS uvodi novi obrazac invazije STAS (*Spread Through Air Spaces*) adenokarcinoma pluća. STAS se sastoji od mikropapilarnih klastera, solidnih gnezda ili pojedinačnih ćelija preko ivice tumora u vazдушnim prostorima u okolnom plućnom parenhimu. STAS isključuje AIS i MIA. Prisustvo STAS- a doprinosi znatno povećanom stepenu recidiva kod pacijenata u nižem stadijumu bolesti (stadijum I) koji su podvrgnuti ograničenoj resekciji i povezan je sa lošijom prognozom (129, 130). Pošto STAS predstavlja manifestaciju širenja tumora, ova komponenta nije uključena u procentualnu analizu podtipova u sveobuhvatnom histološkom nalazu ili merenju veličine invazije. STAS je ugrađen u definiciju invazije koja se koristi za odvajanje lepidičnih invazivnih adenokarcinoma od MIA i AIS. STAS je obrazac invazije koji se prijavljuje slično invaziji visceralne pleure i vaskularnoj invaziji (127).

### 1.5.1.2.1. Lepidično predominantni tip

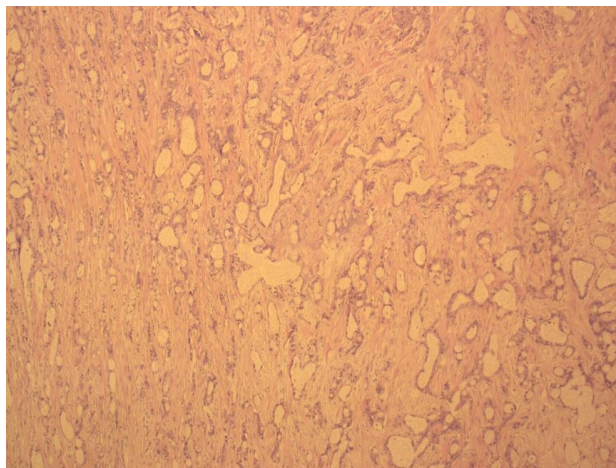
Lepidično predominantni tip invazivnog adenokarcinoma sastoji se od proliferacije pneumocita tipa II ili *Clara* ćelija uz površinu alveolarnih septi slično morfologiji AIS i MIA (Slika 4). Invazivni adenokarcinom je prisutan u najmanje jednom fokusu koji je veći od 5 mm u najvećoj dimenziji. Invazija se definiše prisustvom nekog drugog obrasca rasta izuzev lepidičnog (tj. acinarni, papilarni, mikropapilarni i/ili solidni) i/ili invazijom miofibroblastične strome tumorskim ćelijama. Ako je prisutna invazija krvnih, limfnih sudova, pleure ili ako je evidentna tumorska nekroza onda je dijagnoza lepidično predominantni adenokarcinom umesto MIA. Dosadašnje studije su pokazale da lepidično predominantni tip adenokarcinoma u ranoj fazi bolesti ima dobru prognozu sa petogodišnjim preživljavanjem od 86% do 90% (131, 132).



Slika 4. Lepidično predominantni tip, H&E, 50x.

### 1.5.1.2.2. Acinarno predominantni tip

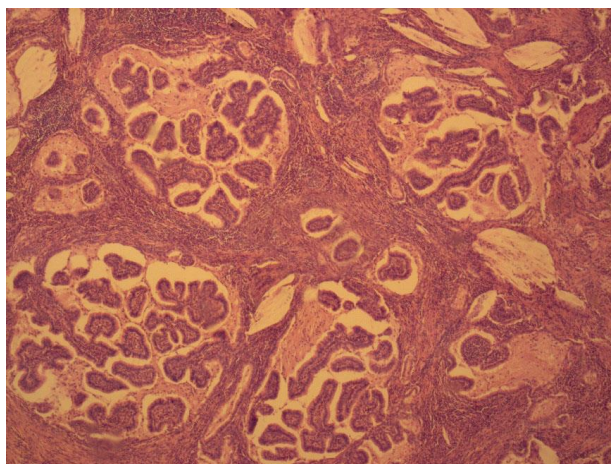
Acinarno predominantni tip adenokarcinoma najvećim delom je sagrađen od žlezdanih formacija koje su okrugle ili ovalne sa centralnim luminalnim prostorima koji su okruženi tumorskim ćelijama (Slika 5). Tumorske ćelije i/ili žlezdani lumeni mogu sadržati mucin (122). Acinarne strukture se mogu sastojati od okruglih i ovalnih agregata tumorskih ćelija sa periferno postavljenim jedrima i centralno lokalizovanom citoplazmom bez jasno definisanih lumena. AIS sa kolapsom teško je razlikovati od acinarnog obrasca. Ako postoji ukidanje alveolarne arhitekture i/ili prisustvo miofibroblastične strome dijagnoza je usmerena na invazivni acinarno predominantni adenokarcinom. Kribriformni aranžmani smatraju se obrascem acinarnog adenokarcinoma (133).



Slika 5. Acinarno predominantni tip, H&E,50x.

#### 1.5.1.2.3. Papilarno predominantni tip

Papilarno predominantni tip adenokarcinoma je sagrađen od prstolikih vezivno-vaskularnih proliferata koji su obloženi tumorskim ćelijama (Slika 6). Papilarne formacije treba razlikovati od tangencijalno presečenih alveolarnih septi u AIS. Ako tumor ima lepidični obrazac rasta ali se u alveolarnim prostorima nalaze papilarne strukture, treba ga klasifikovati kao papilarno predominantni tip adenokarcinoma. Za dijagnozu ovog obrasca nije neophodna miofibroblasična stroma (125).

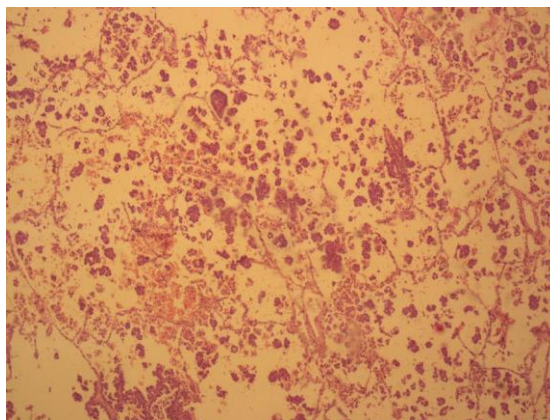


Slika 6. Papilarno predominantni tip, H&E,50x.

#### 1.5.1.2.4. Mikropapilarno predominantni tip

Mikropapilarno predominantni tip adenokarcinoma sagrađen je od tumorskih ćelija u vidu papilarnih čuperaka ili pramenova kojima nedostaje fibrovaskularna osnova (Slika 7). Ovi oblici mogu biti odvojeni i/ili vezani za alveolarne zidove. Tumorske ćelije su obično male i kubične sa minimalnom nuklearnom atipijom. Tumorske ćelije mogu formirati prstenu slične formacije koje plutaju unutar alveolarnih prostora. Česta je stromalna invazija i invazija

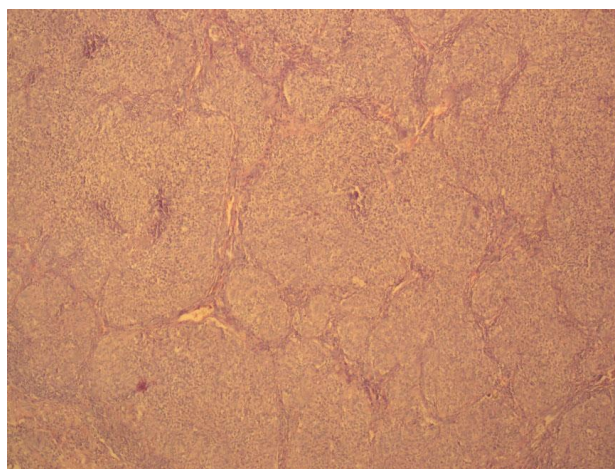
vaskularnih prostora. Mogu se videti i psamomatozna telašca. Tumori klasifikovani kao predominantno mikropapilarni imaju lošu prognozu slično adenokarcinomima sa dominantnim solidnim podtipom (125, 134). Dodatni dokazi koji govore u prilog agresivnijeg ponašanja ovog histološkog podtipa je dominantna zastupljenost mikropapilarnog obrasca u metastazama u poređenju sa primarnim tumorom koji ponekad sadrži samo mali procenat mikropapilarnog obrasca (135).



Slika 7. Mikropapilarno predominantni tip, H&E,50x.

#### 1.5.1.2.5. Solidno predominantni tip

Solidno predominantni tip adenokarcinoma sa produkcijom mucina grade poligonalne tumorske ćelije koje formiraju tumorske plaže i kojima nedostaju drugi prepoznatljivi obrasci adenokarcinoma, tj. acinarni, papilarni, mikropapilarni ili lepidični (Slika 8). Ako je tumor 100% solidan, intracelularni mucin mora biti prisutan u najmanje pet tumorskih ćelija u svakom od dva vidna polja najvećeg uveličanja koji su potvrđeni histochemijskim bojenjem na mucin. Solidni adenokarcinom treba razlikovati od skvamoznog i krupnoćelijskog karcinoma koji mogu imati retke ćelije sa intracelularnim mucinom (125).

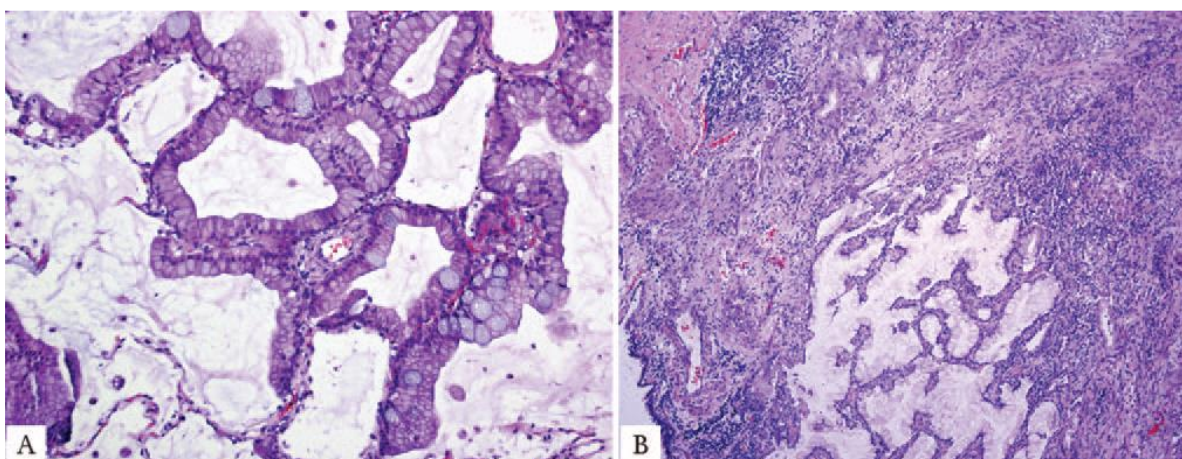


Slika 8. Solidno predominantni tip, H&E,50x.

### 1.5.1.3. Varijante invazivnog adenocarcinoma

#### 1.5.1.3.1. Invazivni mucinozni adenokarcinom

Invazivni mucinozni adenokarcinom sagrađen je od peharastih ćelija ili cilindričnih ćelija sa obilnom količinom intracitoplazmatskog mucina, bez značajnije citološke atipije (Slika 9). Alveolarni prostori su često ispunjeni mucinom. Ovi tumori takođe mogu pokazivati heterogenost u smislu različitih obrazaca rasta (lepidičnog, acinarnog, papilarnog, mikropapilarnog i solidnog) kao kod nemucinoznih tumora. Klinički značaj ove semikvantitativne procentualne procene i dominantnog histološkog podtipa kod mucinoznih adenocarcinoma nije još uvek potvrđen. Tumor je često multicentričan, multilobaran i bilateralan, što se može pripisati širenju tumorskih ćelija vazдушnim putevima. Kombinacija mucinoznog i nemucinoznog tumora se javlja retko i u tom slučaju je obavezno notirati procentualnu zastupljenost invazivne mucinozne komponente. Ako je prisutno najmanje 10% svake komponente, treba ga klasifikovati kao "Mešoviti mucinozni i nemucinozni adenokarcinom"(125).



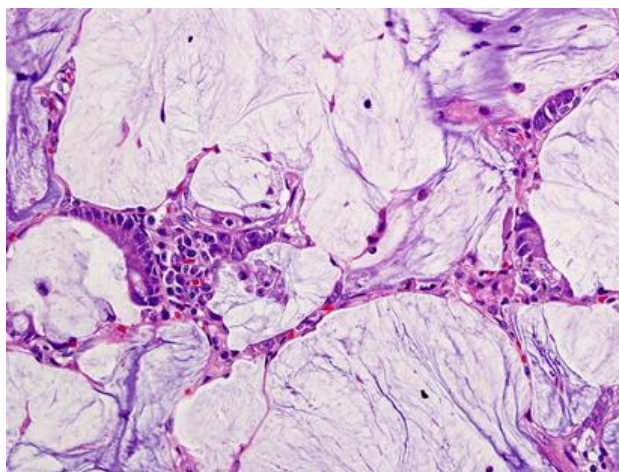
Slika 9. Invazivni mucinozni adenokarcinom. (A) Invazivni mucinozni adenokarcinom sa lepidičnim obrascem rasta. (B) Invazivni tumorski rast sa dezmoplastičnom stromom i acinarnim obrascem rasta. (Preuzeto: Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thoracic Oncol.* 2011;6(2):244–85.)

#### 1.5.1.3.2. Koloidni adenokarcinom

Koloidni adenokarcinom se sastoji od jezera ekstracelularnog mucina koja razdvajaju alveolarne prostore sa destrukcijom njihovih zidova (Slika 10). Jezera sluzi sadrže klasterne mucin produkujućih tumorskih ćelija koji mogu biti zastupljeni u malom procentu i neupadljivi (136). Tumorske ćelije su peharastog izgleda ili mucin produkujuće ćelije.



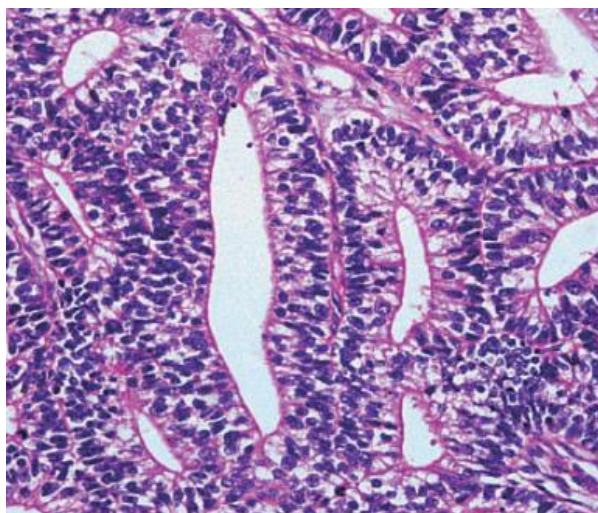
Koloidni adenokarcinom se češće nalazi u kombinaciji sa drugim histološkim podtipovima adenokarcinoma nego kao jedini histološki tip. Ako je dominantna koloidna komponenta onda se tumor klasifikuje kao koloidni adenokarcinom sa navođenjem procentualne zastupljenosti drugih histoloških obrazaca (137). Ranije dijagnostikovan mucinozni cistadenokarcinom koji je izuzetno redak, sada treba klasifikovati kao koloidni adenokarcinom sa cističnim promjenama. Ciste su ispunjene mucinom i obložene peharastim ili drugim mucin produkujućim ćelijama sa minimalnom citološkom atipijom (138).



Slika 10. Koloidni adenokarcinom. (Preuzeto: Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ. Prognostic significance of the proposed IASLC/ATS/ERS revised classification of lung adenocarcinoma in 514 stage I lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2011;24(5):653-64.)

#### 1.5.1.3.3. Fetalni adenokarcinom

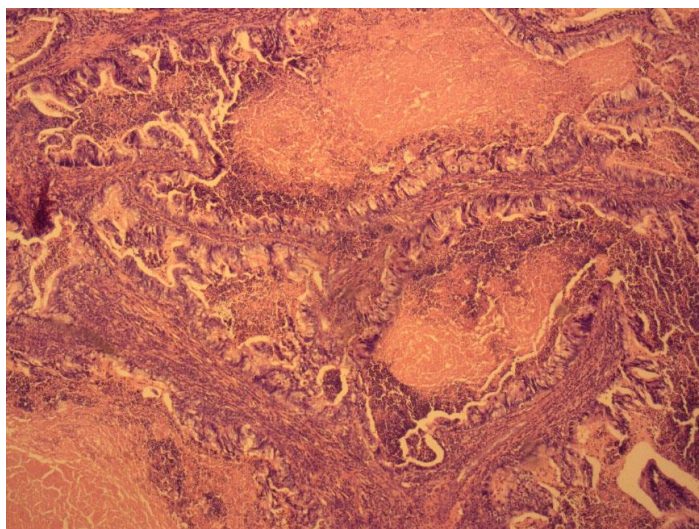
Fetalni adenokarcinom se sastoji od žlezdanih formacija sa tubulima obloženim necilijarnim glikogenom bogatim ćelijama koje podsećaju na tubule fetalnih pluća (Slika 11) (122). Česte su subnuklearne vakuole a mogu se videti i skvamozne morule unutar tubula. Uglavnom su niskog gradusa, povoljnog ishoda i češći su kod mlađih pacijenta. Ređe su visokog gradusa. Ukoliko se nalazi u kombinaciji sa drugim histološkim podtipovima, tumor se klasifikuje prema dominantnom podtipu (139). Karakteristično za ove tumore je da se pojavljuju sa mutacijom beta katenin gena, a tumorske ćelije imunohistohemijski pokazuju citoplazmatsko i nuklearno bojenje ovim antitelom (140, 141).



Slika 11. Fetalni adenokarcinom, H&E,200x. (Preuzeto: Zhang J, Wu J, Tan Q, Zhu L, Gao W. Why do pathological stage IA lung adenocarcinomas vary from prognosis? A clinicopathologic study of 176 patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification. *J Thorac Oncol.* 2013;8(9):1196-202.)

#### 1.5.1.3.4. Adenokarcinom sa enteričnom diferencijacijom

U invazivnom adenokarcinomu pluća može doći do enterične diferencijacije i kada je ova komponenta zastupljena u više od 50% tumora, tumor se klasifikuje kao plućni adenokarcinom sa enteričnom diferencijacijom. Ovi tumori pokazuju i morfološke i imunohistohemijske karakteristike kolorektalnog adenokarcinoma. Za razliku od metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma, ovi tumori su histološki heterogeni sa komponentom koja podseća na primarni adenokarcinom pluća kao što je lepidični način rasta. Enterični obrazac se sastoji od glandularnih i/ili papilarnih struktura, nekada i kribriformnih formacija, obloženih visokocilindričnim tumorskim ćelijama sa pseudostratifikovanim jedrima, luminalnom nekrozom i prominentnim nuklearnim debrisom (Slika 12) (142). Loše diferentovani tumori mogu imati solidan obrazac, ali moraju pokazivati bar jedan imunohistohemijski marker za enteričnu diferencijaciju (CDX2, CK20 ili MUC2). Istovremena pozitivnost za CK7 i ekspresija TTF-1 u približno pola slučajeva pomaže u razlikovanju od metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma (142, 143). Međutim, ovi tumori mogu biti i CK7 negativni kada je diferencijalna dijagnoza teža (144). Primarni adenokarcinom pluća koji histološki podseća na kolorektalni adenokarcinom, ali koji ne ekspresira imunohistohemijske markere enterične diferencijacije, bolje je smatrati plućnim adenokarcinomom sa enteričnom morfoloijom nego plućnim adenokarcinomom sa enteričnom diferencijacijom (145).



Slika 12. Enterični tip adenokarcinoma, H&E,50x.

#### 1.5.1.4. Prognostički značaj nove klasifikacije adenokarcinoma pluća

Nova klasifikacija adenokarcinoma pluća od strane IASLC/ATS/ERS identifikuje različite histološke podgrupe sa značajnim razlikama u prognozi. Prema ovoj klasifikaciji adenokarcinomi se svrstavaju u tri prognostičke kategorije. AIS, MIA (100%, 5-godišnje preživljavanje bez bolesti) i lepidično predominantni tip (90%, 5-godišnje preživljavanje bez bolesti) su svrstani u grupu sa dobrom prognozom. Acinarni i papilarno predominantni tip (83% i 84%, 5-godišnje preživljavanje bez bolesti) su svrstani u grupu sa intermedijarnim kliničkim ponašanjem. Mikropapilarni i solidno predominantni tip (67% i 70%, 5-godišnje preživljavanje bez bolesti) kao i varijante invazivnog adenokarcinoma, koloidni i mucinozni (75%, 5-godišnje preživljavanje bez bolesti) su svrstani u grupu sa lošom prognozom (135, 136). Pacijenti svrstani u grupu sa dobrom prognozom na osnovu histološkog podtipa adenokarcinoma mogu biti kandidati za ograničenu, poštednu hiruršku resekciju, dok pacijenti svrstani u grupu sa lošom prognozom mogu biti kandidati za adjuvantnu terapiju (134).

#### 1.5.2. Morfološka dijagnoza adenokarcinoma pluća

Morfološka dijagnoza adenokarcinoma pluća se može postaviti na citološkim i patohistološkim uzorcima.

Patohistološki uzorci su sitne biopsije (bronhobiopsija, transbronhijalna biopsija, biopsija pleure, perkutana transtorakalna biopsija) i uzorci dobijeni hirurškom resekcijom (lobektomija, segmentektomija, bilobektomija, pneumonektomija, “wedge” resekcija). Morfološka dijagnoza na patohistološkim uzorcima zasniva se na identifikaciji glandularne diferencijacije, produkcije mucina i jednog ili više arhitektonskih aranžmana (lepidičnog, acinarnog, papilarnog, mikropapilarnog i solidnog).

Citološki uzorci mogu biti eksfolijativni citološki uzorci (sputum, bronhijalno četkanje, bronhioalveolarna lavaža, pleuralni izliv, perikardijalni izliv) i aspiracioni citološki uzorci (punktati uvećanih limfnih čvorova, transbronhijalni punktati, transtorakalna punkcija). Morfološka dijagnoza na citološkim uzorcima zasniva se na identifikaciji nekoliko arhitektonskih obrazaca, uključujući ravne plaže, trodimenzionalne loptaste nakupine, pseudopapilarne agregate ili prave papile sa centralnom fibrovaskularnom osnovom i kohezivne klastere sa acinarnim strukturama. Pojedinačne tumorske ćelije adenokarcinoma obično imaju bazofilnu citoplazmu koja može biti homogena, izrazito granulirana ili penasta, a najčešće je prozirna i vakuolizovana. Jedra su često ekscentrično postavljena sa hromatinom koji varira od fino granuliranog i uniformnog do grubog, hiperhromatičnog i nepravilno dispergovanog. Većina tumorskih ćelija ima po jedan prominentan makronukleolus (146, 147).

Kada se radi o loše diferentovanom adenokarcinomu svi navedeni morfološki kriterijumi mogu biti odsutni. U ovim slučajevima je neophodno bojenje na mucin ili imunohistohemijsko bojenje kako bi se postavila specifična dijagnoza.

### 1.5.3. Imunohistohemijska dijagnoza adenokarcinoma pluća

Pošto je samo 10-20% plućnih karcinoma pogodno za resekciju, dijagnoza karcinoma pluća se češće postavlja na sitnim biopsijama i citološkim uzorcima. U manjim uzorcima je veća verovatnoća da nedostaju dobro diferentovana područja koja bi omogućila postavljanje dijagnoze na osnovu morfologije (148). U onim slučajevima gde uzorak pokazuje NSCLC bez jasnih znakova skvamozne ili glandularne diferencijacije, imunohistohemija može precizirati dijagnozu. Da bi sačuvali što više tkiva za molekularno testiranje u malim biopsijama, imunohistohemijsko bojenje treba ograničiti na najmanju moguću meru. Za početak se predlaže korišćenje samo jednog markera za adenokarcinom i jednog markera za skvamozni karcinom (149, 150).

Markeri za identifikaciju diferencijacije prema adenokarcinomu su TTF-1 (151, 152) i Napsin-A (153). Do sada se TTF-1 pokazao kao najbolji marker za dijagnozu adenokarcinoma pluća. Ovim markerom kojeg eksprimiraju pneumociti tipa II i *Clara* ćelije, možemo potvrditi primarno poreklo u 75% do 85% slučajeva adenokarcinoma pluća (150, 154).

Za skvamoznu diferencijaciju od markera se koriste p63 i CK5/6 (151, 152, 155, 156). Nedavno je dokazano da je poliklonalno antitelo p40 specifičniji marker od monoklalnog p63 za skvamozni karcinom bez preklapanja sa adenokarcinomom i da je najbolji imunohistohemijski marker skvamozne diferencijacije (157, 158). Iako je p63 često pozitivan u većini jedara skvamoznih karcinoma, može da pokaže nejasno i/ili slabo bojenje u 20% do 30% adenokarcinoma. Ovaj imunofenotip, umesto da bude prepoznat kao adenokarcinom, može biti pogrešno protumačen kao skvamozni karcinom (159). U primeni p63 samo jako

bojenje u više od 80% bazalno smeštenih tumorskih jedara ukazuje na skvamoznu diferencijaciju (160).

Jednostavan panel TTF-1 i p40 može klasifikovati većinu slučajeva NSCLC (157, 158). Drugi mogući pristup je upotreba kombinacije nuklearnih i citoplazmatskih markera (TTF-1/citokeratin 5/6 ili p63/napsin A) (161, 162). U slučaju pozitivnosti markera TTF-1, tumor treba klasifikovati kao NSCLC, verovatno adenokarcinom, čak i ako je prisutna ekspresija skvamoznih markera (150, 157, 161).

Ako je prisutna TTF-1 pozitivnost u jednoj grupi tumorskih ćelija, a druga grupa tumorskih ćelija pokazuje pozitivnost na skvamozne markere onda postoji mogućnost adenoskvamoznog karcinoma čija se dijagnoza može postaviti jedino na resekcionim uzorcima.

Ako su i TTF-1 i p40 negativni u tumoru koji nema jasnu skvamoznu ili glandularnu morfologiju onda se moraju koristiti citokeratini kako bi se potvrdilo da se radi o karcinomu. Ako su citokeratini negativni potrebno je isključiti druge tumore epiteloidnog izgleda kao što su melanom, limfom, maligni mezoteliom ili epiteloidni hemangioendoteliom (163).

Iako primarni adenokarcinomi pluća mogu biti TTF-1 negativni, u slučajevima kada imamo podatak o prethodno dijagnostikovanom primarnom vanplućnom adenokarcinomu mora se dopuniti imunohistohemijsko bojenje drugim antitelima (CDX-2, citokeratin 20, estrogenski receptor, progesteronski receptor) kako bi se isključio metastatski adenokarcinom drugih lokalizacija (kolona, dojke). Invazivni mucinozni adenokarcinomi ili koloidni adenokarcinomi su karakteristično TTF-1 negativni a mogu biti i CDX-2 pozitivni. U takvim slučajevima je neophodna klinička korelacija da bi se isključio metastatski adenokarcinom drugih lokalizacija kao što je pankreas i kolorektum (164).

## 1.6. GENETSKE OSNOVE KARCINOMA PLUĆA

Sve ćelije u organizmu sadrže genetički materijal koji se zove dezoksiribonukleinska kiselina (DNK). Svaki put kada se zrela ćelija deli na dve nove ćelije, njena DNK se duplicira, a nove ćelije su originalne kopije ćelije od koje su nastale. Stare ćelije umiru, zamenjuje ih nova generacija i na taj način se ćelije stalno obnavljaju.

Karcinom počinje greškom ili mutacijom u DNK ćelije, a razvoj malignog tumora se odvija kroz stadijume: inicijaciju, promociju i progresiju odnosno metastaziranje. Inicijacija je ireverzibilni proces u kome se od jedne maligno transformirane ćelije razvija klon malignih ćelija. Promocija je reverzibilni proces koji manjim delom zavisi od delovanja promotivnih, tj. karcinogenih faktora, dok većim delom zavisi od količine faktora koji izazivaju inicijaciju. Progresija je ireverzibilni proces praćen uočljivim genomskim promenama i stvaranjem diskretnog (primarnog) tumora. Metastaziranje je širenje malignih ćelija po organizmu. Maligne ćelije se već u fazi inicijacije mogu prepoznati po fenotipskim promenama (165).

Tumorske ćelije su genetski nestabilne imaju sklonost za nastanak genetskih oštećenja u toku replikacije i pokazuju autonomnu sposobnost i samodovoljnost u odnosu na signale za rast, neosetljivost na inhibitore rasta, sposobnost izbegavanja apoptoze, neograničenu sposobnost replikacije, povećanu aktivnost za angiogenezu i sposobnost za invaziju i metastaziranje (166, 167).

Danas znamo da svaki ćelijski gen koji učestvuje u regulaciji proliferacije i diferencijacije ćelija može mutirati, odnosno protoonkogen postaje onkogen. Rast i diferencijacija ćelija su pod kontrolom ekspresije protoonkogenih i tumor supresor gena. Pod tom kontrolom, normalna ćelija nakon određenog vremena podleže programiranoj ćelijskoj smrti, što se naziva apoptoza. Hoće li neka ćelija proliferirati i nastaviti se diferencirati ili će nastupiti apoptoza, zavisi od unutarćelijske komunikacije, odnosno niza procesa kojima se prenose poruke (signali) od ćelijske membrane do jedra i molekule DNK koja se u njemu nalazi. (168).

Onkogeni izazivaju malignu transformaciju ćelije tako što njihova ekspresija menja ćelijske signale i procese koji regulišu ulazak ćelije u G1 fazu ćelijskog ciklusa. Javlja se prekomerna i neprikladna ekspresija gena što rezultira ekspresiji patološkog genskog produkta. Onkogeni se konvertuju iz protoonkogenih procesima translokacije, insercije, tačkaste (point) mutacije, delecije i amplifikacije, što dovodi do povećanja nivoa (ili količine) proteina koje određeni onkogen kodira. Međutim, postoje i antionkogeni ili tumor supresivni geni koji kodiraju produkte koji sputavaju rast i osiguravaju negativnu regulaciju ćelijskog ciklusa, pa je neophodna njihova inaktivacija kako bi se omogućio nastavak ćelijskog ciklusa, tj. prelaz iz G1 u S fazu (165).

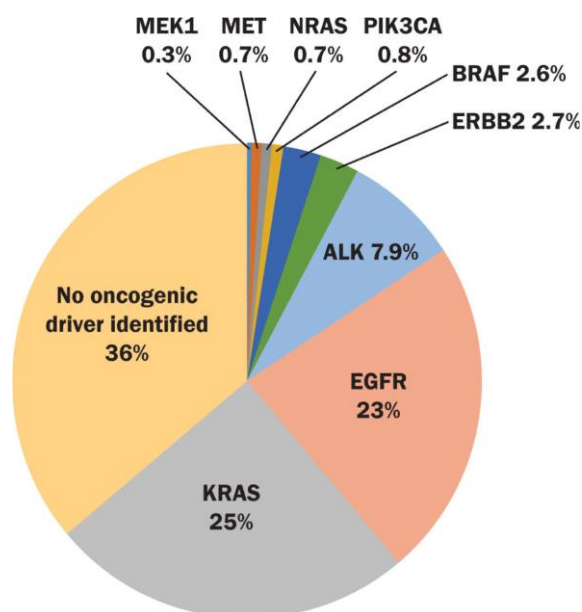
Poznat je veći broj onkogenih, koji se mogu klasifikovati prema mestu delovanja njihovih produkata u provođenju poruka kao i prema protoonkogenima od kojih nastaju (165). Onkogeni kodiraju faktore rasta (*vascular endothelial growth factor*- VEGF, *fibroblast growth factor*- FGF, *transforming growth factor  $\beta$* - TGF $\beta$ ), receptore za faktore rasta (*epidermal growth factor receptor family*- EGF), proteine koji prenose signale (*signal transducing proteins*- Ras), jedarne proteine koji učestvuju u prepisivanju (*nuclear transcription proteins*- c-myc), cikline i kinaze zavisne od ciklina (*cyclins and cyclin dependent kinases*- CDK) (169).

Patogeneza karcinoma pluća podrazumeva akumulaciju višestrukih mutacija tokom dužeg vremenskog perioda. Mutacije mogu biti uzrokovane normalnim procesom starenja ili faktorima iz okoline, kao što su cigarete, udisanje azbestnih vlakana, izlaganje radonu i dr (170, 171).

Napredak u lečenju NSCLC zasnovan je na razumevanju njegovih histoloških i molekularnih karakteristika. Karcinom pluća je heterogena bolest a mutacijsko profiliranje sada postaje rutinska praksa u plućnoj onkologiji (172). Neki molekularni podtipovi NSCLC su dobro

razjašnjeni. Postoje najmanje 2 različita molekularna puta u karcinogenezi pluća: jedan je povezan sa pušenjem i aktiviranjem KRAS-a, a drugi se javlja kod nepušača i ima aktivaciju EGFR-a (173, 174). KRAS mutacije i mutacije u domenu EGFR tirozin-kinaze jedni druge međusobno isključuju.

Konzorcijum za mutacije karcinoma pluća (*Lung Cancer Mutation Consortium-LCMC*) osnovan je 2008. godine kao višenacionalni program koji istražuje učestalost odabranih onkogenih mutacija kod adenokarcinoma pluća a dobijene rezultate koristi za primenu ciljane terapije u okviru standardne kliničke nege pacijenata ili u okviru kliničkog istraživanja. Nedavno su prijavljeni primarni rezultati LCMC studije (Slika 13) (175). Od 2009. do 2012. godine, testirano je 1007 pacijenata sa adenokarcinomom pluća na najmanje jedan onkogen i 733 pacijenta na 10 onkogeno (pacijenti sa potpunom genotipizacijom).



Slika 13. Identifikovane onkogene mutacije kod adenokarcinoma pluća u LCMC studiji.

(Preuzeto: Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA*. 2014; 311(19):1998–2006.)

Iako je frekvencija bilo kog pojedinačnog onkogeno mala, može se primetiti da su onkogeni otkriveni kod 64% adenokarcinoma pluća, dok kod 36% još uvek nisu otkriveni onkogeni (175).

Kod adenokarcinoma pluća otkriveno je više onkogeno od kojih su najčešći: EGFR, KRAS, ALK, HER2, BRAF, PIC3CA, NRAS, MET i MEK1 (175, 176).

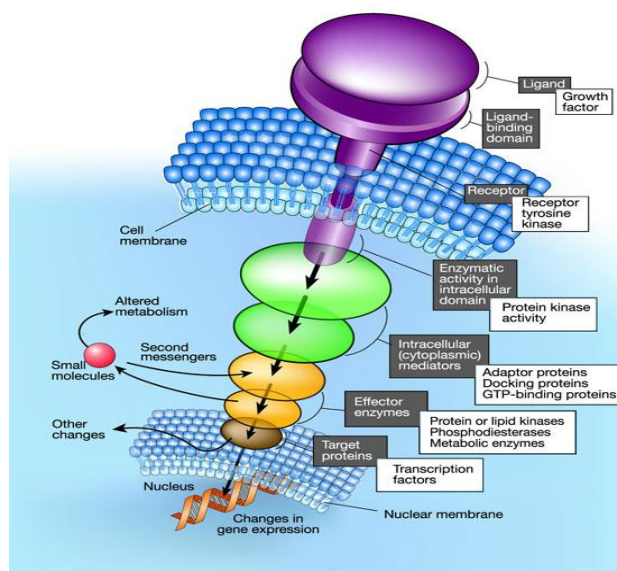
### 1.6.1. Familija receptora epidermalnog faktora rasta

Uprkos ulaganju svih napora u ranom otkrivanju i lečenju karcinom pluća je povezan sa lošom prognozom. Loša prognoza može biti povezana sa karakteristikama koje se odnose na pacijenta ili tumor. Identifikovani su neki klinički i biološki prognostički faktori kao što su:

stadijum bolesti, starosna dob, serumski nivo laktat dehidrogenaze, serumski broj limfocita i neutrofilnih granulocita. Trenutno, povećana pažnja je usmerena na nove biološke parametre: određivanje biološkog substadijuma pomoću molekularnih markera koje je predložio *Pastorino i sarad. 1997.* i *D'Amico i sarad. 1999. godine*, iako je njihova uloga kao prognostičkih faktora često nejasna. Izveden je veći broj studija za procenu prognostičke uloge tumor-supresor gena i proto-onkogeno. Među produktima proto-onkogeno, familija receptora epidermalnog faktora rasta (EGF) igra važnu ulogu u lokalnom rastu tumora. Ovaj fenomen dovodi do povećanog stvaranja regulatornih proteina kao što je receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) i HER2 receptor.

Familija receptora humanog epidermalnog faktora rasta (EGF) sastoji se od četiri strukturno slična receptora: EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) i HER4 (ErbB4). Receptori su smešteni na ćelijskoj membrani, nalaze se u raznim tkivima i pokazuju interakciju sa nizom liganda (177).

Sva četiri HER receptora sadrže cisteinom bogat ekstracelularni domen za vezivanje liganda (sadrži 632 amino kiseline), transmembranski lipofilni domen (sadrži 22 amino kiseline) i intracelularni domen sa tirozin kinaznom katalitičkom aktivnošću (sadrži 580 amino kiselina) (178). Terminalni karboksil autofosforilacijski segment je odgovoran za aktivaciju signalnog puta nakon vezivanja liganda za ekstracelularni domen (177) (Slika 14).



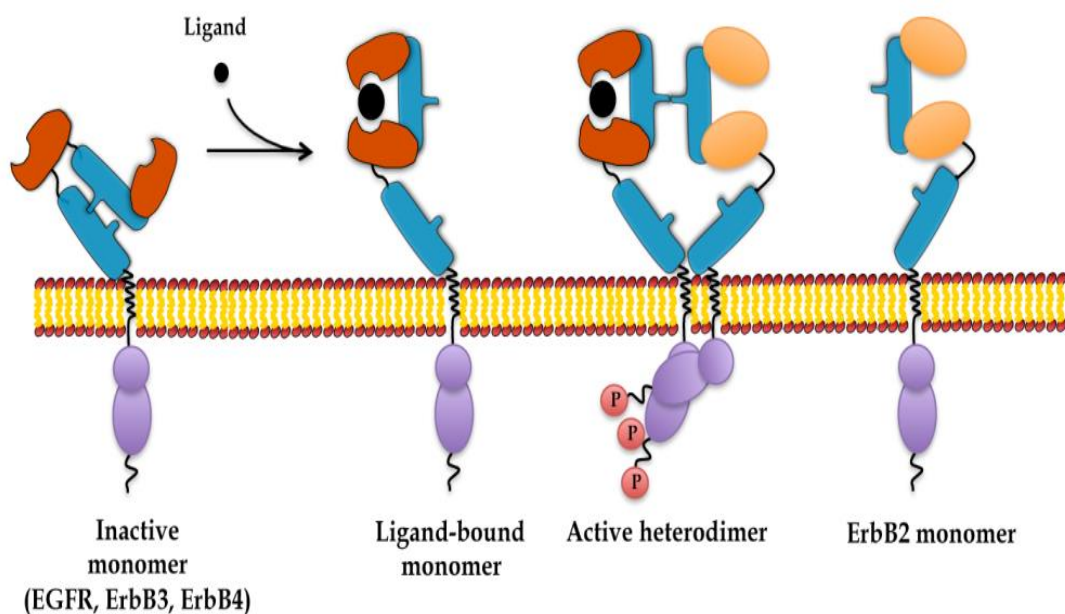
Slika 14. Aktivacija signalnog puta nakon vezivanja liganda za ekstracelularni domen (Preuzeto: [http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6839/fig\\_tab/411759a0\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6839/fig_tab/411759a0_F1.html))



### 1.6.1. 1. Interakcije HER receptora i liganda

Razumevanje delovanja liganda na HER receptore je ključno za razumevanje uloge samih receptora. HER receptori postoje kao monomeri, međutim vezivanjem liganda dolazi do formiranja dimera, koji mogu biti homodimeri sa istim tipom receptora (npr. HER1-HER1) ili heterodimeri sa različitim tipovima receptora (npr. HER1-HER2) (179) (Slika 15). Formiranje dimera dovodi do veće stabilnosti kompleksa između liganda i dva receptora u odnosu na monomerni receptor (177).

Kada se ligand koji je sličan epidermalnom faktoru rasta (ne postoji poznat specifični ligand za HER2 receptor) veže za receptor iz familije HER (HER1, HER3 ili HER4), dolazi do heterodimerizacije ovog receptora sa HER2 (180).



Slika 15. Vezivanje liganda za HER receptore i formiranje dimera.

(Preuzeto: <http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/her2-driven-carcinogenesis-new-mouse-models-for-novel-immunotherapies>)

HER1 receptor ima mnogo uloga i aktivira ga šest liganda: epidermalni faktor rasta (EGF), transformišući faktor rasta  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), amfifregulin, heparin-vezujući EGF, betacelulin i epiregulin (177).

HER3 i HER4 receptori vezuju neureguline (NGFs), koji čine familiju strukturno raznolikih peptida (179). Signalizacija svih neuregulinskih liganda je usmjerena kroz mitogenu aktivaciju protein kinaze (MAPK) (181).

HER2 je ko-receptor za mnogo različitih liganda i transaktivator EGF-sličnih liganda, što rezultira formiranjem HER1-HER2 heterodimera (182, 183).

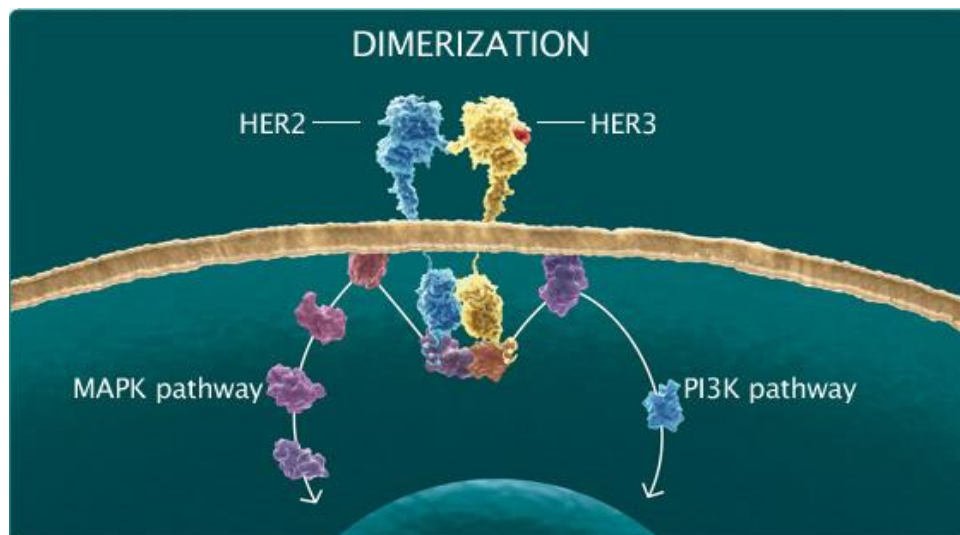
Neuregulini mogu izazvati stvaranje HER2-HER3 i HER2-HER4 heterodimera (181). Međutim, nema poznatih liganda koji mogu dovesti do formiranja HER2 homodimera (HER2-HER2), što ukazuje na to da se ni jedan postojeći ligand ne veže direktno za HER2 (177). U prilog ovoj teoriji govori analiza faktora rasta pox virusa (HER ligandi virusnog porijekla), koja je otkrila da se nijedan ligand ne vezuje direktno za HER2 receptor, ali su svi u mogućnosti da transformišu HER2 u heterodimere (184).

Ovo zapažanje dovodi do zaključka da HER familija vezuje niz liganada. HER2 direktno ne vezuje određeni ligand, ali je poželjan partner za receptor dimerizacije, što mu omogućava obavljanje njegove uloge nakon vezivanja faktora rasta na svom partner receptoru.

Interakcije između receptora u okviru HER familije nisu slučajne. Ispitivanje strukture jednog od liganada objašnjava ovu povezanost. Neuregulin-1 (NDF) je bivalentni molekul sa dva vezujuća mesta za HER receptor: sa visokim afinitetom/usko specifično mesto (N terminal) i sa niskim afinitetom/široko specifično mesto (C-terminal) (185). Terminal sa visokim afinitetom se prvo vezuje za svoju određenu lokaciju (HER3 ili HER4 receptora). Nakon što je terminal sa niskim afinitetom "imobilizovan" na ćelijskoj membrani on povećava svoj afinitet prema potencijalnim partnerima za formiranje dimera. Receptor za koji se prvenstveno vezuje terminal sa niskim afinitetom je HER2. Kao rezultat ove heterodimerizacije, HER2 receptor je u stanju da aktivira signalni put i u odsustvu specifičnog liganda. Ovaj signalni put je pojačan prekomernom ekspresijom HER2 receptora u humanim tumorskim ćelijama (186).

Signali heterodimera su generalno potentniji od signala homodimera, a oni koji sadrže HER2 imaju visok afinitet vezivanja liganda i bolju signalizaciju u poređenju sa hetero i homodimerima bez HER2 (187, 188).

Povećana potencija heterodimera koji sadrže HER2 postoji iz dva razloga: prvo, heterodimeri se odlikuju relativno sporom ligand disocijacijom, a drugi, za razliku od HER1 čija je ligand-indukovana endocitoza brza, HER2 se karakteriše sporom internalizacijom receptora. Na taj način, signalizacija receptora koji sadrže HER2 je relativno produžena i rezultuje boljom aktivacijom signalnih puteva kao što je MAPK. Najpotentniji heterodimer je HER2-HER3 (177) (Slika 16).



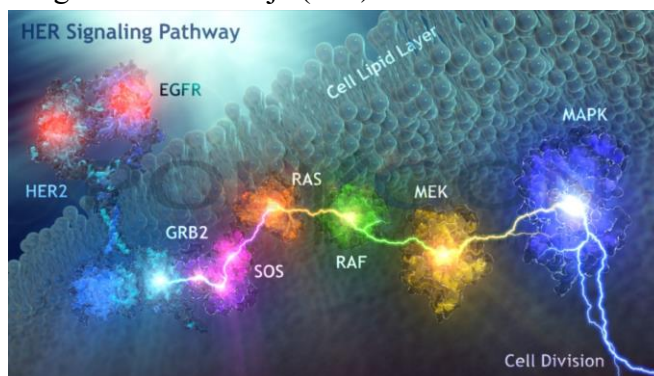
Slika 16. Najpotentniji heterodimer HER2-HER3  
(Preuzeto: <http://www.perjeta.com/hcp/moa>)

Prenos signala familije HER receptora podrazumeva obradu informacija kroz slojevitu organizaciju HER mreže. HER mreža se sastoji od ulaznog sloja (ligandi, faktori rasta), sloj obrade informacija (receptori, SH2-proteini, faktori transkripcije) i izlaznog sloja (rast ćelija, diferencijacija ili migracija). Receptor dimerizacije je važan jer poseduje ogroman potencijal za prenos bioloških poruka kroz mrežnu signalizaciju u odnosu na monodimerne receptore. HER2 se smatra regulatorom signalne mreže jer promoviše i kontroliše signalizaciju (177).

### 1.6.1.2. Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2

Receptor humanog epidermalnog faktora rasta (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-HER2* ili ErbB2) je neophodan za regulaciju normalnog rasta i diferencijacije ćelija, a može biti povezan sa više signalnih puteva (*Hung i Lau, 1999*) (Slika 17).

Deset različitih homo i heterodimernih kombinacija koji sadrže HER2 prenose snažne signale i povezani su sa malignim rastom ćelija (189).



Slika 17. Prenos bioloških poruka HER2 kroz mrežu signala.  
(Preuzeto <http://polygonmedical.tumblr.com/post/38815862066/signal-transduction-medical-illustration-signal>)

Uloga HER2 u rastu ćelija može se prikazati na jednostavan način. Kada postoji uobičajena ekspresija HER2 receptora, ligandi koji se vežu za HER receptore dovode do stvaranja samo nekoliko HER2 heterodimera, a odgovori na faktore rasta su relativno slabi, što rezultira normalnim rastom ćelija. Međutim, kada postoji prekomerna ekspresija HER2 receptora, kao u ćelijama tumora, mnogi ligandi koji potiču prvenstveno iz strome ili iz tumorskih ćelija dovode do prekomernog stvaranja HER2 heterodimera. Heterodimeri ostaju duže na površini ćelije, a njihova signalizacija je poboljšana, što rezultira snažnom signalizacijom u stromi i epitelu, jači odgovor na faktore rasta i na kraju progresivan rast (177). Heterodimeri aktiviraju citoplazmatski domen sa posledičnom autofosforilacijom tirozinskih rezidua unutar ćelije uz pomoć adenozin trifosfata (ATP). Fosfotirozinske residue aktiviraju PI3K/AKT i MEK/ERK signalne puteve. Ovi intracelularni signalni putevi prenose signal koji se emituje sa površine ćelije u jedro, gde moduliraju transkripciju gena koji su uključeni u ključne ćelijske funkcije, uključujući preživljavanje ćelija (antiapoptoza), proliferaciju, angiogenezu, sposobnost invazije i metastaziranja (173).

### 1.6.1.3. Proteinska ekspresija HER2 receptora kod karcinoma pluća

Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora može nastati kao posledica amplifikacije gena i/ili transkripcijskih promena. Prekomerna proteinska ekspresija HER2 receptora nije uvek uzrokovana amplifikacijom HER2 gena (tumori pluća, mezenhimalni tumori, tumori mokraćne bešike i jednjaka), u tim slučajevima prekomerna ekspresija može nastati i usled poremećaja transkripcije ili posttranskripcije (190).

U karcinomima dojke, u 92% slučajeva povećana ekspresija HER2 receptora je posledica amplifikacije HER2 gena (više od normalne dve kopije gena) (191). Amplifikacija dovodi do povećane transkripcije HER2 gena i istovremeno povećava sintezu HER2 proteina. U ćelijama raka, količina HER2 proteina može biti 100 puta veća od onih u normalnim ćelijama (192).

Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora i/ili amplifikacija HER2 gena ima ključnu ulogu u razvoju i progresiji mnogih karcinoma, posebno dojke i želuca (193, 194).

U studijama koje su ocenjivale povećanu proteinsku ekspresiju HER2 receptora u NSCLC koristeći imunohistohemiju, dobijeni su različiti podaci. Evaluacijom objavljenih radova *Hirsch i sarad. iz 2002. godine* iznet je podatak da se pojačana ekspresija HER2 receptora u NSCLC kreće u rasponu 25% do 57%, sa najvećom učestalošću u adenokarcinomu (195). Od 2003. do 2012. godine studije iz ove oblasti pokazale su nešto drugačije podatke. Učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u NSCLC kretala se od 0.87% do 36%, dok je HER2 genska amplifikacija bila zastupljena od 10% do 20% slučajeva (196-202).

Iako se učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u NSCLC od studije do studije značajno razlikuje, većina autora se slaže da je povećana ekspresija najviše zastupljena u adenokarcinomu u odnosu na druge histološke tipove NSCLC. Posljednja istraživanja pokazuju da je učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora 2,4%, i da su kod većine HER2 pozitivnih tumora prisutne metastaze u limfnim čvorovima (30.5% vs. 53.3%,  $P = 0.015$ ), odnosno da se radi o pacijentima u uznapredovalom stadijumu bolesti (19.0% vs. 36.7%,  $P = 0.031$ ) (203).

Postojanje diskrepance među objavljenim rezultatima povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u NSCLC u različitim studijama, može se objasniti različitim tehnikama koje se koriste. Najčešće se koristi imunohistohemijska analiza. Rezultati mogu varirati u zavisnosti od vrste antitela koje se koristi, koncentracije antitela, očuvanosti tkiva, kao i subjektivnoj pristrasnosti u očitavanju rezultata. Različite studije koriste i različite protokole za ocjenjivanje povećane proteinske ekspresije HER2 receptora kod NSCLC.

#### 1.7.1.4. Mutacija i amplifikacija HER2 gena u karcinomu pluća

HER2 je dominantni gen koji spada u grupu protonokogena, lokalizovan u normalnim ljudskim ćelijama kao jedna kopija na dužem kraku (Q21) hromozoma 17 (204). Ovaj gen je prvo bio identifikovan u hemijski izazvanom neuroblastomu pacova (*Schechter i sarad., 1984.*), koji kodira 185-kDa receptor (HER2 receptor), tipa tirozin kinase, koji je sličan EGFR.

HER2 mutacije se dešavaju u prva četiri egzona tirozin-kinaznog domena (egzoni od 18 do 21), uključujući i najčešću mutaciju na egzonu 20 sa A775\_G776insYVMA insercijom/duplikacijom na COOH-terminalnoj strani C-heliksa, koja vodi aktivaciji receptora i nishodnih AKT i MEK signalnih puteva (204, 205).

Mutacije HER2 gena u NSCLC prvi put se opisuju 2004. godine. Učestalost HER2 genske mutacije u NSCLC je oko 4%, sa najvećom učestalošću u adenokarcinomu od 10% (196).

*Grob i sarad. 2012.* godine analizirali su 526 NSCLC koristeći FISH metodu. U ovoj studiji HER2 genska amplifikacija je bila zastupljena u 3% tumora, a od toga je 2% tumora pokazalo *high level* amplifikaciju. U odnosu na histološki tip genska amplifikacija je najčešća bila u adenokarcinomu (6%), i to kod slabo diferentovanih adenokarcinoma (206). Ova grupa tumora čini metu za anti-HER2 terapiju. U nedavno objavljenom studiji HER2 genska mutacija je bila detektovana u 3,6% NSCLC, sa mutacijama prisutnim samo u adenokarcinomu, a ako se analiziraju samo adenokarcinomi učestalost HER2 genske mutacije se povećava na 4,3%. HER2 genska amplifikacija je bila identifikovana u oko polovine tumora sa mutacijom HER2 gena, a ova mutacija ocenjena je kao nezavisni prognostički faktor nepovoljnog ishoda u invazivnim adenokarcinomima pluća (203). U selektovanoj

populaciji pacijenta sa NSCLC koji su EGFR/KRAS/ALK-mutacija negativni, HER2 mutacije su zastupljene u 6% (207). HER2 mutacije su češće kod žena, nepušača sa histološkim tipom adenokarcinoma (207-209).

#### **1.6.1.5. Metode određivanja HER2 statusa**

Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora određuje se imunohistohemijskom metodom (IHC) primenom nekog od mnogobrojnih monoklonalnih antitela, dok se za određivanje amplifikacije HER2 gena koriste „Fluorescence in situ hybridization“ (FISH), „Chromogenic in situ Hybridization“ (CISH) и “Silver in situ Hybridization” (SISH).

##### **1.6.1.5.1. Imunohistohemijska metoda**

Imunohistohemijska metoda (IHC) se koristi za određivanje proteinske ekspresije HER2 receptora. To je jednostavna i brza procedura, koja zahteva nekoliko reagensa. S obzirom da je aparatura za izvođenje ove tehnike široko dostupna, IHC se lakše primenjuje u patološkim laboratorijama. Međutim, osetljivost i specifičnost IHC mogu se značajno razlikovati u zavisnosti od antitela koje se koristi (210, 211). Pored toga, fiksacija tkiva, obrada tkiva i metoda detekcije proteinskog produkta HER2 gena mogu uticati na intezitet imunohistohemijskog bojenja (212). Standardizacija metodologije i tumačenja rezultata, kao i uključivanje validnih kontrola obavezni su za IHC HER2 testiranje. Komercijalno dostupan HercepTest ispunjava ove kriterijume i odobren je od Američke administracije za hranu i lekove (*United States Food and Drug Administration*).

Ocenjivanje ekspresije HER2 (IHC) u NSCLC pluća u većini studija se razlikuje od standardnog protokola koji se koristi kod karcinoma dojke. U studiji koju su objavili *Hirsch i sarad*, 2002. godine prikazani su obrasci imunohistohemijskog bojenja HercepTest-om u adenokarcinomu pluća. U ovoj studiji 16% NSCLC pluća pokazalo je povećanu ekspresiju HER2 (2+, 3+) sa najvećom učestalošću u adenokarcinomu od 35% i krupnoćelijskom karcinomu od 20% (195). Kod NSCLC pluća ne postoji standardizovan protokol za ocenjivanje HER2 pozitivnosti, zato su tehnike molekularne biologije neophodne da bi se potvrdili rezultati imunohistohemije.

U NSCLC pluća HER2 imunohistohemijska pozitivnost je češća nego amplifikacija gena. Relativno veliki broj tumora sa umerenom pozitivnosti HER2 (2+) ne pokazuje amplifikaciju gena, dok samo 10% pokazuje amplifikaciju (206). Prema dosadašnjim podacima molekularna heterogenost kod karcinoma pluća je češća u odnosu na karcinom dojke.

### 1.6.1.5.2. Fluorescentna in situ hibridizacija

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je tehnika molekularne genetike koja omogućava direktnu identifikaciju delova gena, celih gena, specifičnih hromozomskih regija i celih hromozoma. Metoda omogućava vizualizaciju promena ne samo u metafaznim hromozomima nego i u interfaznim jedrima. Metoda FISH temelji se na hibridizaciji dve komplementarne sekvence, što je i jedno od osnovnih načela molekularne genetike. Upotrebom specifičnih proba dobijaju se informacije o genomu. Svaka proba veže se za specifično mesto na hromozomu (ili celi hromozom) i na taj način se detektuju specifične regije (npr.centromera).

FISH je visoko osetljiva, specifična i standardizovana metoda koja se može koristiti na malim uzorcima tkiva. FISH metoda je sposobna da prevaziđe mnoga tehnička i interpretativna ograničenja drugih tehnika. Zato što je definicija pozitivnosti zasnovana na postojanju različitih signala u ćeliji, FISH je potencijalno manje subjektivan od IHC. FISH može procijeniti i broj kopija HER2 gena u odnosu na broj hromozoma 17, što omogućava razlikovanje amplifikacije gena od hromozomske poliploidije. Međutim, samo je ograničen broj patoloških laboratorija opremljen da proceni HER2 status FISH metodom (213). Nedostatak ove metode je skupa oprema i potreba za primenom fluorescentnog mikroskopa sa fluorescentnim sondama za detekciju specifičnih sekvenci DNK u hromozomima.

FISH signali blede za nekoliko nedelja pa je rezultate potrebno registrovati skupim digitalnim fotoaparatom (214). *Hirsch i sarad.* 2002. godine su pronašli povezanost između IHC i FISH dobijenih rezultata u dve trećine NSCLC pluća koje su testirali (195).

### 1.6.1.5.3. Hromogena in situ hibridizacija

Hromogena in situ hibridizacija (CISH) je alternativna metoda FISH tehnici za utvrđivanje broja kopija HER2 gena koja koristi hromogeni metod detekcije (215-218). Za razliku FISH metode u kojoj se koriste dve boje, CISH se bazira na kolorimetrijskoj detekciji samo jedne probe. Tačka koja označava graničnu vrednost za definisanje HER2 amplifikacije je šest ili više kopija. Tipična genska amplifikacija CISH metodom predstavlja peroksidaza-pozitivne nakupine (klustere) multiplih kopija gena, koji se lako vizualizuju svetlosnim mikroskopom. U brojnim studijama sprovedenim širom sveta, u kojima su na uzorcima tumora dojke poređene FISH i CISH metode, utvrđena je dobra korelacija. Najveća prednost CISH metode u odnosu na FISH je što se rezultati mogu očitavati na svetlosnom mikroskopu. CISH pločice se mogu arhivirati i ne zahtevaju registrovanje rezultata skupim digitalnim fotoaparatom. Zahvaljujući hematoksilinskom bojenju moguć je uvid u histološku građu i odabir pravog polja za brojanje kopija HER2 gena.

Najveći nedostatak ove metode je nemogućnost procene prisustva polizomije hromozoma 17. Ovaj problem može biti prevaziđen korišćenjem CISH metode dvostrukog bojenja (219).

Komercijalna automatizovana verzija CISH metode koja koristi srebro kao hromogen naziva se “*Silver in situ Hybridization*” (SISH).

#### 1.6.1.5.4. Silver in situ hibridizacija

Srebrom poboljšana in situ hibridizacija (SISH), koja je uvedena kao alternativa za FISH, koristi svetlo neprozirno srebro umesto fluorescentnih spot-signala. Kako se SISH može izvoditi brže od FISH-a i zahteva samo konvencionalni svetlosni mikroskop, prikladniji je za rutinsku upotrebu u patološkim laboratorijama. Studija koja je koristila jednobojni SISH pokazala je stopu usklađenosti od 98% između metoda SISH i FISH (220).

*Nitta i sarad.* su objavili razvoj “dual-color” SISH tehnike za procenu HER2 statusa gena (221). U korelacionoj studiji između “dual color” SISH-a i FISH-a na citološkim uzorcima potvrđena je visoka stopa usklađenosti između “dual color” SISH i FISH metode od 92,9% (222). “Dual-color” SISH se zasniva na korišćenju dve odvojene probe u jednom slajdu: proba HER2, što rezultira crnim signalom i proba CEP17, što rezultira crvenim signalom. Ovaj metod omogućava izračunavanje odnosa HER2/CEP17 i otkrivanje polizomije hromozoma 17 na jednom slajdu.

#### 1.6.1.6. Značaj proteinske ekspresije HER2 receptora i genske amplifikacije u NSCLC

Ekspresija HER2 receptora u humanim tumorima povezuje se sa agresivnijim ponašanjem i lošijom prognozom. Brojne studije sugerišu da je prekomerna proteinska ekspresija HER2 receptora u NSCLC povezana sa uznapredovalom lokalnom ili metastatskom bolesti i lošijom prognozom (*Kern i sarad, 1990; Tateishi i sarad, 1991; Harpole i sarad, 1995.*) (223-225), posebno kada je u kombinaciji sa K-ras mutacijom (*Kern i sarad, 1994.*)(226) ili Bcl-2 mutacijom (*Kim i sarad, 1998.*)(227), dok druge studije ukazuju da nema značajne povezanosti (*Pfeiffer i sarad, 1996.*)(228).

U sistematskom pregledu literature za procenu prognostičkog značaja prekomerne ekspresije HER2 na preživljavanje bolesnika sa NSCLC, izveden je zaključak da je prisutnost ovog receptora kao prognostičkog faktora povezana sa lošijim preživljavanjem. Većina studija (57%) je dokazala ovu korelaciju, dok u 11% studija nije dokazana ova povezanost. Ovaj sistematski pregled ukazao je i na postojanje statistički značajne razlike među objavljenim pozitivnim rezultatima HER2 ekspresije u NSCLC (229).

Zašto je prekomerna ekspresija HER2 u NSCLC povezana sa lošijom prognozom nije poznato, pogotovo jer se ne odnosi na histološki tip i proširenost bolesti (229). Postoje neke hipoteze koje pokušavaju da objasne ovaj fenomen. Prekomerna ekspresija HER2 omogućava adheziju i invazivni rast tumorskih ćelija preko svoje udruženosti sa kadherin-catenin



kompleksom (*Ochiai i sarad, 1994.*) (230) i povezana je sa povećanom sposobnosti migracije ćelija (*Bernstein i sarad, 1994.*) (231).

Koekspresija HER2 i EGFR češća je kod pacijenata sa metastazama i povezana je sa lošijim preživljavanjem (*Tateishi i sarad, 1994.*) (232).

Ograničen broj slučajeva, nedostatak sistema bodovanja za određivanje proteinske ekspresije HER2, konflikti rezultati u očitavanju, dovode do različitih podataka pa je teško tumačiti ove studije.

*Harpole i sarad.* (233) su predložili da pored drugih parametara (muški pol, prisutnost simptoma, veličina tumora, slaba ćelijska diferencijacija, vaskularna invazija, p53 ekspresija i visok Ki67 indeks), prekomerna proteinska ekspresija HER2 može biti nezavisni prognostički faktor kod pacijenata sa NSCLC u stadijumu I.

*Osaki i sarad.* (234) pokazali su da su pacijenti sa adenokarcinomom pluća u stadijumu IIIB ili T4 imali povišen serumski nivo HER2 proteina i da je serumski nivo u korelaciji sa prekomernom proteinskom ekspresijom HER2 u tkivnim isečcima iz tumora.

*Diez i sarad.* (235) nisu našli značajnu korelaciju između prekomerne proteinske ekspresije HER2 i TNM klasifikacije kod NSCLC, ali su dokazali da je skraćeno srednje vreme relapsa tumora proporcionalno porastu proteinske ekspresije u tumorskom tkivu.

*Petrusevska i sarad.* (236) ukazuju da prekomerna proteinska ekspresija HER2 kod pacijenata sa NSCLC korelira sa uznapredovalim kliničkim stadijumom bolesti.

Meta-analiza iz 2010. god. (237) pokazuje da je prekomerna proteinska ekspresija HER2 potvrđena IHC metodom značajno povezana sa lošom prognozom kod NSCLC i to najviše kod adenokarcinoma. Stratifikovana analiza u odnosu na stadijum NSCLC, pokazala je lošiju prognozu u ranom stadijumu I i II. Prekomerna ekspresija HER2 određena IHC, a ne amplifikacijom, povezana je sa lošom prognozom kod NSCLC, naročito kod adenokarcinoma u ranom stadijumu. Rezultati ove analize sugerišu da pacijenti sa adenokarcinomom pluća u ranom stadijumu koji pokazuju prekomernu proteinsku ekspresiju HER2 bi trebali imati agresivniji tretman, kroz neoadjuvantni ili adjuvantni pristup.

Većina dosadašnjih studija je pokazala da amplifikacija HER2 gena kod NSCLC određivana FISH metodom nije imala prognostički značaj (237).

U toku je studija u kojoj su pacijenti sa NSCLC koji su imali mutaciju HER2 gena primili HER2 ciljanu terapiju u različitim stadijumima bolesti. Na osnovu ohrabrujućih odgovora na terapiju i dugogodišnjeg preživljavanja pacijenata može se pretpostaviti da su HER2 mutacije jednako prediktivne i prognostičke (238).

### 1.6.1.7. Anti-HER2 terapija kao terapijska perspektiva kod karcinoma pluća

Određivanje ekspresije HER2 receptora u NSCLC je potencijalno važno kako iz prognostičkih razloga, tako i u svrhu lečenja. Identifikacija HER2 pozitivnih NSCLC omogućava određivanje grupe pacijenata koji bi bili kandidati za specifičnu terapiju. HER2 bi mogao biti potencijalna terapijska meta, a njegova lokalizacija na površini ćelije čini ga lako dostupnim za ciljanu terapiju.

Trastuzumab (HerceptinR), humano monoklonsko antitijelo koje prepoznaje HER2 receptor je u fazi istraživanja za lečenje karcinoma pluća koji pokazuju povećanu proteinsku ekspresiju HER2 receptora. Međutim, problem predstavlja izbor metode detekcije HER2 receptora i nepostojanje utvrđenog protokola za očitavanje rezultata kao što postoji kod karcinoma dojke i želuca.

HER2 "pozitivni" NSCLC su relativno otporni na konvencionalnu hemioterapiju i radioterapiju (202, 239) i predstavljaju glavne kandidate za ciljanu molekularnu terapiju. U prošlosti monoterapija Trastuzumabom nije pokazala benefit kod HER2 pozitivnih NSCLC (240). Dodavanje Trastuzumaba hemioterapiji pokazuje različite rezultate (228, 241, 242), ali većina ovih pacijenata nije imala prethodno određen HER2 status (243).

Rezultati II faze randomizovane studije koja je koristila kombinaciju gemcitabine-cisplatin sa i bez Herceptina, ukazuju na to da je podgrupa pacijenata sa HER2 proteinskom ekspresijom 3+ i/ili prisutnom amplifikacijom gena koji su primali Herceptin imali relativno dobar odgovor na terapiju na osnovu stope odgovora i srednjeg vremena preživljavanja bez progresije bolesti. Pacijenti sa HER2 proteinskom ekspresijom 2+/ FISH negativnim rezultatom amplifikacije nisu imali benefit sa ovom terapijom. Svi slučajevi koji su pokazali izraženu proteinsku ekspresiju ocenjenu sa 3+ IHC metodom pokazali su i amplifikaciju gena FISH metodom, dok slučajevi umerene proteinske ekspresije ocenjene 2+ IHC metodama nisu potvrđeni FISH retestiranjem. Ova studija je ukazivala da odabir pacijenata koji imaju proteinsku ekspresiju ocenjenu IHC metodom sa 3+ i umerenu ekspresiju ocenjenu sa 2+ koja je potvrđena i amplifikacijom FISH metodom može biti efikasana strategija za lečenje NSCLC Herceptinom, kao što je potvrđeno kod karcinoma dojke (244).

Dok je kod karcinoma dojke prekomerna proteinska ekspresija HER2 i/ili genska amplifikacija povezana sa osetljivošću na HER2-ciljane lekove poput trastuzumaba, lapatiniba, pertuzumaba i trastuzumab-emtansin, kliničko istraživanje karcinoma pluća je usporeno posle prvih negativnih kliničkih ispitivanja trastuzumaba dodatog hemioterapiji u uznapređovalom NSCLC.

U II fazi studije koju su izvodili "Cancer and Leukemia Group B", samo korišćenje trastuzumaba nije pokazalo značajan klinički benefit NSCLC koji su imali povećanu proteinsku ekspresiju HER2 ocenjenu sa 2+ ili 3+ (240). U studiji koja je ispitivala dodatak trastuzumaba gemcitabinu i cisplatinu kod 103 HER2 pozitivnih pacijenata sa NSCLC, trastuzumab je dat istovremeno sa hemioterapijom i nakon hemioterapije sam, u fazi održavanja. Iako je kombinacija dobro tolerisana, nije dobijen benefit u preživljavanju u svim

HER2 IHC-pozitivnim NSCLC. Međutim, 80% pacijenata sa IHC ekspresijom HER2 3+ i/ili FISH dokazanom amplifikacijom, su bili živi nakon praćenja od 6 meseci, sa stopom odgovora od 83% i srednjim vremenom preživljavanja bez progresije bolesti od 8,5 meseci (241).

Pored toga, u toku je procena uspešnosti lečenja pertuzumabom u kombinaciji sa trastuzumabom, kao i kombinacija trastuzumab-emtansin kod pacijenata sa NSCLC kod kojih je prekomerna proteinska ekspresija HER2 ocenjena sa 3+ (245).

Mali molekul lapatinib (prvi dvostruki inhibitor EGFR i HER2 receptora) nedavno je testiran kao monoterapija kod NSCLC (246). Iako rezultati nisu pokazali značajnu tumorsku regresiju, jedan broj pacijenata sa HER2 amplifikacijom je pokazao delimičan odgovor na terapiju.

Predklinička istraživanja, sugerišu da prekomerna proteinska ekspresija HER2 i/ili genska amplifikacija kod NSCLC bi mogla biti terapijska meta za uvođenje Transtuzumaba u kombinaciji sa citotoksičnim agensima koji bi ispoljili sinergističku antitumorsku aktivnost (245).

Istraživanje efikasnosti ciljane molekularne terapije, humanim monoklonalnim antitelom specifičnim za HER2 receptor, može biti osnov za uvođenje rutinskog određivanja HER2 statusa kod adenokarcinoma pluća, što nameće potrebu za uvođenjem standardizovanog protokola za određivanje HER2 statusa kod adenokarcinoma pluća.

U dosadašnjim studijama najveća potencijalna korist ciljanom terapijom kod pacijenata sa NSCLC je viđena u grupi pacijenata sa povećanom proteinskom ekspresijom HER2 ocenjenom sa 3+, koja je najčešća kod slabo diferentovanog adenokarcinoma (241, 244, 245). Međutim, pošto je broj pacijenata sa povećanom proteinskom ekspresijom HER2 receptora, ocenjenom sa 3+, u većini studija mali, neophodna su dalja istraživanja da razjasne efikasnost molekularne ciljane terapije za ovu grupu pacijenata.

„*National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*“ uključio je Transtuzumab i Afatinib kao potencijalnu terapijsku opciju za pacijente sa NSCLC kod kojih je prisutna HER2 mutacija (247), iako vreme primene ovih lekova u toku bolesti nije definisano.

## 2. CILJEVI

1. Utvrditi učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u adenokarcinomu pluća.
2. Uporediti rezultate povećane proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene korišćenjem HER2 antitela „Hercep Test Dako“ i rezultate dobijene korišćenjem HER2 antitela „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“.
3. Uporediti prisustvo amplifikacije HER2 gena pomoću in situ hibridizacije (ISH) (Dual IHC HER2 kit; Ventana Medical Systems) retestiranjem uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora ocenjena sa 2+ i 3+ dobijena „Hercep Test Dako“ u odnosu na prisustvo amplifikacije HER2 gena na uzorcima koji su pomoću „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“ ocenjeni sa 2+ i 3+.
4. Uporediti učestalost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora i prisustva HER2 genske amplifikacije kod različitih histoloških podtipova adenokarcinoma pluća (lepidični, acinarni, papilarni, mikropapilarni, solidni i drugim varijantama adenokarcinoma) na osnovu nove klasifikacije SZO (124).
5. Utvrditi da li je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora u adenokarcinomu pluća i/ili prisustvo genske amplifikacije povezano sa demografskim (starost i pol pacijenta) parametrima, pušačkim statusom, pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno stadijumom bolesti.

### 3. HIPOTEZA RADA

Hipoteza se sastoji od nekoliko pretpostavki:

1. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora u adenokarcinomu pluća je veća od 1,5%.
2. Dobijeni rezultati povećane proteinske ekspresije HER2 receptora u adenokarcinomu pluća koristeći Hercep Test Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) slažu se u više od 90%.
3. U svim slučajevima u kojima je proteinska ekspresija HER2 receptora ocenjena sa 2+ ili 3+ sa jednom ili obe navedene metode nađena je i amplifikacija HER2 gena upotrebom ISH (Dual IHC HER2 kit; Ventana Medical Systems).
4. Povećana proteinska ekspresija i prisustvo HER2 genske amplifikacije je češće kod solidnih i mikropapilarnih, odnosno slabo diferentovanih adenokarcinoma pluća u odnosu na lepidične, acinarne i papilarne adenokarcinome pluća.
5. Povećana proteinska ekspresija i prisustvo HER2 genske amplifikacije u adenokarcinomu pluća najčešće je kod mlađih muškaraca, nepušača, sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim organima, infiltracijom pleure i okolnih struktura, odnosno sa višim stadijumom bolesti.

## 4. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je bilo retrospektivno-prospektivnog karaktera. Deo istraživanja je sproveden u Centru za patologiju Instituta za plućne bolesti Vojvodine (IPBV) u Sremskoj Kamenici, a deo je sproveden u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore (KCCG) u Podgorici.

Istraživani materijal sačinjavali su iseći tkiva pluća pacijenata koji su na IPBV prvi put operisani od invazivnog adenokarcinoma pluća.

U retrospektivnom delu studije, pločice i kalupi iz arhive Centra za patologiju IPBV ponovo su patohistološki analizirani. Delovi očuvanog, vitalnog tumorskog tkiva su obeleženi na pločici i kalupu i ti delovi su bili podvrgnuti IHC bojenju HER2 antitelima i tehnicu ISH.

U prospektivnom delu studije, uzorci tkiva pluća dobijeni operativnim putem su bili obrađeni u patohistološkoj laboratoriji Centra za patologiju IPBV, a potom mikroskopski analizirani. Delovi očuvanog, vitalnog tumorskog tkiva su obeleženi na pločici i kalupu i ti delovi su bili podvrgnuti IHC bojenju HER2 antitelima i tehnicu ISH.

Podaci za sve pacijente dobijeni su iz istorija bolesti, onkoloških kartona i patohistoloških nalaza. Za prikupljanje svih neophodnih podataka korišćen je prethodno dizajniran Protokol za ispitanike (Prilog br.1).

### 4.1. NAČIN IZBORA, VELIČINA I KONSTRUKCIJA UZORKA

U istraživanje je bilo uključeno 148 bolesnika Instituta za plućne bolesti Vojvodine koji su operisani u periodu od januara 2010. do decembra 2017. godine, kod kojih je na operativnom materijalu u Centru za patologiju IPBV patohistološki dokazan invazivni adenokarcinom pluća.

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje bili su:

- bolesnici koji su prvi put operisani, odnosno da prethodno nisu imali dijagnostikovan invazivni adenokarcinom pluća
- bolesnici koji nisu primali preoperativnu radioterapiju i/ili hemioterapiju

Kriterijumi za isključenje iz istraživanja bili su:

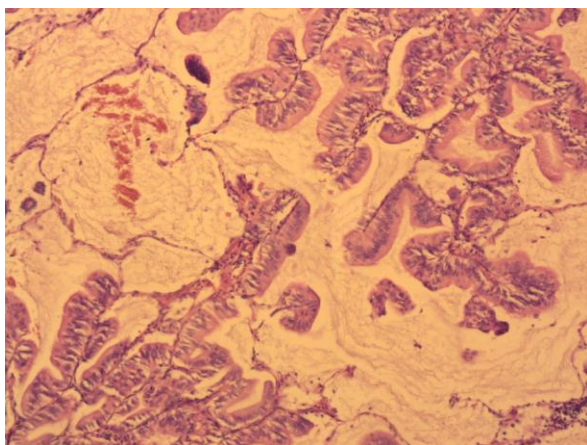
- bolesnici koji nisu prvi put operisani, odnosno bolesnici koji su ranije imali dijagnostikovan adenokarcinom pluća
- bolesnici koji su primali preoperativno radioterapiju i/ili hemioterapiju
- materijal neadekvatan za analizu
- nedostatak podataka iz medicinske dokumentacije

Anamnestički podaci prikupljeni iz istorija bolesti bili su: starosna dob, pol i pušačke navike. Podaci dobijeni iz patohistoloških nalaza i onkoloških kartona bili su: veličina tumora, histološki podtip adenokarcinoma, infiltracija pleure i okolnih struktura, broj i grupa limfnih čvorova zahvaćenih metastazama, prisustvo lokalnih metastaza u plućnom parenhimu sa iste i sa kontralateralne strane, prisustvo i lokalizacija udaljenih metastaza, patohistološka TNM klasifikacija (pTNM) i klinički stadijum bolesti (kTNM).

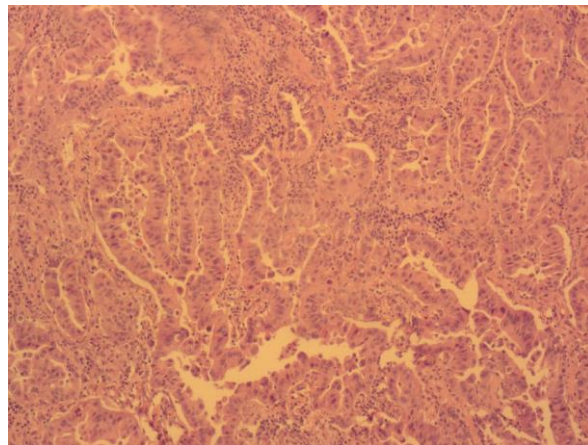
#### 4.2. PATOHISTOLOŠKA EVALUACIJA TKIVNIH UZORAKA

Kod svih bolesnika je iz hirurški resećiranog materijala uziman adekvatan broj reprezentativnih uzoraka iz tumorskog tkiva, okolnog plućnog parenhima i limfnih čvorova. Uzorci su fiksirani u 10% pufersanom formalinu 48-72 časa, dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljeni u hloroformu, prožeti i ukalupljeni u parafin, sečeni na mikrotomu na serijske rezove debljine 4 mikrona, deparafisani, bojeni rutinskom hematoksilin-eozin metodom (H&E) i montirani DPX-om. Kada je postojala nedoumica oko histološkog tipa tumora, postojanja invazije visceralne pleure, diferencijacije podtipova adenokarcinoma ili prisutva metastaze u limfnim čvorovima materijal je sečen na dodatne histološke rezove i bio je podvrgnut histochemijskom ili imunohistochemijskom bojenju (PAS, *Alcian blue*, TTF1, Napsin A, CK7,CK5/6, p63/p40, *synaptophysin*, *chromogranin*).

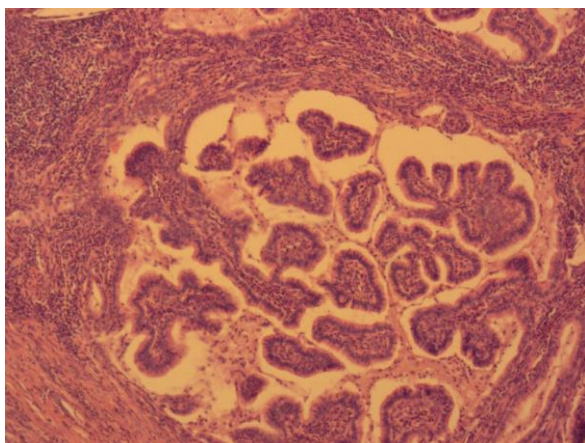
Svi uzorci iz tumorskog tkiva bojeni H&E metodom su klasifikovani primenom IASLC/ATC/ERS kriterijuma. Semikvantitavno je određena svaka komponenta invazivnog karcinoma koja je bila zastupljena u  $\geq 5\%$  tumorskog tkiva. Definisan je dominantni tip kao obrazac rasta koji je u najvećem procentu zastupljen u tumoru. Uzorci su prema dominantnom tipu podeljeni u grupe: lepidično dominantni (Slika 18), acinarno dominantni (Slika 19), papilarno dominantni (Slika 20), mikropapilarno dominantni (Slika 21) i solidno dominantni tip (Slika 22).



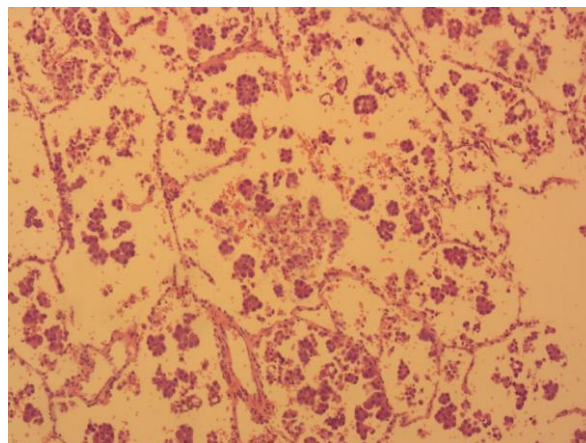
Slika 18. Lepidično predominantni tip, H&E,100x.



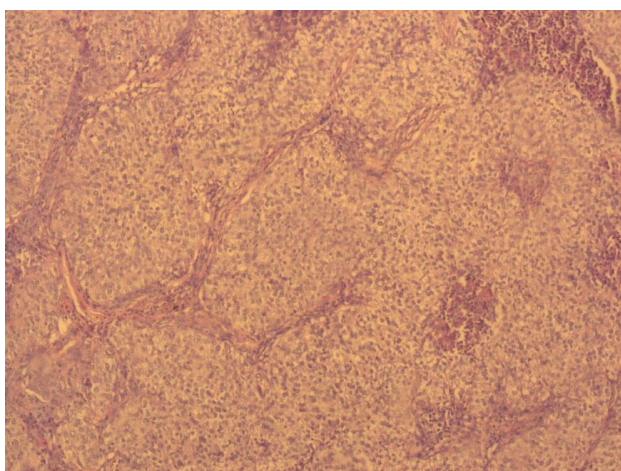
Slika 19. Acinarno predominantni tip, H&E,100x.



Slika 20. Papilarno predominantni tip, H&amp;E,100x.



Slika 21. Mikropapilarno predominantni tip, H&amp;E,100x.



Slika 22. Solidno predominantni tip, H&amp;E,100x.

Za patološku TNM klasifikaciju i određivanje stadijuma bolesti korišćeno je sedmo izdanje TNM klasifikacije karcinoma pluća. Klasifikaciju adenokarcinoma, imunohistohemijsku evaluaciju proteinske ekspresije HER2 receptora i amplifikaciju HER2 gena izvršila su dva patologa zaposlena u Centru za patologiju KCCG. Konačni patohistološki nalaz je bio rezultat konsezusa. U slučajevima gde je postojalo neslaganje dva patologa traženo je mišljenje i trećeg patologa, supervizora, zaposlenog u Centru za patologiju IPBV koji se u svakodnevnom radu bavi dominantno plućnom patologijom sa najdužim stažom u ovoj oblasti.

#### **4.3. IZRADA TKIVNIH MIKROEREJ (*Tissue microarray*, TMA) KALUPA**

Izrada TMA kalupa vršena je u patohistološkoj laboratoriji Centra za patologiju KCCG.

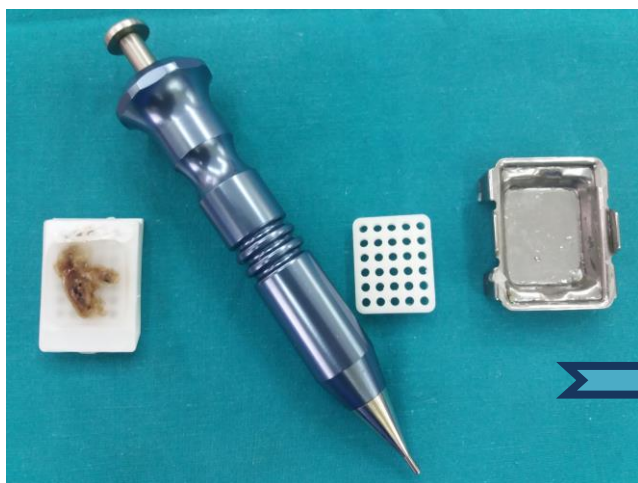
Nakon patohistološke evaluacije uzoraka svih 148 bolesnika, odabran je po jedan reprezentativan uzorak tumorskog tkiva za svakog pacijenta.



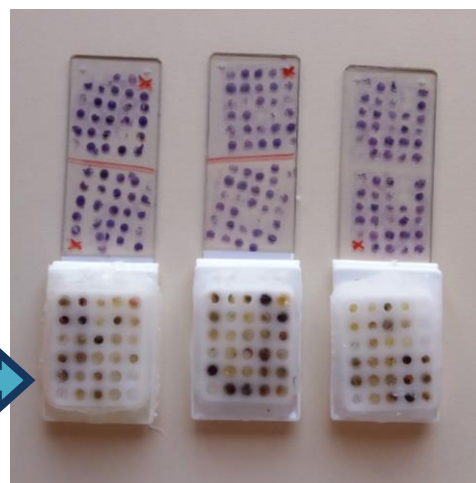
Na pločici i odgovarajućem kalupu (blok donora) markirano je kružno područje očuvanog, vitalnog tumorskog tkiva, prečnika do 5mm.

Za izradu TMA blokova korišćen je Quick-Ray Manual Tissue Microarrayer set sa odabranim blokom primaoca, 3mm x 30 polja (Slika 23), poštujući sledeći protokol:

- Pomoću Quick Ray® igle prečnika 3mm odvojeni su označeni delovi tumorskog tkiva iz bloka donora.
- Pritiskom na klip Quick Ray® ubačeno je ekstrahovano tkivo iz bloka donora u obliku cilindra dubine 5mm u odgovarajuće rupe bloka primaoca (3mm x 30 polja).
- Kada su popunjena sva polja bloka primaoca staklenom pločicom nežno su gurnuti svi tkivni cilindri kako bi se dobila ravna površina za rezanje na mikrotomu.
- Blok primaoca je stavljen u ugradnu modlu koja se nalazi u setu, sa površinom za sečenje okrenutom prema dole i inkubiran u termostatu 30 minuta na 60° C.
- Blokovi primaoca su izvađeni iz termostata (nakon određenog vremena treba da je blok primaoca potpuno transparentan), nakon toga su ugrađeni na nosač bloka i na hladnoj ploči TMA kalupi su odvojeni od ugradne modle.
- Sečeni su na mikrotomu na serijske rezove debljine 4 mikrona na 4 mikroskopske pločice od kojih su uzorci na prvoj pločici deparafinisani, bojeni rutinskom H&E metodom i montirani DPX-om (Slika 24).



Slika 23. Quick-Ray Manual Tissue Microarrayer set.



Slika 24. TMA kalupi i mikroskopske pločice bojene H&E metodom.

Uzorak svakog pacijenta je označen određenim brojem, a taj isti broj je ubačen u tabelu 5x6 koja odgovara mestu u TMA kalupu gde se taj uzorak nalazi. Radi lakše orijentacije TMA kalupa i unutrašnje kontrole za IHC i ISH u prvo polje u TMA kalupu ubačen je uzorak tkiva karcinoma dojke sa potvrđenom IHC proteinskom ekspresijom HER2 receptora ocenjenom sa 3+ (Tabela 6).

Tabela 6. TMA kalup br. 1

Her3+	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29

#### 4.4. IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE

Imunohistohemijsko bojenje HER2 antitelima (HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5)) vršeno je u imunohistohemijskoj laboratoriji Centra za patologiju KCCG.

Iz 7 TMA kalupa u kojima su ugrađeni tkivni uzorci svih 148 pacijenata, isečeni su rezovi debljine 4 mikrona i hvatani na Superfrost predmetna stakla, pa sušeni na 60°C 30 minuta. Nakon toga vršeno je imunohistohemijsko bojenje sa HER2 antitelima prema uputstvima proizvođača.

Svaki uzorak je bojen sa dve vrste HER2 antitela:

1. HercepTest Dako
2. Ventana anti-HER2/neu (4B5)

##### 4.4.1. HercepTest Dako

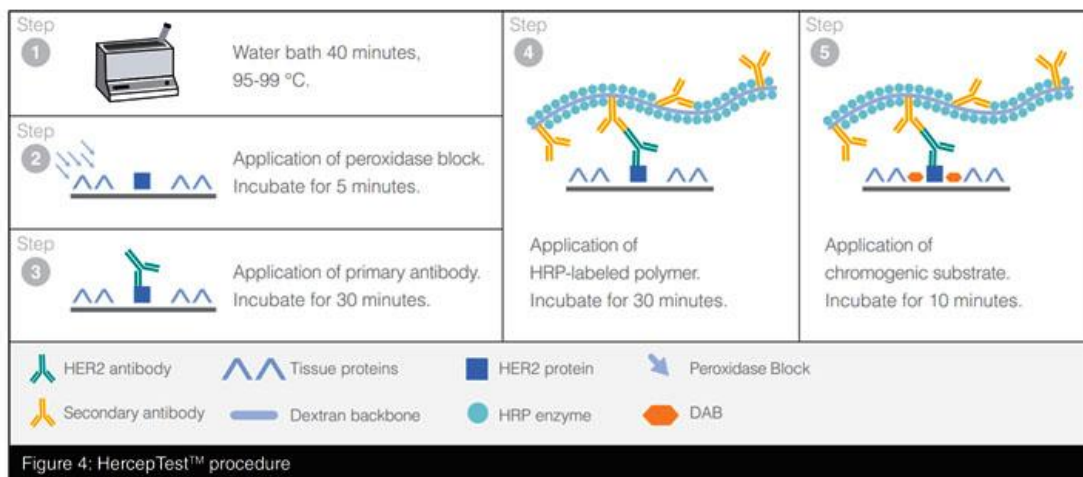
U ovom manualnom bojenju koristili smo Dakovo primarno, humano, zečje HER2 antitelo primenom LSAB+/HRP vizuelizacione metode.

DAKO LSAB+ kit obeležen peroksidazom bazira se na SAB (streptavidin biotin metodi) i koristi visoko rafiniranu avidin-biotin tehniku u kojoj biotinizirano sekundarno antitelo reaguje sa nekoliko streptavidinskih molekula konjugovanih peroksidazom.

Posle deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije kroz seriju alkohola opadajuće koncentracije iseći svih 148 pacijenta su bojani HER2 antitelom primenom HercepTest Dako poštujući sledeći protokol za manuelno provođenje (Slika 25):

**1. Demaskiranje antigena-** tkivni preseci su tretirani u 10mM citratnom puferu (0,1 M limunska kiselina C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 0,1 M natrijum citrat C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, pH 6,0) u mikrotalasnoj rearni 2 puta po 10 min, nakon čega su ispirani dejonizovanom vodom.

**2. Postupak bojenja-** nakon izvršene deparafinizacije i postupka demaskiranja antigena, blokirana je endogena peroksidaza 3% rastvorom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su tkivni preseci inkubirani sa primarnim antitelom u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h. Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih antigena je vršena primenom Streptavidin-biotin-peroksidaza tehnike, prema standardnoj LSAB+ proceduri (DAKO). Iseći su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi sa biotiniziranim anti-mišijim antitelom, a zatim su inkubirani streptavidin-peroksidaza kompleksom, u trajanju od 30 minuta. Kao hromogeni substrat primenjen je 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, DAKO). Nakon svakog inkubiranja uzorci su ispirani u Tris puferisanom rastvoru (TBS: 0,05 M, pH 7,6) i kontrastirani hematoksilinom. Iseći su pokriveni specijalnim vodenim medijumom.



Slika 25. Postupak za manuelno provođenje HercepTest™

(Preuzeto: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630\\_herceptest\\_interpretation\\_manual-breast\\_ihc\\_row.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf))

#### 4.4.2. Ventana anti-HER2/neu (4B5)

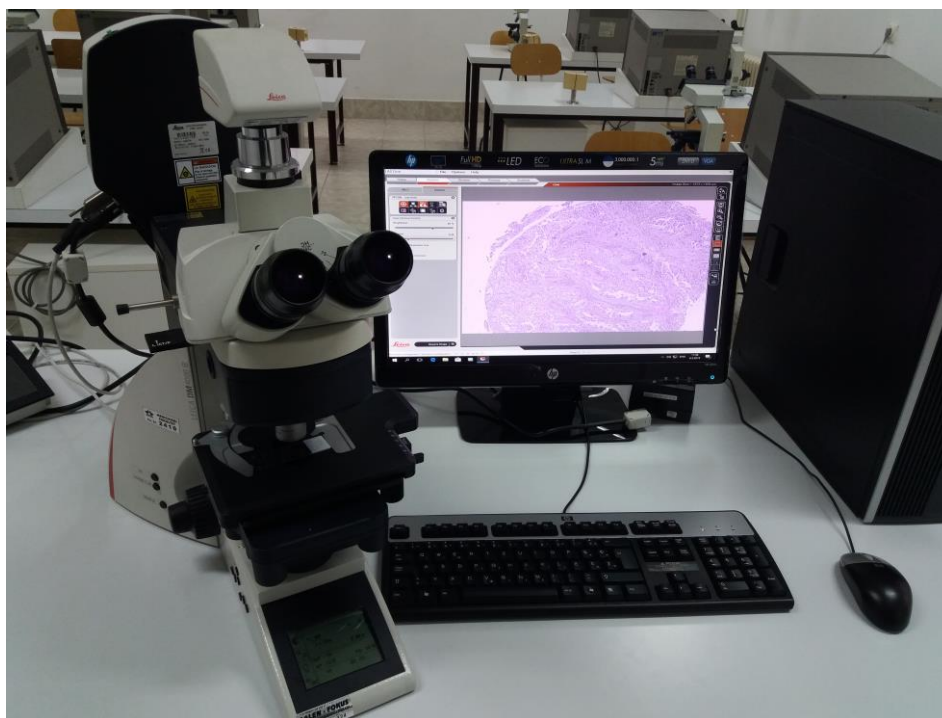
IHC bojenje Ventana anti-HER2/neu (4B5) monoklonalnim zečjim antitelom, vršeno je na svim uzorcima, automatski u BenchMark®XT aparatu prema upustvima proizvođača (I-VIEV put HER2 / neu kit, Ventana Medical Systems). Automatsko bojenje HER2 je obavljeno u BenchMark®XT aparatu sa ultraViev Universal DAB Detection kitom i Bluing reagensom kao reagensom za vizuelizaciju (Slika 26).



Slika 26. BenchMark®XT aparat.

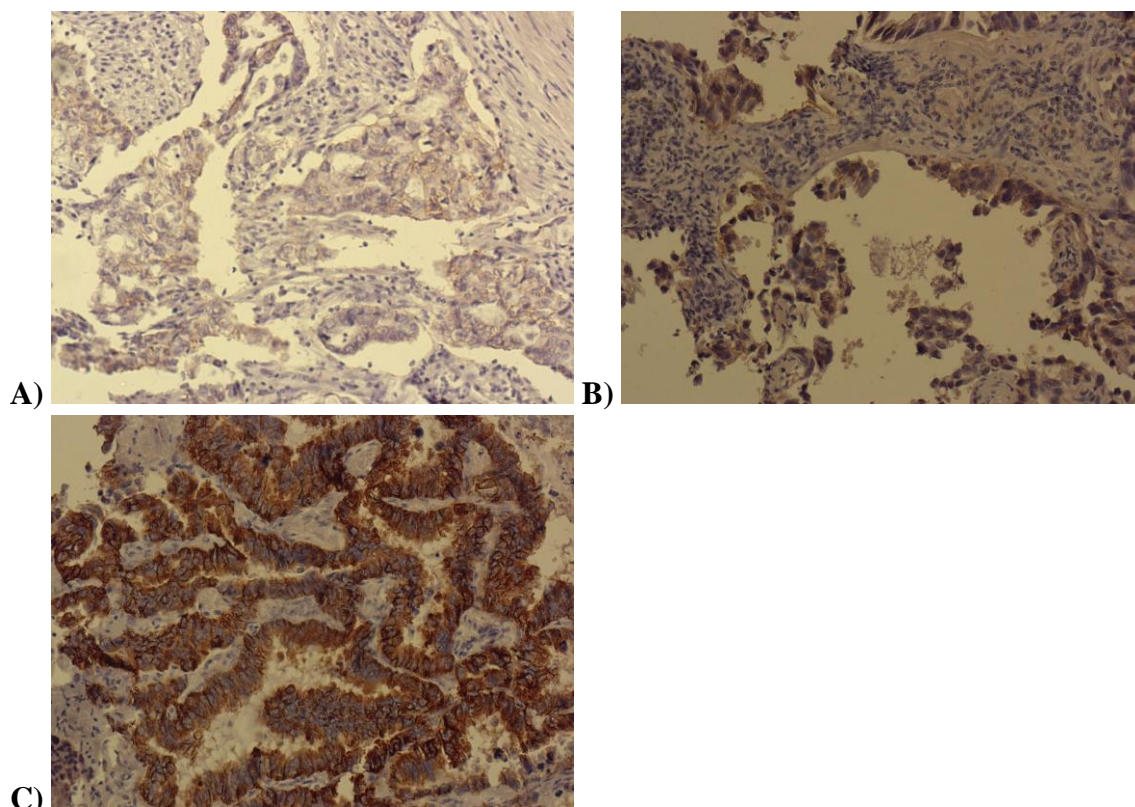
#### 4.4.3. Analiza i interpretacija imunohistohemijski obrađenih uzoraka

Imunohistohemijska analiza je vršena svetlosno-mikroskopski na mikroskopu marke *Leica* DM4000 B (Slika 27), kvalitativnom i semikvantitativnom analizom. Imunohistohemijska bojenja vršena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja primenom spoljašnje i unutrašnje kontrole. Kao pozitivni kontrolni uzorci korišćeni su poznati uzorci karcinoma dojke kod kojih je dokazana prekomerna proteinska ekspresija HER2 receptora ocenjena sa 3+.

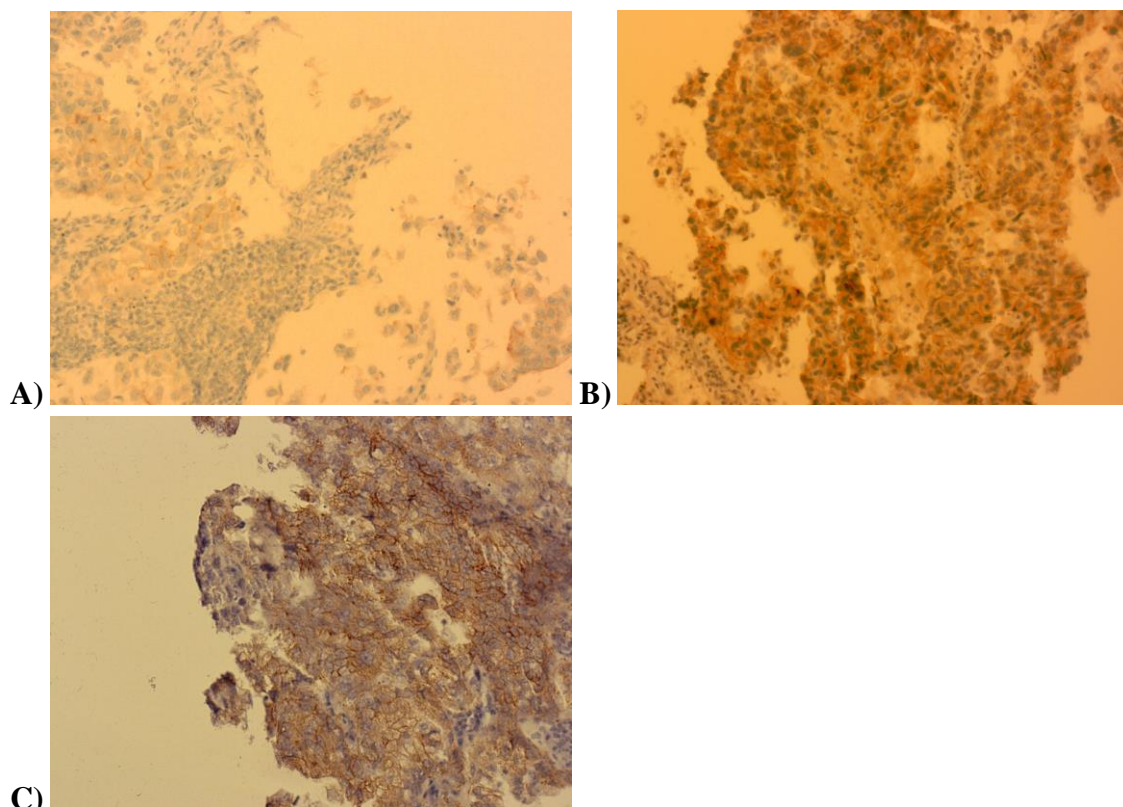
Slika 27. Mikroskop *Leica* DM4000 B povezan sa računarnom i kamerom *Leica*.

Za interpretaciju imunohistohemijske proteinske ekspresije HER2 receptora u adenokarcinomu pluća korišćen je modifikovan obrazac (*Hirsch i sarad, 2002.*) Hercep Testa za određivanje proteinske ekspresije HER2 receptora kod karcinoma dojke (195) (Slika 28 A,B,C; Slika 29 A,B,C):

- Tumori sa potpunim odsustvom bojenja- **0**
- Tumori sa slabim, nepotpunim membranskim bojenjem - **1+**
- Tumori sa jakim, nepotpunim bazolateralnim bojenjem ili slabim, kompletnim membranskim bojenjem u više od 10% tumorskih ćelija - **2+**
- Tumori sa jakim, kompletnim membranskim bojenjem u više od 10% tumorskih ćelija - **3+**



Slika 28. Imunohistohemijsko bojenje HER2 antitelom (HercepTest, Dako): A) negativno 1+; B) pozitivno 2+; C) pozitivno 3+.



Slika 29. Imunohistohemijsko bojenje HER2 antitelom (Ventana anti-HER2/neu (4B5)): A) negativno 1+; B) pozitivno 2+; C) pozitivno 3+.

Svi uzorci tumorskog tkiva ocenjeni su dva puta (jednom i drugom metodom bojenja) a rezultati ekspresije HER2 receptora dobijeni korišćenjem jednog i drugog antitela ubačeni u unapred pripremljenu tabelu u programu *Microsoft Exel 2010*, međusobno upoređivani, a zatim statistički obrađeni.

Uzorci tumorskog tkiva koji su ocenjeni sa 2+ i 3+ označeni su kao pozitivni, dok su uzorci tumorskog tkiva ocenjeni sa 0 i 1+ označeni kao negativni.

#### 4.5. IN SITU HIBRIDIZACIJA

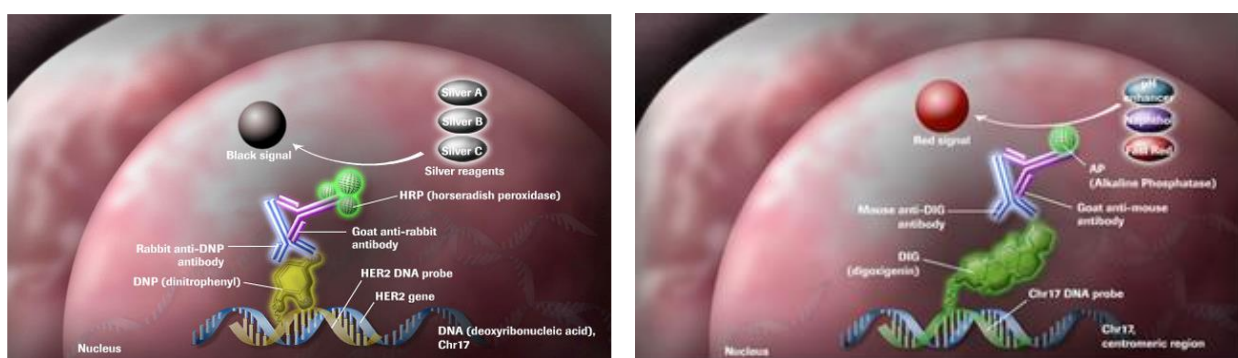
In situ hibridizacija (ISH) na uzorcima tumorskog tkiva rađena je u imunohistohemijskoj laboratoriji Centra za patologiju KCCG.

S obzirom na naknadno obezbeđena sredstva, u toku rada na istraživanju, uzorci tumorskog tkiva svih 148 pacijenata su retestirani tehnikom in situ hibridizacije, a rezultati su obrađeni i prikazani u doktorskoj disertaciji.

Svi slučajevi su retestirani, a ne samo uzorci koji su ocenjeni sa 2+ i 3+ bilo jednom i/ili drugom metodologijom imunohistohemijske analize kako je navedeno u prijavi.

Prisustvo amplifikacije je određivano automatski pomoću “Dual IHC HER2 kit;Ventana Medical Systems” u skladu sa uputstvima proizvođača. Ispoštovan je protokol za DISH u BenchMark®XT aparatu: tretman sa ćelijskim kondicionerom CC2, dva puta po 32 minuta, digestija sa ISH proteazom III u trajanju od 12 min, hibridizacija 6 h, ispiranje na 72°C, bojenje srebrom sa ultraViev SISH DNP Detection kit u trajanju od 8 minuta, crveno bojenje sa UltraViev Red ISH DIG Detection kitom u trajanju od 8 minuta, hematoksilin bojenje u trajanju od 8 minuta i bledo bojenje sa Bluing reagensom 4 minuta (Slika 30).

Status HER2 gena je određivan na osnovu brojanja njegovih kopija (crni signali), i detekcijom centromere 17. hromozoma (crveni signali). HER2 gen i centromere hromozoma 17 su detektovani pomoću dve hromogene boje u formalin fiksiranim i parafinski provedenim isečcima tkiva, nakon bojenja na Ventana BenchMark automatizovanom stejneru pomoću svetlosnog mikroskopa.



Slika 30. Protokol za HER2 Dual ISH.

(Preuzeto:[http://www.ventana.com/documents/E4798A\\_Loftin\\_ASCO\\_Breast\\_2011\\_HER2\\_Dual\\_ISH\\_Poster\\_lowres.pdf](http://www.ventana.com/documents/E4798A_Loftin_ASCO_Breast_2011_HER2_Dual_ISH_Poster_lowres.pdf))

#### 4.5.1. Analiza i interpretacija amplifikacije HER2 gena Silver in situ hibridizacijom

Amplifikacija HER2 gena metodom *dual* in situ hibridizacijom (ISH) određivana je prema preporukama ASCO CAP iz 2013. godine za karcinom dojke (248).

Za analizu i tumačenje dual ISH izbrojano je najmanje 20 tumorskih ćelija. Pre odluke kojih će se 20 ćelija brojati pregledan je ceo preparat kako bi se našlo područje u kojem bi se mogla naći amplifikacija. Ako postoje dve populacije ćelija sa i bez amplificiranih signala, ove dve populacije su brojane odvojeno i izračunat je odnos i prosek HER2 kopija odvojeno. Ukoliko su u bilo kojoj od ovih populacija zadovoljeni kriterijumi amplifikacije test se smatrao pozitivnim.

Negativan HER2 status (odsutna genska amplifikacija) (Slika 31):

- Broj kopija HER2  $< 4$
- HER2/CEP 17odnos  $< 2$  sa srednjim brojem signala  $< 4$

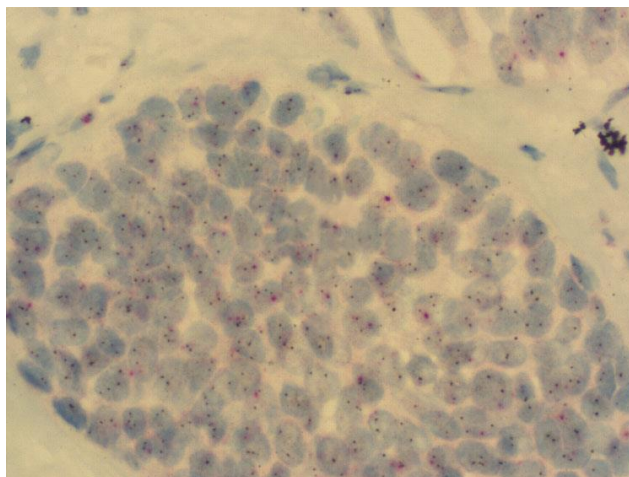
Dvojbena HER2 (proveriti testiranje na drugom uzorku istom ili drugom metodom):

- Broj HER2 kopija  $\geq 4$  i  $< 6$
- HER2/CEP 17odnos  $< 2$  sa srednjim brojem signala u  $\geq 4$  i  $< 6$

Pozitivan HER2 status (prisutna genska amplifikacija) (Slika 32):

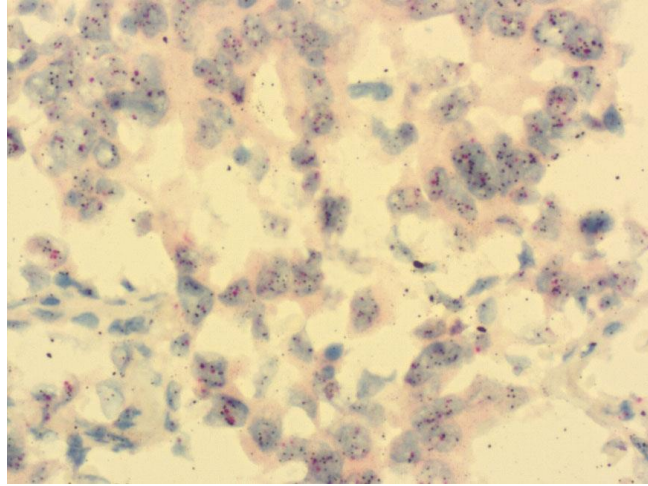
- Broj kopija HER2  $\geq 6$
- HER2/CEP 17odnos  $\geq 2$  ukoliko je srednji broj kopija HER2  $<, =,$  ili  $> 4$
- HER2/CEP 17odnos  $< 2$  ukoliko je srednji broj kopija HER2  $\geq 6$

Tumori koji imaju srednji broj kopija HER2  $\geq 10$  ili HER2/CEP 17odnos  $\geq 5$  smatraju se da imaju **high level** amplifikaciju (Slika 33).

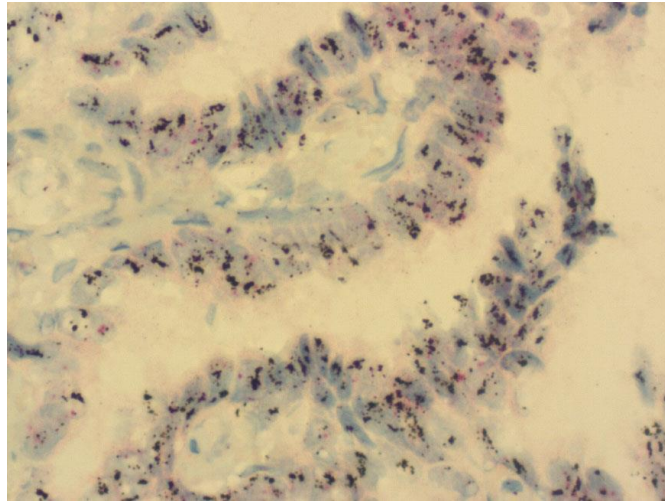


Slika 31. Odsutna amplifikacija, HER2 Dual ISH, 600x.





Slika 32. Prisutna amplifikacija, HER2 Dual ISH, 600x.



Slika 33. Prisutna *high level* amplifikacija, HER2 Dual ISH, 600x.

#### 4.6. STATISTIČKA OBRADA I ANALIZA PODATAKA

Statistička obrada podataka je izvršena uz pomoć statističkog programa SPSS 20.0.

Dobijeni rezultati su opisani uz pomoć standardnih statističkih varijabli (srednja vrednost ( $\bar{x}$ ), standardna devijacija (SD) kao i inetrvalne vrednosti (max i min)).

Statistička značajnost je ispitana pomoću testova za neparametarske podatke  $\chi^2$  test i Fisher test koji služe za opis povezanosti između dve varijable.

Rezultati su predstavljeni putem grafikona i tabela.

Za sve statističke analize nivo poverenja je iznosio 0,05. Vrednost  $p < 0,05$  ukazuje na to da je razlika između posmatranih raspodela statistički značajna, tj. u slučaju  $p > 0,05$  nema statistički značajne razlike među raspodelama. Vrednost  $p < 0,001$  ukazuje na statistički veoma značajnu razliku.

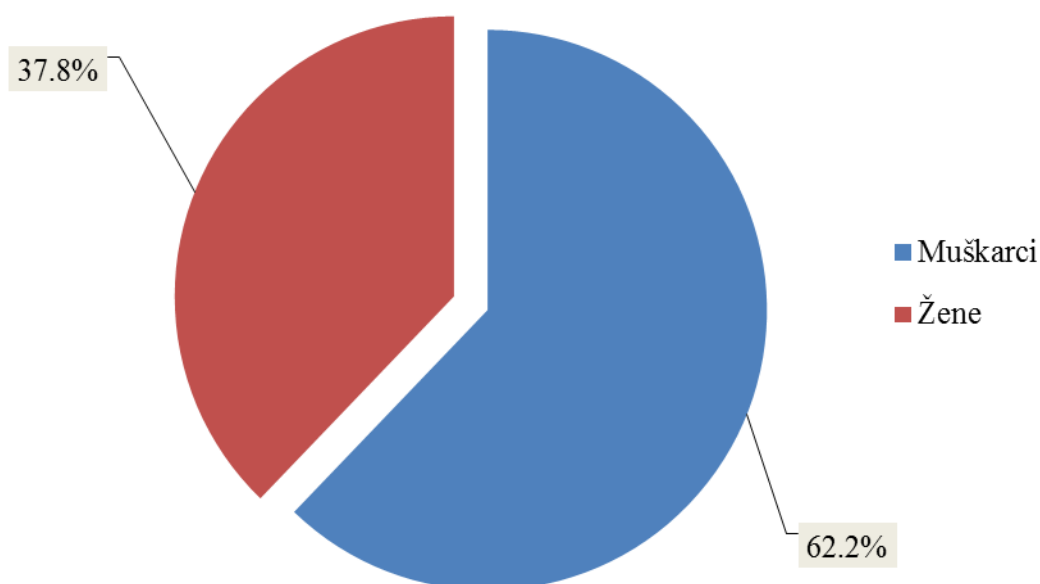
## 5. REZULTATI

### 5.1. Osnovne karakteristike ispitanika i karakteristike primarnog tumora

U istraživanju je uključeno 148 pacijenata koji su na IPBV prvi put operisani od invazivnog adenokarcinoma pluća i koji nisu primali preoperativnu radioterapiju i/ili hemioterapiju.

#### 5.1.1. Pol i starost pacijenata

Distribucija pacijenata operisanih zbog adenokarcinoma pluća prema polu prikazana je u Grafikonu 3.



**Grafikon 3. Procentualna zastupljenost pacijenata prema polu**

Od ukupno 148 pacijenata, većina su bili muškarci (92).

Distribucija pacijenata po polu i starosti prikazana je u Tabeli 7.

**Tabela 7. Distribucija ispitanika po polu i starosti**

Pol	Starosne grupe				
	31 - 40 godina	41 - 50 godina	51 - 60 godina	61 - 70 godina	71 - 80 godina
Muškarci	1 (0,7%)	4 (2,7%)	34 (23%)	46 (31,1%)	7 (4,7%)
Žene	0 (0%)	9 (6,1%)	23 (15,5%)	18 (12,2%)	6 (4,1%)
Ukupno	1 (0,7%)	13 (8,8%)	57 (38,5%)	64 (43,2%)	13 (8,8%)

Prosečna starost celokupnog uzorka je bila  $60,8 \pm 7,87$  godina, a raspon se kretao od 32 do 79 godina. Starosne dobi bolesnika smo podelili u 5 starosnih grupa sa intervalom od 10 godina. Najveći broj ispitanika je bio zastupljen u starosnim grupama 51-60 godina (57) i 61-70 godina (64). Poređenje polova po starosnim grupama je pokazalo da su muškarci u svim starosnim grupama predstavljali najveći procenat obolelih od adenokarcinoma pluća osim u starosnoj grupi 41-50 godina, gde je procenat muškaraca (2,7%) bio manji od procenta žena (6,1%). U okviru starosnih grupa 51-60 godina i 61-70 godina, 54,1% adenokarcinoma je bilo kod muškaraca, dok je kod žena ovaj procenat iznosio 27,7% .

### 5.1.2. Pušačke navike

Podaci o pušačkim navikama su dobijeni iz istorija bolesti i bili su poznati za sve ispitanike.

Od svih pacijenata u uzorku 5,4% su bili nepušači, 18,9% su bili bivši pušači, dok su 75,7% bili aktivni pušači. Odnos muškaraca i žena prema pušačkim navikama je prikazan u Tabeli 8.

**Tabela 8. Distribucija pacijenata prema pušačkim navikama i polu**

Pol	Pušačke navike		
	Pušači	Nepušači	Bivši pušači
Muškarci	69 (46,6%)	4 (2,7%)	19 (12,8%)
Žene	43 (29,1%)	4 (2,7%)	9 (6,1%)
Ukupno	112 (75,7%)	8 (5,4%)	28 (18,9%)

Aktivni pušači su bili najbrojniji kod pacijenata oba pola (procentualno češće su aktivni pušači bili muškarci). Procenat nepušača je bio podjednako zastupljen kod oba pola. Što se tiče bivših pušača veći procenat je bio kod muškaraca (12,8%) u odnosu na žene (6,1%).

Uz pomoć Fisher-ovog testa, dobijena p vrednost ( $p=0,636$ ) je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u pušačkom statusu u odnosu na pol pacijenata.

### 5.1.3. Veličina tumora

Deskriptivna statistika veličine tumora u ukupnom uzorku je prikazana u Tabeli 9.

**Tabela 9. Deskriptivna statistika veličine tumora u ukupnom uzorku**

	mm
Srednja vrednost (x)	48,2
Medijana (Md)	45
Standardna devijacija (SD)	26,4
Minimum	9
Maksimum	150

Prosečna veličina tumora je iznosila  $48,2 \pm 26,4$  mm, od kojih je najmanji bio 9 mm, dok je naveći bio 150 mm.

Tumori su bili podeljeni u 4 klase prema njihovoj veličini: I (0-20 mm), II (21-30 mm), III (31-50 mm) i IV (preko 50 mm). Distribucija veličine tumora prema polu prikazana je u Tabeli 10.

**Tabela 10. Distribucija veličine tumora prema polu**

	Klase			
	I (0-20 mm)	II (21-30 mm)	III (31-50mm)	IV (preko 50 mm)
Muškarci	7 (4,7%)	13 (8,8%)	39 (26,4%)	33 (22,3)
Žene	8 (5,4%)	11 (7,4%)	20 (13,5%)	17 (11,5%)
Ukupno	15 (10,1%)	24 (16,2%)	59 (39,9%)	50 (33,8%)

U odnosu na sve pacijente, najzastupljenija veličina tumora je bila iz III klase, dok je najmanje bila zastupljena iz I klase. Kod muškaraca i žena pojedinačno je takođe bila najzastupljenija III klasa.

Vrednosti dobijene pomoću  $\chi^2$  testa, ( $p=0,410$ ), su pokazale da nema statistički značajne razlike u veličini tumora među polovima, posmatrano po definisanim klasama veličine tumora.

#### 5.1.4. Infiltracija pleure i okolnih struktura (u odnosu na veličinu tumora)

Distribucija infiltracije pleure prema veličini tumora prikazana je u Tabeli 11.

**Tabela 11. Distribucija infiltracije pleure prema veličini tumora**

	Klase				Ukupno
	I (0-20 mm)	II (21-30 mm)	III (31-50 mm)	IV (preko 50 mm)	
Infiltracija postoji	2 (1,4%)	2 (1,4%)	11 (7,4%)	21 (14,2%)	36 (24,3%)
Infiltracija ne postoji	13 (8,8%)	22 (14,9%)	48 (32,4%)	29 (19,6%)	112 (75,7%)

Ispitivanjem infiltracije pleure kod svih bolesnika, kod 24,3% pacijenata je bila potvrđena infiltracija, dok kod 75,7% pacijenata infiltracija nije postojala. Najčešće je infiltracija pleure nađena u klasi IV (preko 50 mm).

Distribucija infiltracije okolnih struktura prema veličini tumora prikazana je u Tabeli 12.

**Tabela 12. Distribucija infiltracije okolnih struktura prema veličini tumora**

	Klase				Ukupno
	I (0-20 mm)	II (21-30 mm)	III (31-50mm)	IV (preko 50 mm)	
Infiltracija postoji	0 (0%)	0 (0%)	2 (1,4%)	6 (4,1%)	8 (5,4%)
Infiltracija ne postoji	15 (10,1%)	24 (16,2%)	57 (38,5%)	44 (29,7%)	140 (94,6%)

Zastupljenost infiltracije okolnih struktura je samo u 5,4% bila prisutna, dok kod 94,6% pacijenata infiltracija nije postojala. Najveća zastupljenost infiltracije okolnih struktura je bila kod klase IV (preko 50 mm).

### 5.1.5. Patološki T deskriptor tumora, status limfnih čvorova (N) i prisustvo metastaza (M)

Kod svih pacijenata je bio određen stadijum prema TNM klasifikaciji (sedmo izdanje) i njihova distribucija je prikazana u Tabelama 13, 14 i 15.

**Tabela 13. Distribucija T deskriptora tumora kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma**

T deskriptor	Broj (%)
<b>T1a</b>	14 (9,5%)
<b>T1b</b>	22 (14,9%)
<b>T2a</b>	46 (31%)
<b>T2b</b>	24 (16,2%)
<b>T3</b>	37 (25%)
<b>T4</b>	5 (3,4%)

Najzastupljeniji deskriptori su bili T2a (31%) i T3 (25%).

**Tabela 14. Distribucija N deskriptora tumora kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma**

N deskriptor	Broj (%)
<b>N0</b>	96 (64,9%)
<b>N1</b>	31 (20,9%)
<b>N2</b>	19 (12,8)
<b>N3</b>	2 (1,4%)

Kod najvećeg broja pacijenata (64,9%) nisu postojale metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. U grupi pacijenata koji su imali metastaze u regionalnim limfnim čvorovima najviše pacijenata (20,9%) je bilo u N1 deskriptoru, dok je najmanji broj 1,4% bio u N3 deskriptoru tumora.

**Tabela 15. Distribucija M deskriptora tumora kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma**

M deskriptor	Broj (%)
<b>M0</b>	124 (83,8%)
<b>M1a</b>	3 (2%)
<b>M1b</b>	21 (14,2%)

Većina pacijenata ispitivane serije, tj. 124 pacijenta, su bili bez udaljenih metastaza. Samo 2% pacijenata je imalo M1a deskriptor tumora, dok 14,2% je imalo M1b deskriptor tumora.

### 5.1.6. Stadijum bolesti

Svim pacijentima iz našeg uzorka smo nakon patohistološke analize odredili patološki stadijum bolesti. Distribucija stadijuma bolesti prema polu prikazana je u Tabeli 16.

**Tabela 16. Distribucija pacijenata prema patološkom stadijumu bolesti i polu**

	Stadijumi bolesti						
	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
Ukupno	22 (14,9%)	28 (18,9%)	24 (16,2%)	26 (17,6%)	22 (14,9%)	2 (1,4%)	24 (16,2%)
Muškarci	7 (4,7%)	22 (14,9%)	15 (10,1%)	19 (12,8%)	9 (6,10%)	2 (1,4%)	18 (12,2%)
Žene	15 (10,1%)	6 (4,1%)	9 (6,1%)	7 (4,7%)	13 (8,8%)	0 (0%)	6 (4,1%)

Najzastupljeniji stadijum u ukupnom uzorku je bio IB (18,9%); kod muškaraca takođe IB (14,9%), dok je kod žena bio IA (10,1%). Najmanje pacijenata u ukupnom uzorku je bilo u IIIB stadijumu (1,4%) gde su svi pacijenti bili muškarci.

Poređenjem stadijuma bolesti prema polu, primenom  $\chi^2$  neparametarskog testa ( $p=0,003$ ) dobijena je statistički značajna razlika u distribuciji stadijuma bolesti u odnosu na pol.



Distribucija pacijenata prema stadijumu bolesti i starosnim grupama prikazana je u Tabeli 17.

**Tabela 17. Distribucija pacijenata prema patološkom stadijumu i starosnim grupama**

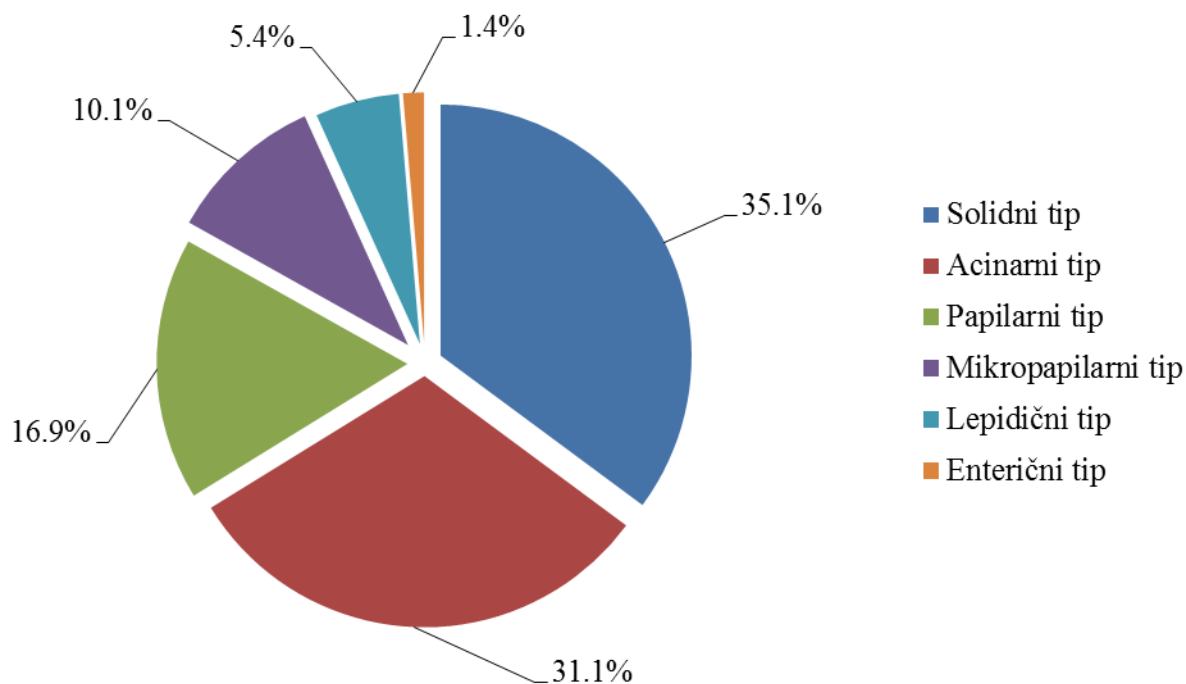
		Stadijumi bolesti						
		Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb	IV
Starosne grupe	31 - 40 godina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,7%)
	41 - 50 godina	3 (2%)	0 (0%)	4 (2,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)	4 (2,7%)
	51 - 60 godina	5 (3,4%)	9 (6,1%)	12 (8,1%)	11 (7,4%)	10 (6,8%)	0 (0%)	10 (6,8%)
	61 - 70 godina	13 (8,8%)	15 (10,1%)	5 (3,4%)	12 (8,1%)	9 (6,1%)	1 (0,7%)	9 (6,1%)
	Više od 70 godina	1 (0,7%)	4 (2,7%)	3 (2%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	0 (2,7%)

Primenom Fisher-ovog testa ( $p=0,119$ ) nije dobijena statistički značajna razlika u distribuciji stadijuma bolesti prema starosnim grupama.

### 5.1.7. Predominantni histološki tip

Uzorci tumorskog tkiva svih 148 pacijenata su klasifikovani primenom IASLC/ATC/ERS kriterijuma. Semikvantitavno je određena svaka komponenta invazivnog karcinoma koja je bila zastupljena u  $\geq 5\%$  tumorskog tkiva, a zatim je definisan predomnanti tip koji je u najvećem procentu bio zastupljen u tumoru.

Distribucija pacijenata prema predominantnom histološkom tipu prikazana je Grafikonom 4.



**Grafikon 4. Procentualna zastupljenost adenokarcinoma prema predominantnom tipu**

U našem uzorku, najčešći predominantni histološki tip adenokarcinoma je bio solidni tip (52), zatim acinarni tip (46) i papilarni tip (25).

#### **5.1.7.1. Povezanost predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama pacijenata**

Distribucija predominantnog tipa u zavisnosti od kliničkih karakteristika prisutnih kod pacijenata prikazana je u Tabeli 18.

**Tabela 18. Distribucija predominantnog tipa prema polu, starosnim grupama i pušačkom statusu**

	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
<b>Pol</b>						
Muškarci	33 (22,3%)	30 (20,3%)	15 (10,1%)	8 (5,4%)	5 (3,4%)	1 (0,7%)
Žene	19 (12,8%)	16 (10,8%)	10 (6,8%)	7 (4,7%)	3 (2,0%)	1 (0,7%)
<b>Starosne grupe</b>						
31 - 40 godina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,7%)	0 (0%)
41 - 50 godina	6 (4,1%)	3 (2,0%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)
51 - 60 godina	23 (15,5%)	23 (15,5%)	6 (4,1%)	4 (2,7%)	0 (0%)	1 (0,7%)
61 - 70 godina	21 (14,2%)	14 (9,5%)	14 (9,5%)	8 (5,4%)	6 (4,1%)	1 (0,7%)
Više od 70 godina	2 (1,4%)	6 (4,1%)	3 (2%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)
<b>Pušačke navike</b>						
Pušači	39 (26,4%)	39 (26,4%)	18 (12,2%)	12 (8,1%)	3 (2%)	1 (0,7%)
Nepušači	1 (0,7%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	3 (2%)	0 (0%)
Bivši pušači	12 (8,1%)	5 (3,4%)	6 (4,1%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)

Koristeći Fisher-ov neparametarski test, dokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova prema polu ( $p=0,965$ ).

Rezultati Two-way ANOVA testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u prosečnoj starosti muškaraca i žena u odnosu na predominantni tip adenokarcinoma ( $p=0,108$ ).

Analizom povezanosti predominantnog tipa sa starosnim grupama našli smo da su vrednosti predominantnog tipa tumora ujednačene ( $p=0,131$ ). Najčešća zastupljenost solidnog i acinarnog tipa (15,5% pojedinačno) je imala starosna grupa 51-60 godina. Najmanja prosečna starost (60 godina) je bila kod enteričnog tipa, dok je najveća prosečna starost (63,3 godina) bila kod lepidičnog tipa. U dva najzastupljenija tipa tumora (solidni i acinarni) prosečna starost je bila slična (60,1 i 60,3 godina).

Ispitujući odnos predominantnog tipa i pušačkih navika, uočeno je da su kod najvećeg broja pušača najčešće bili zastupljeni solidni i acinarni tipovi adenokarcinoma (69,6%). Isti predominantni tipovi (solidni i acinarni) su takođe bili najčešći kod bivših pušača (60,7%). Kod nepušača svi predominantni tipovi su bili prisutni u podjednakom broju .

Fisher-ovim neparametarskim testom potvrđena je statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova adenokarcinoma prema pušačkim navikama ( $p=0,041$ ).

#### **5.1.7.2. Povezanost predominantnog tipa sa karakteristikama primarnog tumora**

U studiji je bila analizirana povezanost predominantnog tipa sa karakteristikama primarnog tumora (prosečna veličina, veličina tumora podeljena po klasama, infiltracija pleure i okolnih struktura, patološki T, N i M deskriptor tumora i stadijum bolesti).

Odnos predominantnog tipa, prosečne veličine tumora, veličine tumora po klasama, infiltracije pleure i infiltracije okolnih struktura prikazana je u Tabeli 19.

**Tabela 19. Odnos predominantnog tipa, veličine primarnog tumora i infiltracije pleure i okolnih struktura**

	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
Prosečna veličina (mm)	49,9	47,8	39,6	55,8	52,4	48,5
<b>Veličina tumora</b>						
I (0-20 mm)	2 (1,4%)	5 (3,4%)	5 (3,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	0 (0%)
II (21-30 mm)	8 (5,4%)	5 (3,4%)	4 (2,7%)	3 (2%)	3 (2%)	1 (0,7%)
III (31-50 mm)	22 (14,9%)	22 (14,9%)	9 (6,1%)	5 (3,4%)	1 (0,7%)	0 (0%)
IV (> 50 mm)	20 (13,5%)	14 (9,5%)	7 (4,7%)	5 (3,4%)	3 (2%)	1 (0,7%)
Infiltracija pleure	10 (6,8%)	9 (6,1%)	7 (4,7%)	9 (6,1%)	0 (0%)	1 (0,7%)
Nema infiltracije pleure	42 (28,4%)	37 (25%)	18 (12,2%)	6 (4,1%)	8 (5,4%)	1 (0,7%)
Infiltracija okolnih struktura	3 (2%)	3 (2%)	0 (0%)	2 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)
Nema infiltracije okolnih struktura	49 (33,1%)	43 (29,1%)	25 (16,9%)	13 (8,8%)	8 (5,4%)	2 (1,4%)

Deskriptivnom analizom je utvrđena najmanja prosečna veličina tumora kod papilarnog predominantnog tipa (39,6 mm; u rasponu od 15 mm do 80 mm). Nešto veće prosečne veličine tumora su bile evidentirane kod solidnog (49,9 mm; u rasponu od 12 mm do 150 mm), acinarnog (47,8 mm; u rasponu od 9 mm do 140 mm) i enteričnog (48,5 mm; u rasponu od 25 mm do 72 mm) tipa, dok su najveće vrednosti bile kod lepidičnog (52,4 mm; u rasponu od 15 mm do 120 mm) i mikropapilarnog (55,8 mm; u rasponu od 12 mm do 140 mm) tipa.

U odnosu na veličinu adenokarcinomi su bili podeljeni na četiri klase. Najzastupljeniji predominantni tipovi su bili solidni i acinarni tip u III klasi (31-50 mm) sa udelom od 74,6%. U IV klasi (<50 mm), najzastupljeniji predominantni tipovi su takođe bili solidni i acinarni tip (68%).

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa nije dobijena statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova u odnosu na veličinu tumora podeljenih na klase ( $p=0,406$ ).

Uz pomoć Fisher-ovog neparametarskog testa dokazana je statistički značajna razlika kada je u pitanju povezanost predominantnog tipa tumora i infiltracija pleure ( $p=0,011$ ). Najveći procenat slučajeva je bio bez infiltracije pleure.

Infiltracija okolnih struktura nije statistički značajno povezana sa predominantnim tipom tumora (Fisher-ov neparametarski test,  $p=0,503$ ).

Distribucija predominantnog tipa po T, N i M deskriptoru tumora prikazana je u Tabeli 20.

**Tabela 20. Odnos predominantnog tipa tumora i T, N i M deskriptora**

	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
<b>T deskriptor</b>						
T1a	3 (2%)	3 (2%)	5 (3,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	0 (0%)
T1b	7 (4,7%)	5 (3,4%)	3 (2%)	3 (2%)	3 (2%)	1 (0,7%)
T2a	17 (11,5%)	18 (12,2%)	7 (4,7%)	3 (2%)	1 (0,7%)	0 (0%)
T2b	10 (6,8%)	7 (4,7%)	5 (3,4%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)
T3	13 (8,8%)	12 (8,1%)	4 (2,7%)	5 (3,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)
T4	2 (1,4%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>N deskriptor</b>						
N0	31 (20,9%)	29 (19,6%)	20 (13,5%)	7 (4,7%)	8 (5,4%)	1 (0,7%)
N1	10 (6,8%)	13 (8,8%)	4 (2,7%)	3 (2%)	0 (0%)	1 (0,7%)
N2	10 (6,8%)	3 (2%)	1 (0,7%)	5 (3,4%)	0 (0%)	0 (0%)
N3	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

M deskriptor						
M0	39 (26,4%)	40 (27,0%)	23 (15,5%)	14 (9,5%)	7 (4,7%)	1 (0,7%)
M1a	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)
M1b	13 (8,8%)	6 (4,1%)	1 (0,7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,7%)

U rezultatima ispitivanja T deskriptora najfrekventniji predominantni tipovi su bili solidni i acinarni tip i to u okviru T2a deskriptora (74,4%).

Vrednost  $p=0,926$  dobijena pomoću Fisher-ovog neparametarskog testa je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika predominantnih tipova u odnosu na T deskriptor.

Najveći broj pacijenata nije imao metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. Najveći procenat sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima je imao solidno predominantni tip tumora i to 6,8% u N1 i N2 deskriptoru. U okviru N1 deskriptora najzastupljeniji predominantni tip je bio acinarni (8,8%), dok se u N2 deskriptoru najčešće radilo o solidnom podtipu (6,8%).

Fisher-ov neparametarski test nije pokazao statistički značajnu razliku kada je u pitanju raspodela predominantnih tipova tumora po N deskriptoru ( $p=0,128$ ).

Prisustvo udaljenih metastaza je bilo najfrekventnije kod solidno predominantnog tipa (8,8%).

Utvrđena je statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova u odnosu na prisustvo udaljenih metastaza ( $p$  vrednost Fisher-ovog neparametarskog testa iznosi 0,009), sa naglaskom da kod većine predominantnih tipova tumora nisu postojale udaljene metastaze.

Odnos predominantnog tipa i patološkog stadijuma bolesti prikazan je u Tabeli 21.

**Tabela 21. Odnos predominantnog tipa tumora i patološkog stadijuma bolesti**

Stadijum bolesti	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
IA	5 (3,4%)	5 (3,4%)	5 (3,4%)	3 (2%)	4 (2,7%)	0 (0%)
IB	10 (6,8%)	10 (6,8%)	6 (4,1%)	2 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)
IIA	7 (4,7%)	9 (6,1%)	6 (4,1%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)
IIB	7 (4,7%)	11 (7,4%)	4 (2,7%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	0 (0%)
IIIA	10 (6,8%)	4 (2,7%)	2 (1,4%)	5 (3,4%)	0 (0%)	1 (0,7%)
IIIB	0 (0%)	1 (0,7%)	0 (0%)	1 (0,7%)	0 (0%)	0 (0%)
IV	13 (8,8%)	6 (4,1%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)

Pacijenti sa solidnim predominantnim tipom u IV stadijumu su predstavljali najbrojniju grupu pacijenata (8,8%). Ukupno 10 pacijenata (6,8%) je imalo solidno predominantni tip tumora u okviru IB i IIIA stadijuma. Acinarni predominantni tip tumora je bio najčešći u IB, IIA i IIB stadijumu.

Vrednost  $p=0,204$  dobijena pomoću Fisher-ovog testa ukazala je da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova tumora po patološkom stadijumu bolesti.

### 5.1.8. Prognostičke grupe

S obzirom na prognostički značaj, svi adenokarcinomi su bili klasifikovani u tri prognostičke grupe. Grupa sa dobrom prognozom u kojoj je lepidično predominantni tip koji je u našem istraživanju bio zastupljen u 8/148 slučajeva (5,4%). Grupa sa umerenom prognozom u kojoj su acinarni, papilarno predominantni tip i enterični je imala 73/148 pacijenata (49,3%). Grupa sa lošom prognozom u kojoj je mikropapilarno i solidno predominantni je imala 77/148 pacijenata (52%).

### 5.2. Imunohistohemijska evaluacija proteinske ekspresije HER2 receptora

Rezultati proteinske ekspresije HER2 receptora kod adenokarcinoma pluća dobijeni korišćenjem HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) prikazani su u Tabeli 22.



**Tabela 22. Proteinska ekspresija HER2 receptora u zavisnosti od proizvođača antitela**

	Test	
	HercepTest Dako	Ventana anti-HER2/neu (4B5)
Pozitivna ekspresija	11 (7,4%)	4 (2,7%)
Negativna ekspresija	137 (92,6%)	144 (97,3%)

Uvidom u frekvencije pozitivne i negativne proteinske ekspresije HER2 receptora, utvrdili smo da je pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća bila 7,4% za HercepTest Dako, dok je za Ventana anti-HER2/neu (4B5) bila 2,7%.

### 5.2.1. HercepTest Dako

Rezultati odnosa između proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako i pola prikazani su u Tabeli 23.

**Tabela 23. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i pola**

	Muškarci	Žene
Pozitivna ekspresija	8 (5,4%)	3 (2%)
Negativna ekspresija	84 (56,8%)	53 (35,8%)

Rezultati odnosa između proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako i pušačkih navika prikazani su u Tabeli 24.

**Tabela 24. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i pušačkih navika**

	Pušači	Nepušači	Bivši pušači
Pozitivna ekspresija	8 (5,4%)	0 (0%)	3 (2%)
Negativna ekspresija	104 (70,3%)	8 (5,4%)	25 (16,9%)

Od ukupnog broja pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako, većinu (8 pacijenata) su predstavljali pušači, manji deo (3 pacijenta) su bili bivši pušači. U grupi nepušača nije bilo pozitivne ekspresije HER2 receptora.

Fisher-ovim neparametarskim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodeli pozitivne i negativne proteinske ekspresije u odnosu na pušačke navike ( $p=0,713$ ).

Distribucija proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako po starosnim grupama prikazana je u Tabeli 25.

**Tabela 25. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i starosnih grupa**

	Starosne grupe																	
	31	-	40	41	-	50	51	-	60	61	-	70	71	-	80			
	godina			godina			godina			godina			godina					
Pozitivna ekspresija	0			0			4			5			2					
	(0%)			(0%)			(2,7%)			(3,4%)			(1,4%)					
Negativna ekspresija	1			13			53			59			11					
	(0,7%)			(8,8%)			(35,8%)			(39,9%)			(7,4%)					

U odnosu na starosne grupe, pozitivna ekspresija HER2 receptora se najčešće javljala kod pacijenata 61-70 godina starosti (3,4% ukupnog uzorka).

Nije dokazana statistički značajna razlika u raspodeli pacijenata sa pozitivnom i negativnom ekspresijom HER2 receptora podeljenih po starosnim grupama ( $p$  vrednost Fisher-ovog testa je bila 0,562).

Ispitali smo odnos proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako prema karakteristikama primarnog tumora (veličina, infiltracija pleure i okolnih struktura, patološki T, N i M deskriptor, stadijum bolesti, predominantni histološki tip).

Distribucija proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako po klasama veličine tumora prikazana je u Tabeli 26.

**Tabela 26. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i veličine tumora**

	Klase			
	I (0-20 mm)	II (21-30 mm)	III (31-50mm)	IV (preko 50 mm)
Pozitivna ekspresija	0 (0%)	1 (0,7%)	6 (4,1%)	4 (2,7%)
Negativna ekspresija	15 (10,1%)	23 (15,5%)	53 (35,8%)	46 (31,1%)

Pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora za HercepTest Dako je bila najčešća kod klase III (31-50mm) tumora.

Nije dobijena statistički značajna razlika u distribuciji proteinske ekspresije po klasama veličine tumora (Fisher-ov neparametarski test,  $p=0,7$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako u odnosu na infiltraciju pleure i infiltraciju okolnih struktura prikazani su u Tabelama 27 i 28.

**Tabela 27. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i infiltracije pleure**

	Infiltracija pleure	Infiltracija pleure ne postoji
Pozitivna ekspresija	2 (1,4%)	9 (6,1%)
Negativna ekspresija	34 (23%)	103 (69,6%)

**Tabela 28. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i infiltracije okolnih struktura**

	Infiltracija okolnih struktura	Infiltracija okolnih struktura ne postoji
Pozitivna ekspresija	0 (0%)	11 (7,4%)
Negativna ekspresija	8 (5,4%)	129 (87,2%)

Infiltracija pleure je bila prisutna kod 2 od ukupno 11 pacijenta sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora, dok infiltracija okolnih struktura nije nađena kod pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora.

Odnos između ekspresije HER2 receptora i T deskriptora prikazan je u Tabeli 29.

**Tabela 29. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako u odnosu na T deskriptor tumora**

	T deskriptor					
	T1a	T1b	T2a	T2b	T3	T4
Pozitivna ekspresija	1 (0,7%)	1 (0,7%)	4 (2,7%)	2 (1,4%)	3 (2,0%)	1 (0,7%)
Negativna ekspresija	13 (8,8%)	21 (14,2%)	42 (28,4%)	22 (14,9%)	34 (23,0%)	13 (8,8%)

Najveći broj pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora je bio u T2a deskriptoru (2,7%).

Primenom Fisher-ovog testa dobijena je p vrednost od 0,993, što ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije HER2 receptora u odnosu na T deskriptor.

Odnos između ekspresije HER2 receptora i N deskriptora prikazan je u Tabeli 30.

**Tabela 30. Distribucija proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako u odnosu na N deskriptor**

	N deskriptor			
	N0	N1	N2	N3
Pozitivna ekspresija	9 (6,1%)	2 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	87 (58,8%)	29 (19,6%)	19 (12,8%)	2 (1,4%)

Pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora se najčešće javljala kod N0 deskriptora (kod 9 pacijenata), dok su u N1 deskriptoru bila 2 pacijenta.

Primenom Fisher-ovog testa dobijena je vrednost  $p=0,584$ , što ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije HER2 receptora u odnosu na N deskriptor.

Odnos između ekspresije HER2 receptora i M deskriptora prikazan je u Tabeli 31.

**Tabela 31. Distribucija proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako u odnosu na M deskriptor**

	M deskriptor		
	M0	M1a	M1b
Pozitivna ekspresija	11 (7,4%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	113 (76,4%)	3 (2%)	21 (14,2%)

Kada je analiziran M deskriptor, pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora je nađena samo u M0 deskriptoru (11 pacijenata).

Povezanost između ekspresije HER2 receptora i M deskriptora nije utvrđena (p vrednost Fisher-ovog testa iznosi 0,499).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i stadijuma bolesti prikazan je u Tabeli 32.

**Tabela 32. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i stadijuma bolesti**

	Patološki stadijum bolesti						
	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
Pozitivna ekspresija	2 (1,4%)	4 (2,7%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	2 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	20 (13,5%)	24 (16,2%)	22 (14,9%)	25 (16,9%)	20 (13,5%)	2 (1,4%)	24 (16,2%)

U IB stadijumu bolesti, u našem uzorku se nalazio najveći broj pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora dobijenog pomoću HercepTest Dako (2,7%). Raspodela pacijenata sa pozitivnom ekspresijom je bila ista kod IA, IIA i IIIA stadijuma.

Fisher-ov neparametarski test nije pokazao statistički značajnu povezanost između ekspresije HER2 receptora i stadijuma bolesti ( $p=0,543$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i predominantnog tipa tumora prikazan je u Tabeli 33.

**Tabela 33. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest i predominantnog tipa tumora**

	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
Pozitivna ekspresija	5 (3,4%)	4 (2,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	47 (31,8%)	42 (28,4%)	24 (16,2%)	14 (9,5%)	8 (5,4%)	2 (1,4%)

Prisustvo pozitivne proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću HercepTest Dako je bilo najčešće kod solidnih (3,4%) i acinarnih (2,7%) tipova tumora.

### 5.2.2. Ventana anti-HER2/neu (4B5)

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora analiziran Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitelom i pola prikazan je u Tabeli 34.

**Tabela 34. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i pola**

	Muškarci	Žene
Pozitivna ekspresija	3 (2%)	1(0,7%)
Negativna ekspresija	89 (60,1%)	55 (37,2%)

Ispitivanjem odnosa proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) i pola, pozitivna ekspresija se nalazila kod 3 pacijenta muškog pola i 1 pacijenta ženskog pola. U preostalih 144 pacijenata (97,3%) proteinska ekspresija je bila negativna.

Vrednost  $p$  ( $p=1$ ) dobijena pomoću Fisher-ovog neparametarskog testa je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli između polova kad je u pitanju proteinska ekspresija HER2 receptora.

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora prema pušačkim navikama pacijenata prikazan je u Tabeli 35.

**Tabela 35. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i pušačkih navika**

	Pušači	Nepušači	Bivši pušači
Pozitivna ekspresija	3 (2%)	0 (0%)	1 (0,7%)
Negativna ekspresija	109 (73,6%)	8 (5,4%)	27 (18,2%)

Od ukupnog broja pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora utvrđene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela, 3 pacijenta su bili pušači, dok je samo jedan pacijent bio bivši pušač. U grupi nepušača nije bilo slučajeva pozitivne ekspresije HER2 receptora.

Fisher-ovim neparametarskim testom nije utvrđena statistički značajna povezanost između pozitivne i negativne proteinske ekspresije i pušačkih navika ( $p=0,1$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora po starosnim grupama pacijenata prikazan je u Tabeli 36.

**Tabela 36. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i starosnih grupa**

	Starosne grupe				
	31 - 40 godina	41 - 50 godina	51 - 60 godina	61 - 70 godina	71 - 80 godina
Pozitivna ekspresija	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,7%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)
Negativna ekspresija	1 (0,7%)	13 (8,8%)	56 (37,8%)	62 (41,9%)	12 (8,1%)

U odnosu na starosne grupe, pozitivna ekspresija HER2 receptora je najčešće bila kod pacijenata 61-70 godina starosti (1,4%).

Nije dokazana statistički značajna razlika u raspodeli pacijenata sa pozitivnom i negativnom ekspresijom HER2 receptora po starosnim grupama (p vrednost Fisher-ovog testa je bila 0,611).

U studiji je analiziran odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) prema karakteristikama primarnog tumora (veličina, infiltracija pleure i okolnih struktura, patološki T, N i M deskriptor, stadijum bolesti i predominantni histološki tip).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i veličine tumora prikazan je u Tabeli 37.

**Tabela 37. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i veličine tumora**

	Klase			
	I (0-20 mm)	II (21-30 mm)	III (31-50mm)	IV (preko 50 mm)
Pozitivna ekspresija	0 (0%)	1 (0,7%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)
Negativna ekspresija	15 (10,1%)	23 (15,5%)	57 (38,5%)	49 (33,1%)

Pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) je bila najčešća u klasi III (2 pacijenta).

Nije dobijena statistički značajna razlika u raspodeli proteinske ekspresije po klasama veličine tumora (Fisher-ov neparametarski test, p=0,891).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i infiltracije pleure i infiltracije okolnih struktura prikazan je u Tabeli 38 i 39.

**Tabela 38. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i infiltracije pleure**

	Infiltracija pleure	Infiltracija pleure ne postoji
Pozitivna ekspresija	1 (0,7%)	3 (2%)
Negativna ekspresija	35 (23,6%)	109 (73,6%)



**Tabela 39. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i infiltracije okolnih struktura**

	Infiltracija okolnih struktura	Infiltracija okolnih struktura ne postoji
Pozitivna ekspresija	0 (0%)	4 (2,7%)
Negativna ekspresija	8 (5,4%)	136 (91,9%)

Kod jednog od ukupno 4 pacijenta sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora je bila nađena infiltracija pleure. U grupi pacijenata sa infiltracijom okolnih struktura nije nađena pozitivna ekspresija HER2 receptora.

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i T deskriptora tumora prikazan je u Tabeli 40.

**Tabela 40. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) u odnosu na T deskriptor tumora**

	T deskriptor					
	T1a	T1b	T2a	T2b	T3	T4
Pozitivna ekspresija	0 (0%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	14 (9,5%)	21 (14,2%)	45 (30,4%)	23 (15,5%)	36 (24,3%)	5 (3,4%)

Primenom Fisher-ovog testa nije dobijena statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije HER2 receptora u odnosu na T deskriptor ( $p=1$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i N deskriptora prikazan je u Tabeli 41.

**Tabela 41. Distribucija proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) u odnosu na N deskriptor tumora**

	N deskriptor			
	N0	N1	N2	N3
Pozitivna ekspresija	3 (2%)	0 (0%)	1 (0,7%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	93 (62,8%)	31 (20,9%)	18 (12,2%)	2 (1,4%)

Pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora je najčešće bila kod pacijenata u N0 deskriptoru (3 pacijenta).

Nije dobijena statistički značajna povezanost između ekspresije HER2 receptora i N deskriptora primenom Fisher-ovog testa ( $p=0,596$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i M deskriptora prikazan je u Tabeli 42.

**Tabela 42. Distribucija proteinske ekspresije HER2 receptora Ventana anti-HER2/neu (4B5) u odnosu na M deskriptor tumora**

	M deskriptor		
	M0	M1a	M1b
Pozitivna ekspresija	4 (2,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	120 (81,1%)	3 (2%)	21 (14,2%)

Kada su u pitanju udaljene metastaze, pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora je nađena samo u M0 deskriptoru (4 pacijenta).

Nije dobijena statistički značajna povezanost između ekspresije HER2 receptora i M deskriptora primenom Fisher-ovog testa ( $p=1$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora i stadijuma bolesti prikazan je u Tabeli 43.

**Tabela 43. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) u odnosu na patološki stadijum bolesti**

	Patološki stadijum bolesti						
	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
Pozitivna ekspresija	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	21 (14,2%)	27 (18,2%)	24 (16,2%)	25 (16,9%)	21 (14,2%)	2 (1,4%)	24 (16,2%)

Raspodela broja pacijenata je bila identična u IA, IB, IIB i IIIA stadijumu (po 1 pacijent).

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa nije dokazana statistički značajna povezanost između ekspresije HER2 receptora i patoloških stadijuma bolesti ( $p=0,861$ ).

Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora prema predominantnom histološkom tipu tumora prikazan je u Tabeli 44.

**Tabela 44. Odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) u odnosu na predominantni tip tumora**

	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
Pozitivna ekspresija	1 (0,7%)	3 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativna ekspresija	51 (34,5%)	43 (29,1%)	25 (16,9%)	15 (10,1%)	8 (5,4%)	2 (1,4%)

Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora koja je dobijena pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5), je nađena kod acinarnih (2%) i solidnih (0,7%) tipova tumora.

### 5.3. Analiza dobijenih rezultata proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene korišćenjem HER2 antitela „HercepTest Dako“ i „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“.

Odnos između proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene upotrebom HercepTest Dako i upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela prikazan je u Tabeli 45.

**Tabela 45. Podudarnost proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5)**

		HercepTest Dako	
		Pozitivna ekspresija	Negativna ekspresija
Ventana anti-HER2/neu	Pozitivna ekspresija	3 (2%)	1 (0,7%)
	Negativna ekspresija	8 (5,4%)	136 (91,9%)

Ispitivanjem podudarnosti između dobijenih rezultata povećane tj. pozitivne proteinske ekspresije HER2 receptora korišćenjem antitela HercepTest Dako i rezultata dobijenih korišćenjem antitela Ventana anti-HER2/neu (4B5) dobijena je podudarnost u 3 slučaja (2% od ukupnog uzorka). Kada je u pitanju negativna proteinska ekspresija HER2 receptora, dobijeni rezultati primenom ova dva antitela su identični u 136 slučajeva (91,9%).

Upotrebom neparametarskog Fisher-ovog testa, dobijena p vrednost ( $p=0,001$ ), ukazuje na visoku statističku povezanost rezultata dobijenih primenom ova dva antitela. Ukupna podudarnost između ova dva antitela iznosi 93,9%.

Koeficijent korelacije Phi za nominalne vrednosti iznosio je 0,429 čime je dokazana srednje jaka korelacija između rezultata dobijenih primenom HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela.

#### 5.4. Amplifikacija HER2 gena pomoću in situ hibridizacije

Prisustvo amplifikacije HER2 gena pomoću in situ hibridizacije (ISH) (Dual IHC HER2 kit; Ventana Medical Systems) testirano je kod svih 148 pacijenata. Amplifikacija je bila prisutna kod 26 pacijenata. Od toga kod 22 pacijenta je bila prisutna *low grade* amplifikacija, dok je kod 4 pacijenta bila prisutna *high grade* amplifikacija. Učestalost amplifikacije HER2 gena kod adenokarcinoma je bila 17,6% u čitavom uzorku, a od toga je *high grade* amplifikacija bila zastupljena kod 2,7%.

Odnos amplifikacije HER2 gena i pola prikazan je u Tabeli 46.

**Tabela 46. Odnos amplifikacije HER2 gena pomoću DISH u odnosu na pol**

	Muškarci	Žene
Pozitivan HER2 status	14 (9,5%)	12 (8,1%)
Negativan HER2 status	78 (52,7%)	44 (29,7%)

Ispitivanjem odnosa amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH-a i pola, amplifikacija je bila prisutna kod 14 pacijenta muškog pola i 12 pacijenta ženskog pola. U preostalim 122 pacijenata (82,4%) amplifikacija gena je bila negativna.

Vrednost p ( $p=0,336$ ) dobijena pomoću  $\chi^2$  neparametarskog testa ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji polova u odnosu na amplifikaciju HER2 gena.

Odnos između amplifikacije HER2 gena i pušačkih navika pacijenata prikazan je u Tabeli 47.

**Tabela 47. Odnos amplifikacije HER2 gena pomoću DISH u odnosu na pušačke navike**

	Pušači	Nepušači	Bivši pušači
Pozitivan HER2 status	20 (13,5%)	1 (0,7%)	5 (3,4%)
Negativan HER2 status	92 (62,2%)	7 (4,7%)	23 (15,5%)

Kada su pušačke navike u pitanju, od ukupnog broja pacijenata sa postojanjem amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH, 20 pacijenata su bili pušači, 1 pacijent je bio nepušač, dok su 5 pacijenata bili bivši pušači.

Fisher-ovim neparametarskim testom nije utvrđena statistički značajna povezanost između amplifikacije HER2 gena i pušačkih navika ( $p=1$ ).

Distribucija amplifikacije HER2 gena po starosnim grupama prikazana je u Tabeli 48.

**Tabela 48. Odnos amplifikacije HER2 gena pomoću DISH u odnosu na starosne grupe**

	Starosne grupe				
	31 - 40 godina	41 - 50 godina	51 - 60 godina	61 - 70 godina	71 - 80 godina
Pozitivan HER2 status	0 (0%)	1 (0,7%)	8 (5,4%)	14 (9,5%)	3 (2%)
Negativan HER2 status	1 (0,7%)	12 (8,1%)	49 (33,1%)	50 (33,8%)	10 (6,8%)

U odnosu na starosne grupe amplifikacija HER2 gena je najčešće bila prisutna kod pacijenata iz dve starosne grupe: 51-60 godina (8) i 61-70 godina starosti (14).

Nije dokazana statistički značajna razlika u raspodeli pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena po starosnim grupama ( $p$  vrednost Fisher-ovog testa je bila 0,615).

Ispitivana je analiza odnosa amplifikacije HER2 gena pomoću DISH prema karakteristikama primarnog tumora (veličina, infiltracija pleure i okolnih struktura, patološki T, N i M deskriptor, stadijum bolesti i predominantni histološki tip).

Distribucija amplifikacije HER2 gena po klasama veličine tumora prikazana je u Tabeli 49.

**Tabela 49. Odnos amplifikacije HER2 gena pomoću DISH u odnosu na veličinu tumora**

	Klase			
	I (0-20 mm)	II (21-30 mm)	III (31-50mm)	IV (preko 50 mm)
Pozitivan HER2 status	1 (0,7%)	3 (2%)	10 (6,8%)	12 (8,1%)
Negativan HER2 status	14 (9,5%)	21 (14,2%)	49 (33,1%)	38 (25,7%)

Pozitivan status za amplifikaciju HER2 gena se najčešće javljao u okviru klase IV (veličina tumora preko 50 mm).

Nema statistički značajne razlike u raspodeli amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH po klasama veličine tumora (Fisher-ov neparametarski test,  $p=0,452$ ).

Rezultati ispitivanja infiltracije pleure i okolnih struktura kod amplifikacije HER2 gena pomoću DISH prikazani su u Tabelama 50 i 51.

**Tabela 50. Odnos amplifikacije HER2 gena pomoću DISH i infiltracije pleure**

	Infiltracija pleure	Infiltracija pleure ne postoji
Pozitivan HER2 status	6 (4,1%)	20 (13,5%)
Negativan HER2 status	30 (20,3%)	92 (62,2%)

**Tabela 51. Odnos amplifikacije HER2 gena pomoću DISH i infiltracije okolnih struktura**

	Infiltracija okolnih struktura	Infiltracija okolnih struktura ne postoji
Pozitivan HER2 status	1 (0,7%)	25 (16,9%)
Negativan HER2 status	7 (4,7%)	115 (77,7%)

Kod 6 od ukupno 25 pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena je postojala infiltracija pleure, dok je kod samo jednog pacijenta postojala infiltracija okolnih struktura.

Odnos amplifikacije HER2 gena i T deskriptora tumora prikazan je u Tabeli 52.

**Tabela 52. Odnos amplifikacije HER2 gena i T deskriptora tumora**

	T deskriptor					
	T1a	T1b	T2a	T2b	T3	T4
Pozitivan HER2 status	2 (1,4%)	3 (2%)	7 (4,7%)	6 (4,1%)	7 (4,7%)	0 (0%)
Negativan HER2 status	12 (8,1%)	19 (12,8%)	36 (24,3%)	18 (12,2%)	30 (20,3%)	5 (3,4%)

Amplifikacija HER2 gena je bila najčešća u T2a deskriptoru (7), T3 (7) i T2b deskriptoru (6).

Primenom Fisher-ovog testa nije nađena statistički značajna povezanost amplifikacije HER2 gena i T deskriptora ( $p=0,832$ ).

Odnos amplifikacije HER2 gena i N deskriptora tumora prikazan je u Tabeli 53.

**Tabela 53. Odnos amplifikacije HER2 gena i N deskriptora tumora**

	N deskriptor			
	N0	N1	N2	N3
Pozitivan HER2 status	17 (11,5%)	6 (4,1%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)
Negativan HER2 status	79 (53,4%)	25 (16,9%)	17 (11,5%)	1 (0,7%)

Amplifikacija HER2 gena je najčešće bila u N0 deskriptoru (17 pacijenata). U N1 i N2 deskriptoru se nalazilo ukupno 8 pacijenata.

Upotrebom Fisher-ovog testa nije dobijena statistički značajna povezanost između amplifikacije HER2 gena i N deskriptora ( $p=0,48$ ).

Odnos amplifikacije HER2 gena i M deskriptora prikazan je u Tabeli 54.

**Tabela 54. Odnos amplifikacije HER2 gena i M deskriptora tumora**

	M deskriptor		
	M0	M1a	M1b
Pozitivan HER2 status	23 (15,5%)	1 (0,7%)	2 (1,4%)
Negativan HER2 status	101 (68,2%)	2 (1,4%)	19 (12,8%)

Amplifikacija HER2 gena je bila najčešća kod pacijenata u M0 deskriptoru (15,5%).

Analizom podataka nije dobijena statistički značajna povezanost između amplifikacije HER2 gena i M deskriptora (p vrednost Fisher-ovog testa iznosi 0,393).

Odnos amplifikacije HER2 gena i stadijuma bolesti prikazan je u Tabeli 55.

**Tabela 55. Odnos amplifikacije HER2 gena u odnosu na stadijum bolesti**

	Stadijum bolesti						
	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
Pozitivan HER2 status	3 (2%)	7 (4,7%)	3 (2%)	5 (3,4%)	4 (2,7%)	1 (0,7%)	3 (2%)
Negativan HER2 status	19 (12,8%)	21 (14,2%)	21 (14,2%)	21 (14,2%)	18 (12,2%)	1 (0,7%)	21 (14,2%)

Najveći broj pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena bio je u IB stadijumu (7 pacijenata), zatim u IIB stadijumu (5 pacijenata) i IIIA stadijumu (4 pacijenta).

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa nije dobijena statistički značajna povezanost između genske amplifikacije i stadijuma bolesti (p=0,684).

Odnos između amplifikacije HER2 gena i predominantnog histološkog tipa tumora prikazan je u Tabeli 56.



**Tabela 56. Odnos amplifikacije HER2 gena u odnosu na predominantni tip tumora**

	Predominantni tip					
	Solidni	Acinarni	Papilarni	Mikropapilarni	Lepidični	Enterični
Pozitivan HER2 status	11 (7,4%)	7 (4,7%)	6 (4,1%)	2 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativan HER2 status	41 (27,7%)	39 (26,4%)	19 (12,8%)	13 (8,8%)	8 (5,4%)	2 (1,4%)

Prisustvo HER2 genske amplifikacije je bilo najčešće kod solidnog (7,4%), acinarnog (4,7%) i papilarnog (4,1%) tipa tumora.

#### 5.4.1. Amplifikacija HER2 gena kod uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena korišćenjem HercepTest Dako.

Odnos između proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene upotrebom HercepTest Dako i amplifikacije HER2 gena prikazan je u Tabeli 57.

**Tabela 57. Podudarnost proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i amplifikacije HER2 gena pomoću DISH**

		HercepTest Dako	
		Pozitivna ekspresija	Negativna ekspresija
Dual IHC HER2 kit	Pozitivan HER2 status	10 (6,8%)	16 (10,8%)
	Negativan HER2 status	1 (0,7%)	121 (81,8%)

Pozitivan status HER2 genske amplifikacije se podudara sa pozitivnom proteinskom ekspresijom HER2 receptora dobijenog pomoću HercepTest Dako kod 10 (6,8%) pacijenata u ukupnom uzorku. S druge strane negativan status HER2 genske amplifikacije se slagao kod 121 (81,8%) pacijenta koji su imali negativnu ekspresiju HER2 receptora.

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa utvrđena je statistički značajna povezanost amplifikacije utvrđene pomoću DISH i ekspresije HER2 receptora dobijene uz pomoć HercepTest Dako ( $p < 0,001$ ).

Vrednost koeficijenta Phi ukazuje na jaku povezanost rezultata dobijenih pomoću ova dva testa ( $\Phi = 0,546$ ).

#### 5.4.2. Amplifikacija HER2 gena kod uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena korišćenjem Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela.

Odnos između proteinske ekspresije HER2 receptora upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i amplifikacije HER2 gena prikazan je u Tabeli 58.

**Tabela 58. Podudarnost proteinske ekspresije HER2 receptora za Ventana anti-HER2/neu (4B5) i amplifikacije HER2 gena pomoću DISH**

		Ventana anti-HER2/neu (4B5)	
		Pozitivna ekspresija	Negativna ekspresija
Dual IHC kit	Pozitivan HER2 status	3 (2%)	23 (15,5%)
	Negativan HER2 status	1 (0,7%)	121 (81,8%)

Prisustvo HER2 genske amplifikacije i pozitivne proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) u našem uzorku nađeno je kod 3 pacijenta (2% ukupnog uzorka). Negativan status HER2 genske amplifikacije i negativna ekspresija HER2 receptora su nađeni kod 81,8% pacijenata iz ukupnog uzorka.

Fisher-ov neparametarski test je ukazao na značajnu povezanost amplifikacije i proteinske ekspresije dobijene uz pomoć Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela ( $p = 0,017$ ).

Vrednost koeficijenta Phi ukazuje na malu povezanost rezultata dobijenih pomoću ova dva testa ( $\Phi = 0,252$ ).

### 5.5. Analiza amplifikacije HER2 gena kod pacijenata sa povećanom proteinskom ekspresijom HER2 receptora ocenjenom sa 2+ i 3+ primenom „Hercep Test Dako“ i „Ventana anti-HER2/neu (4B5)“.

Podudarnost rezultata pozitivne proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako, amplifikacije HER2 gena i pozitivne proteinske ekspresije za Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela prikazana je u Tabeli 59.

**Tabela 59. Podudarnost proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i amplifikacije HER2 gena pomoću DISH ( Ventana anti-HER2/neu (4B5) = pozitivna ekspresija)**

		HercepTest Dako	
		Pozitivna ekspresija	Negativna ekspresija
Ddish IHC HER2 kit	Pozitivan HER2 status	3 (75%)	0 (0%)
	Negativan HER2 status	0 (0%)	1 (25%)

Podudaranje pozitivne ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako i pozitivne amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH je bilo kod 3 pacijenta sa pozitivnom ekspresijom utvrđenom pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5), što predstavlja samo 2% od ukupnog uzorka .

Podudarnost rezultata negativne proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako, odsustva amplifikacije HER2 gena i negativne proteinske ekspresije za Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela prikazana je u Tabeli 60.

**Tabela 60. Podudarnost proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako i amplifikacije HER2 gena pomoću DISH ( Ventana anti-HER2/neu (4B5) = negativna ekspresija)**

		HercepTest Dako	
		Pozitivna ekspresija	Negativna ekspresija
Dual IHC kit	Pozitivan HER2 status	7 (4,9%)	16 (11,1%)
	Negativan HER2 status	1 (0,7%)	120 (83,3%)

Podudaranje negativne ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako i negativne amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH je bilo kod 120 pacijenata sa negativnom ekspresijom utvrđenom pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5), što predstavlja 81,1% od ukupnog uzorka.

S obzirom na dobijene pozitivne i negativne rezultate dobijene primenom sva tri testa možemo zaključiti da će se dobiti identični rezultati u 83,1% slučajeva.

## 6. DISKUSIJA

U svetu, karcinom pluća je najčešći maligni tumor i vodeći uzrok smrti od karcinoma proteklih nekoliko decenija. U 2012. godini procenjeno je ukupno 1,8 miliona novih slučajeva, što predstavlja 12,9% svih novootkrivenih karcinoma (9). Apsolutna i relativna učestalost karcinoma pluća dramatično je rasla. Od 1953. godine karcinom pluća postao je najčešći uzrok smrtnosti od karcinoma kod muškaraca, a 1985. godine postao je i vodeći uzrok smrtnih slučajeva kod žena (249).

U SAD karcinom pluća se javlja u oko 234.000 pacijenata i uzrokuje preko 154.000 smrtnih slučajeva godišnje (250). Incidencu karcinoma pluća u SAD karakterišu i značajne razlike u rasnoj distribuciji, pri čemu afrički muškarci imaju oko 50% veću incidencu nego belci. Uprkos značajnom smanjenju pušenja tokom poslednjih 50 godina karcinom pluća je i dalje glavni uzrok smrti od karcinoma u SAD, čineći oko 27,4% svih smrtnih slučajeva od karcinoma (251). Gotovo polovina (49%) svih slučajeva karcinoma pluća se javlja u zemljama koje su sa srednjim i niskim indeksom razvoja (9). Od 1960-ih prijavljuje se značajno smanjenje incidence karcinoma pluća u SAD (252), pri čemu se trendovi u velikoj meri razlikuju u zavisnosti od histološkog tipa. Incidencija adenokarcinoma je u porastu, dok se incidencija drugih histoloških tipova (skvamoznih, malih i velikih ćelija) smanjuje (16, 253, 254). To je rezultiralo kontinuiranim rastom u procentu adenokarcinoma pluća (40%), koji je sada najčešće dijagnostikovani histološki tip kod oba pola (255, 256). Od 2004/2005. godine povećanje stepena incidence skvamoznih karcinoma i adenokarcinoma, posebno kod belaca, može se pripisati istovremenom smanjenju incidence karcinoma klasifikovanog kao "drugi nesitnoćelijski karcinomi pluća" i uvođenjem nove histološke klasifikacije (16, 253, 257, 258).

Od 80-ih godina prošlog veka zabeležen je pad incidence skvamoznog karcinoma pluća, nakon smanjenja potrošnje duvana po glavi stanovnika. Trend pada incidence je uočen nakon 16 godina od promena pušačkih navika. U istom periodu, tokom poslednjih nekoliko decenija, zabeleženo je kontinuirano povećanje stepena incidence adenokarcinoma pluća (2259, 260). *Devesa i sarad.* (16) su objavili 1997. god. povećanje incidence adenokarcinoma u skoro svim delovima sveta sa povećanjem broja obolelih muškaraca od 50% u mnogim delovima Evrope.

Razlika u procentualnoj zastupljenosti pojedinih histoloških tipova sa porastom incidence adenokarcinoma pluća objašnjava se promenama u duvanskoj industriji i pušačkim navikama poslednjih decenija. Povećan trend adenokarcinoma je uglavnom zbog upotrebe cigareta sa niskom tarifom. Upotrebom cigareta sa filterima omogućava se duboko udisanje duvanskog dima i oslobađanje veće koncentracije nitrozamina u odnosu na ranije korišćene cigarete bez filtera. Inhalacijom se dopremaju duvanski kancerogeni distalno prema bronhoalveolarnoj junciji gde najčešće nastaju adenokarcinomi. Alternativna hipoteza za povećanje trenda

adenokarcinoma je zagađenje vazduha koje proizilazi iz industrijalizacije i urbanizacije (254, 261).

Adenokarcinom pluća je najčešće heterogen sa mešovitom slikom različitih histoloških obrazaca rasta i klasifikuje se kao “mešoviti tip”. Iako histološke karakteristike i ekspresija određenih markera i dalje predstavlja osnovu patološke dijagnoze, napredak u tehnologijama sekvenciranja doveo je do razumevanja tumorske heterogenosti i podele adenokarcinoma pluća u molekularne podtipove prema klasifikaciji zasnovanoj na takozvanim “*driver mutations*”. Ove mutacije predstavljaju molekularne promene neophodne za inicijaciju i rast tumora. Često se detektuju u genima koji kontrolišu proliferaciju i preživljavanje ćelija (262, 263). Otkrivanje mutiranih onkogenata, koji kodiraju sintezu onkoproteina i aktivaciju signalnih puteva koji dovode do proliferacije ćelija i na taj način promoviraju rast tumora, dovelo je do razvoja manje toksičnih i efikasnijih lekova za lečenje obolelih od karcinoma pluća. Napredak u razumevanju molekularnih puteva koji dovode do progresije tumora omogućava uvođenje ciljane terapije u lečenju adenokarcinoma pluća. Otkriće mutiranog onkogenata i njegove uloge u predviđanju odgovora na ciljanu terapiju promenio je način pristupa dijagnozi i lečenju plućnih adenokarcinoma. Izbor odgovarajućeg terapijskog pristupa sada je zasnovan na detaljnoj analizi histoloških karakteristika, genetskih (mutacija) promena i određivanje tumorskog profila za svakog pacijenta pojedinačno.

Naše istraživanje je bilo retrospektivnog i prospektivnog karaktera i obuhvatilo je 148 bolesnika koji su prvi put operisani, bez prethodne radio i/ili hemioterapije sa patohistološkom dijagnozom invazivnog adenokarcinoma. Broj ispitanika u studijama koje su analizirale proteinsku ekspresiju HER2 receptora i amplifikaciju HER2 gena kod adenokarcinoma pluća u periodu od 2008. do 2017. god. je bio različit i kretao se od 20 do 1055 bolesnika (203, 264).

Analizom ispitanika u ovoj studiji uočava se da su adenokarcinomi pluća češći kod muškaraca (62,2%) nego kod žena (37,8%). Slične rezultate su objavili i drugi autori (265, 266). *Warth i sarad.* su 2015. god. u kohorti od 674 bolesnika analizirali kliničko-patološke karakteristike adenokarcinoma pluća. U ovom istraživanju je bilo 58,2% muškaraca i 41,8% žena (265). Novija istraživanja beleže sve veći broj obolelih žena od adenokarcinoma pluća, ali i dalje je u ukupnoj svetskoj populaciji ovo oboljenje češće među muškarcima.

Prosečna starost svih 148 ispitanika u našem uzorku je bila 60,8 godina, najmlađi ispitanik je imao 32 godine a najstariji 79 godina. Najveći broj ispitanika je bio zastupljen u starosnim grupama 51-60 godina (38,5%) i 61-70 godina starosti (43,2%). U svim starosnim grupama muškarci predstavljaju najveći procenat obolelih od adenokarcinoma pluća osim u starosnoj grupi 41-50 godina, gde je procenat muškaraca (2,7%) manji od procenta žena (6,1%). U okviru starosnih grupa 51-60 godina i 61-70 godina, 54,1% adenokarcinoma se javljalo kod muškaraca, dok kod žena ovaj procenat je iznosio 27,7%. Rezultati naše studije su slični sa rezultatima drugih autora, gde se prosečna starost ispitanika sa karcinomom pluća kretala od 60 do 65,9 godina, sa rasponom od 23 do 89 godina starosti (203, 267). I u našoj studiji i u svetu, karcinomi pluća su najčešći u kasnijem životnom dobu, 25% u periodu od 55 do 64

godine, a 55% kod starijih od 65 godina (268). *Morgenszter i sarad.* su 2010. godine analizirali distribuciju karcinoma pluća po starosnim grupama u periodu od 1998. do 2006. godine za svaku godinu pojedinačno. Najveći broj obolelih u svakoj godini je bio u starosnoj dobi od 51-70 godina i u starosnoj dobi preko 70 godina sa učestalošću od 44,9% do 49% (269).

Pušenje je jedan od najvažnijih faktora rizika za nastanak karcinoma pluća. Rizik za nastanak karcinoma pluća je proporcionalan količini potrošnje cigareta, a faktori kao što je broj popušanih cigareta po danu, dužina pušačkog staža, stepen inhalacije, količina katrana i nikotina u cigaretama, upotreba cigareta bez filtera, su važni u proceni rizika (270, 271). U našem istraživanju aktivnih pušača je bilo 112 (75,7%), što je znatno češće u odnosu na podatke drugih autora: 27,1% (267), 35,5% (272) i 57,7% (203). *Poposka i sarad.* su na uzorku od 127 pacijenata obolelih od karcinoma pluća objavili da je zastupljenost pušača bila 80,1% (264), što je slično našim rezultatima. Broj bivših pušača u našem istraživanju je bio 28 (18,9%) što je manje u odnosu na publikovane podatke 27,1% (273), 46,15% (267). U našem istraživanju 8 pacijenata (5,4%) nije pušilo, što je manje nego u objavljenim podacima drugih studija 15,8% (273) i 42,6% (203). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je procenat aktivnih pušača bio najviši kod pacijenata oba pola, procentualno veći kod muškaraca 46,6% u odnosu na žene 29,1% od ukupnog uzorka. Procenat nepušača je bio podjednako zastupljen kod oba pola. Što se tiče bivših pušača utvrđen je veći procenat kod muškaraca (12,8%) u odnosu na žene (6,1%). Vrednost p ( $p=0,636$ ) dobijena Fišerovim testom je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u pušačkim navikama između muškaraca i žena. *Nagy-Mignotte i sarad.* su u analizi pušačkih navika kod pacijenata sa primarnim adenokarcinomom pluća objavili da je procenat aktivnih pušača najviši kod oba pola kao i u našem istraživanju. Kod aktivnih pušača i bivših pušača je bio veći procenat muškaraca u odnosu na žene što se slaže sa našim rezultatima. Kod nepušača je bio veći procenat žena, a u našoj studiji su nepušači bili podjednako zastupljeni kod oba pola (273).

Nakon makroskopske evaluacije merena je veličina tumora izražena u milimetrima. Prosečna veličina tumora je iznosila  $48,2 \pm 26,4$  mm, od kojih je najmanji bio 9 mm, dok je najveći bio 150 mm. Tumori su podeljeni u 4 klase prema njihovoj veličini: I (0-20 mm), II (21-30 mm), III (31-50mm) i IV (preko 50 mm). Gledano u odnosu na sve pacijente, najzastupljenija veličina tumora je bila u klasi III, dok je najmanje bila zastupljena klasa I. Kod muškaraca i žena pojedinačno je takođe bila najzastupljenija III klasa. Vrednost p ( $p=0,410$ ) dobijena pomoću  $\chi^2$  testa, pokazala je da nema statistički značajne razlike u veličini tumora među polovima, posmatrano po definisanim klasama veličine tumora. Naši rezultati se ne razlikuju od dugih autora gde je najzastupljenija veličina tumora u klasi od 31-50 mm i kod muškaraca i kod žena (274-276).

Ispitivanjem infiltracije visceralne pleure kod bolesnika u našem uzorku, u 24,3% je potvrđena infiltracija, dok kod 75,7% infiltracija nije nađena. Najveća zastupljenost infiltracije pleure se javljala u klasi veličine tumora IV (preko 50 mm). Naši podaci ne odstupaju od rezultata drugih studija, gde je infiltracija potvrđena kod 25,6% (277) i 25,5% (278) adenokarcinoma pluća, pri čemu je najveća zastupljenost od 33% kod tumora većih od

50 mm (278). Još 1958. godine, *Breuer i sarad.* su prepoznali pleuralnu invaziju kod karcinoma pluća kao faktor loše prognoze (279). Osim invazije zida grudnog koša i medijastinalne pleure, visceralna pleuralna invazija je prepoznata sredinom sedamdesetih godina prošlog veka kao specifičan entitet u TNM klasifikaciji koja je do sada ostala nepromenjena: tumor bilo koje veličine koji zahvata visceralnu pleuru se klasifikuje kao T2 (280).

Kada je zastupljenost infiltracije okolnih struktura u pitanju, kod 5,4% je bila prisutna infiltracija, dok kod 94,6% pacijenata infiltracija nije nađena. Okolne strukture koje su bile infiltrirane u našem istraživanju su bila: rebra, međurebarni prostori i meka tkiva zida grudnog koša. Najveća zastupljenost infiltracije okolnih struktura se javljala kod klase IV (preko 50 mm). Rezultati naše studije su identični sa podacima drugih studija koje navode učestalost od 5% infiltracije okolnih struktura kod primarnih karcinoma pluća (281). Prema najnovijoj TNM klasifikaciji, tumori pluća koji infiltrišu okolne strukture su klasifikovani kao T3 i predstavljaju oko 45% svih T3 plućnih karcinoma. Karcinomi pluća sa infiltracijom okolnih struktura su lokalno uznapredovali tumori kod kojih je najvažniji prognostički faktor odsustvo metastaza u limfnim čvorovima. Prosečna 5-godišnja stopa preživljavanja pT3N0 pacijenata je oko 50% (282).

Patološka TNM klasifikacija i stadijum bolesti je određen kod svih pacijenata koristeći sedmu reviziju TNM klasifikacije karcinoma pluća (117, 118). Među T deskriptorima, najzastupljeniji je bio pT2 (47,2%), pri čemu je dvostruko više ispitanika bilo u pT2a (31%) deskriptoru u odnosu na pT2b (16,2%). Drugi po učestalosti je pT3 koji je bio zastupljen u 25% ispitanika. Prema literalnim navodima najzastupljeniji patološki T deskriptor je pT2 45% (283), 53,2% (206), 60,2% (265) kao i kod naših pacijenata, dok je drugi po učestalosti pT1 20,5% (265), 28,5% (206), 42% (283) i 57% (284). U našoj studiji drugi po učestalosti je bio pT3 deskriptor.

Kod najvećeg broja pacijenata (64,9%) nismo našli metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. Najveći broj pacijenata i to 20,9% je bio u N1 deskriptoru proširenosti tumora, dok najmanji broj (1,4%) je bio u N3 deskriptoru. Prema navodima drugih autora, najveći broj operisanih pacijenata sa primarnim adenokarcinomom pluća je bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima 65,4% (285), 70,6% (283). Pacijenti sa patohistološki dokazanim metastazama adenokarcinoma pluća u regionalnim limfnim čvorovima su u najvećem procentu u N1 deskriptoru (19%) (283), a najmanji procenat pacijenata je u N3 deskriptoru (3,2%) (206). Naši rezultati ne odstupaju od rezultata drugih autora koji se odnose na procenu N statusa kod adenokarcinoma pluća.

Većina pacijenata iz našeg uzorka, tj. 124 pacijenta, nisu imala udaljene metastaze. Metastaze su bile prisutne u 16,2%, od toga 2% pacijenata je bilo u M1a deskriptoru tumora, dok je 14,2% pacijenata bilo u M1b deskriptoru. Udaljene metastaze kod naših pacijenata su nađene u velikom mozgu, plućima, malom mozgu, kostima, nadbubrežnoj žlezdi, jetri i potkožnom tkivu. Najčešća lokalizacija udaljenih metastaza u našoj studiji je bila veliki mozak. Približno kod 30-40% pacijenata sa NSCLC u vreme dijagnoze ima proširenu, metastatsku bolest



(286), znatno veći procenat nego u našoj studiji. Najčešće lokalizacije metastaza su kosti, pluća, centralni nervni sistem, jetra i nadbubrežna žlezda (286, 287). *Tamura i sarad.* (288) su u studiji koja je obuhvatila 1542 pacijenta sa NSCLC, kod 729 (47.3%) pacijenata registrovali udaljene metastaze. Najčešća lokalizacija metastaza su bile kosti, zatim pluća, mozak, nadbubrežne žlezde i jetra. *Sorensen i sarad.* (289) su dokazali da pacijenti sa NSCLC sa metastazama u mozgu imaju lošije preživljavanje u poređenju sa pacijentima bez metastaza u moždanom parenhimu. Ove rezultate su kasnije potvrdili i drugi autori (195, 290, 291). Incidenca metastaza u mozgu kod karcinoma pluća se povećava zahvaljujući boljem tretmanu i dužem preživljavanju pacijenata, kao i zahvaljujući boljim tehnikama snimanja i detekciji promena u centralnom nervnom sistemu (288).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je najzastupljeniji stadijum u ukupnom uzorku bio IB (18,9%), s tim da je kod muškaraca najčešći bio IB (14,9%), a kod žena IA stadijum (10,1%). Najmanje pacijenata u ukupnom uzorku je bilo u IIIB stadijumu (1,4%) i svi pacijenti su bili muškarci. Vrednost  $p$  ( $p=0,003$ ) dobijena  $\chi^2$  neparametarskim testom je pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji stadijuma bolesti prema polu. *Warth* je u analizi 487 ispitanika objavio slične rezultate. Najzastupljeniji stadijumi u njegovoj studiji su bili IIIA (31%) i IB (28,1%), dok je najmanje pacijenata bilo u IIIB (2,3%) stadijumu (292). Rezultati drugih autora ukazuju da je najveći broj pacijenata u IA (51,44%) i IB (37%) stadijumu, dok je najmanje zastupljen IIIB (0,41%) stadijum. Ovi podaci sugerišu na porast frekvence malih tumora u stadijumu IA i IB, što je najverovatnije rezultat sve veće upotrebe CT skeniranja i slučajnog nalaza plućnih lezija (267, 293).

Uzorci tumorskog tkiva svih 148 pacijenta su klasifikovani primenom IASLC/ATC/ERS kriterijuma. Semikvantitavno je određena svaka komponenta invazivnog karcinoma koja je bila zastupljena u  $\geq 5\%$  tumorskog tkiva, a zatim je definisan predominantni tip koji je u najvećem procentu bio zastupljen u tumoru. U našem uzorku najčešći predominantni tip adenokarcinoma je bio solidni (35,1%), zatim acinarni (31,1%) i papilarni tip (16,9%), dok su u manjem procentu bili zastupljeni mikropapilarni (10,1%) i lepidični tip (5,4%). Enterična varijanta adenokarcinoma je nađena kod 2 pacijenta (1,4%). Distribucija predominantnih tipova kod adenokarcinoma pluća se razlikuje od studije do studije. U većini studija najfrekventniji su predominantno acinarni i solidni tip sa nešto češćom pojavom acinarnog u odnosu na solidni tip 48% prema 17,8% (285), 42,5% prema 37,6% (292), 39,2% prema 33,5% (265), 40% prema 27% (294). Na trećem mestu po učestalosti nalazi se papilarni tip sa 12,8% (285), 14,1% (265), 16,5% (294), dok su u manjem procentu zastupljeni mikropapilarni tip 9,3% (285), 8% (265), 6,8% (292), 5,7% (294) i lepidični tip 8,4% (292), 7,5% (285), 5,2% (265), 3,9% (294). Ovi podaci ne odstupaju od rezultata naše studije. Procentulna zastupljenost predominantnih tipova je slična, jedina razlika je u tome da je u našoj studiji solidni tip neznatno procentualno više zastupljen u odnosu na acinarni tip. Suprotno našim rezultatima *Zhang* je u analizi 176 pacijenata dobio drugačiju distribuciju predominantnih tipova. Najviše pacijenata imalo je papilarno predominantni tip (40,1%), zatim acinarni tip (22,7%), lepidični tip (8%), solidni tip (6,8%) i mikropapilarni tip (5,7%), dok su druge varijante adenokarcinoma bile zastupljenje u 3,4% (295).

Analizirajući povezanost predominantnog tipa sa kliničkim karakteristikama pacijenata uočili smo da su u dva najfrekventnija predominantna tipa (solidni i acinarni) muškarci zastupljeni u većem procentu u odnosu na žene, pri čemu je vrednost  $p$  ( $p=0,965$ ) dobijena Fisher-ovim neparametarskim testom dokazala da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova prema polu. Naši podaci su slični sa objavljenim rezultatima, gde su muškarci u nešto većem procentu zastupljeni i u solidnom i u acinarno predominantnom tipu adenokarcinoma (296).

Analizom povezanosti predominantnog tipa sa starosnim grupama našli smo da je učestalost predominantnog tipa tumora u odnosu na starosnu dob ujednačena ( $p=0,131$ ). Najveća zastupljenost solidnog i acinarnog tipa (15,5% svaka pojedinačno) je nađena u starosnoj grupi 51-60 godina. Najmanja prosečna starost (60 godina) je uočena kod enteričnog tipa, dok je najveća prosečna starost (63,3 godina) uočena kod lepidičnog tipa. U dva najzastupljenija tipa tumora (solidni i acinarni) prosečna starost je bila slična (60,1 i 60,3 godina). Rezultati Two-way ANOVA testa su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u prosečnoj starosti muškaraca i žena u odnosu na predominantni tip adenokarcinoma ( $p=0,108$ ), što je potvrđeno i u drugim studijama (297, 298).

Ispitujući odnos predominantnog tipa i pušačkih navika, u našoj studiji je uočeno da su kod najvećeg broja pušača najčešći solidni i acinarni tipovi adenokarcinoma (69,6%). Isti predominantni tipovi (solidni i acinarni) su takođe bili najčešći kod bivših pušača (60,7%). Kod nepušača svi predominantni tipovi su bili prisutni u podjednakom broju. Da postoji statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova adenokarcinoma prema pušačkim navikama dokazali smo Fisher-ovim neparametarskim testom ( $p=0,041$ ). Naši rezultati su saglasni sa rezultatima drugih autora (296, 297, 299).

Analizirajući povezanost predominantnog tipa sa karakteristikama primarnog tumora (prosečna veličina, veličina tumora podeljena po klasama, infiltracija pleure i okolnih struktura, patološki T, N i M deskriptor i stadijum bolesti) dobili smo sledeće rezultate. Najmanja prosečna veličina tumora nađena je kod papilarno predominantnog tipa (39,6 mm; u rasponu od 15 mm do 80 mm). Nešto veće prosečne veličine tumora evidentirane su kod solidnog (49,9 mm; u rasponu od 12 mm do 150 mm), acinarnog (47,8 mm; u rasponu od 9 mm do 140 mm) i enteričnog (48,5 mm; u rasponu od 25 mm do 72 mm) tipa, dok su se najveće vrednosti mogle uočiti kod lepidičnog (52,4 mm; u rasponu od 15 mm do 120 mm) i mikropapilarnog (55,8 mm; u rasponu od 12 mm do 140 mm) tipa. Naši rezultati se slažu sa rezultatima drugih studija kod kojih mikropapilarno predominantni tip, kao prognostički lošiji, ima najveću prosečnu veličinu tumora u trenutku dijagnoze (131, 292, 297). Značajno odstupanje se vidi kod lepidično predominantnog tipa koji u našem uzorku ima znatno veću prosečnu veličinu tumora u odnosu na podatke objavljene u drugim studijama (292, 297).

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa ( $p=0,011$ ) dokazana je statistički značajna povezanost kada je u pitanju predominantni tip tumora i infiltracija pleure. Najzastupljeniji predominantni tip sa infiltracijom pleure je bio solidni (6,8%), a zatim acinarni (6,1%), mikropapilarni (6,1%) i papilarni (4,7%), dok kod pacijenata sa lepidičnim tipom

adenokarcinoma nije nađena infiltracija pleure. Od dva pacijenta sa enteričnom varijantom adenokarcinoma jedan je imao infiltraciju pleure (0,7%). Naši podaci su slični sa objavljenim podacima u naučnim radovima gde je pleuralna infiltracija u najvećem procentu povezana sa acinarnim, solidnim i papilarnim tipom (277, 300).

Infiltracija okolnih struktura nije statistički značajno povezana sa predominantnim tipom tumora (Fisher-ov neparametarski test,  $p=0,503$ ) u našem istražvanju, što se slaže sa rezultatima drugih studija (282). Detektovali smo u acinarnom i solidnom tipu infiltraciju okolnih struktura sa učestalošću od po 2%, dok je u mikropapilarnom bila prisutna u 1,4% slučajeva. Ostali tipovi adenokarcinoma nisu bili praćeni infiltracijom okolnih struktura.

Analiziranjem patološkog T deskriptora tumora, utvrđeno je da najfrekventnije predominantne tipove predstavljaju solidni i acinarni tip u okviru pT2a deskriptora (81,4%). Vrednost  $p=0,926$  dobijena pomoću Fisher-ovog neparametarskog testa je pokazala da nema statistički značajne razlike u raspodeli predominantnih tipova u odnosu na T deskriptor. Ove rezultate potvrdili su i drugi autori (292) koji su evidentirali najčešće solidni i acinarni predominantni tip u pT2a deskriptoru.

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa nije dobijena statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova tumora u odnosu na N deskriptor ( $p=0,128$ ). Kod 35,1% pacijenata nađene su metastaze u regionalnim limfnim čvorovima, od toga najzastupljeniji je bio solidno predominantni tip (6,8%) u N1 i N2 deskriptoru. U okviru N1 deskriptora najzastupljeniji predominantni tip je bio acinarni (8,8%). *Warth* je u analizi 487 pacijenata sa adenokarcinomom pluća kod 46,6% evidentirao metastaze u limfnim čvorovima. Najzastupljeniji predominantni tip je bio acinarni (19,7%) a zatim solidni (19,1%) u N1 i N2 deskriptoru, dok je u okviru N1 deskriptora najzastupljeniji bio solidni tip. Ovi podaci pokazuju procentualno veću zastupljenost acinarnog i solidnog tipa nego u našoj studiji i nešto veću zastupljenost acinarnog tipa u odnosu na solidni dok je u našoj studiji obrnut slučaj (292). Ovakav odnos može se objasniti nešto većom zastupljenošću solidnog predominantnog tipa u odnosu na acinarni u našem uzorku.

Prisustvo udaljenih metastaza je najčešće nađeno kod predominantno solidnog (8,8%) i acinarnog tipa (4,1%). Utvrđena je statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova u odnosu na prisustvo udaljenih metastaza, dobijena p vrednost primenom Fisher-ovog neparametarskog testa je iznosila  $p=0,009$ . Naši rezultati ne odstupaju od rezultata drugih autora u kojima su solidni i acinarni predominantni tipovi najčešći kod postojanja udaljenih metastaza (292).

Posmatrajući raspodelu predominantnih tipova po stadijumu bolesti rezultati našeg istraživanja su pokazali da pacijenti sa solidnim predominantnim tipom u IV stadijumu predstavljaju najbrojniju grupu pacijenata (8,8%). Predominantno solidni tip se nalazio kod 6,8% pacijenata u okviru IB i IIIA stadijuma. U istom procentu je bio zastupljen i acinarno predominantni tip u okviru IB stadijuma. Ostali predominantni tipovi tumora su podjednako bili zastupljeni u svim stadijumima bolesti. Pacijenti sa enteričnom varijantom

adenokarcinoma su bili u višim stadijumima bolesti (IIIA i IV). Vrednost  $p=0,204$  dobijena pomoću Fisher-ovog testa ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli predominantnih tipova tumora u odnosu na patološki stadijum bolesti. Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima koje su objavili *Warth i sarad.* Najfrekventniji je bio acinarno predominantni tip u IIIA stadijumu (13,1%), a zatim solidno predominantni tip takođe u stadijumu IIIA (11,9%). Solidno predominantni tip je bio najčešći u višim stadijumima bolesti (III i IV), kao i u našoj studiji (292).

Na osnovu rezultata prethodnih studija koje su analizirale prognostički značaj predominantnih histoloških tipova adenokarcinoma pluća (292, 301, 302) sve pacijente smo podelili u tri prognostičke grupe. Grupu sa dobrom prognozom u kojoj je lepidično predominantni tip činilo je 8 pacijenata (5,4%). Grupu sa umerenom prognozom u kojoj su acinarni i papilarni predominantni tip činilo je 73 pacijenata (49,3%). U grupi sa lošom prognozom u kojoj su mikropapilarni i solidno predominantni tip se nalazilo 77 pacijenata (52%).

Povećana ekspresija HER2 receptora izražena je u mnogim malignim tumorima epitelnog porekla uključujući karcinom dojke, jajnika, pljuvačnih žlezda, gastrointestinalnog trakta, prostate, pluća, bubrega, jetre i mokraćne bešike, što ukazuje da njegova prekomerna ekspresija može imati ključnu ulogu u razvoju i progresiji karcinoma (180). U studijama koje su ocenjivale proteinsku ekspresiju HER2 receptora u karcinomima pluća koristeći imunohistohemiju dobijeni su različiti podaci. Postojanje diskrepance među objavljenim rezultatima povećane ekspresije HER2 receptora u NSCLC u različitim studijama, može se objasniti različitim tehnikama koje se koriste za određivanje HER2 ekspresije. Najčešće se koristi imunohistohemija, ali rezultati mogu varirati u zavisnosti od vrste antitela koje se koristi, koncentracije antitela, očuvanosti tkiva kao i u subjektivnoj pristrasnosti u očitavanju rezultata. Različite studije koriste različite protokole za ocenjivanje HER2 pozitivnosti u NSCLC pluća. Cilj novih istraživanja je da ponude nove mogućnosti lečenja pacijentima sa karcinomom pluća, obzirom na visoku učestalost karcinoma pluća u svetu. U dosadašnjim studijama najveća potencijalna korist ciljanom terapijom kod pacijenata sa NSCLC pluća je viđena u grupi pacijenata sa jakom IHC ekspresijom HER2 (3+), koja je najčešće nađena kod *high grade* adenokarcinoma (195, 206).

U našem istraživanju kod svih pacijenata određivana je imunohistohemijski proteinska ekspresija HER2 receptora pomoću dva antitela: HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5), a zatim smo dobijene rezultate međusobno upoređivali.

Analizom frekvencija pozitivne i negativne proteinske ekspresije HER2 receptora, utvrdili smo da pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora (2+, 3+) kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća iznosi 7,4% za HercepTest Dako, dok za HER2 Ventana test iznosi 2,7%. U literaturi zastupljenost prekomerne proteinske ekspresije kreće se u rasponu od 2,4% do 38% (195, 198, 267, 303). Koristeći HercepTest Dako drugi autori su dobili procentualno veću zastupljenost prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora kod adenokarcinoma pluća u odnosu na naše rezultate: *Awaya i sarad* 20,93% (304), *Yoshizawa i sarad* 15,23%

(267), *Grob i sarad* 13,99% (206). Kada se za određivanje povećane proteinske ekspresije HER2 receptora koristi Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitelo naši rezultati su slični sa rezultatima drugih studija. *Suzuki i sarad.* su objavili HER2 pozitivnost od 2,6% na uzorku od 1055 adenokarcinoma (203), dok su nešto češću prekomernu proteinsku ekspresiju HER2 receptora objavili *Kobyakov i sarad* 6,1% (305) i *Kim i sarad* 7,78% (285).

Nakon evaluacije proteinske ekspresije HER2 receptora korišćenjem HercepTest Dako uporedili smo dobijene rezultate sa kliničkim karakteristikama pacijenata i sa karakteristikama tumora.

Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora (HercepTest Dako) nađena je kod ukupno 11 pacijenata, od toga je kod 5 pacijenata ocenjena sa 3+, dok je kod 6 pacijenata ocenjena sa 2+. Od 11 pacijenata prekomerna proteinska ekspresija je nađena kod 8 muškaraca i 3 žene, a vrednost p ( $p=0,535$ ) dobijena pomoću Fisher-ovog neparametarskog testa pokazuje da nema statistički značajne razlike u distribuciji proteinske ekspresije u odnosu na pol, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (272).

Većinu pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora (72,7%) su činili pušači, bivših pušača je bilo 27,3%. U grupi pacijenata nepušača nije dobijena pozitivna ekspresija HER2 receptora. Fisher-ovim neparametarskim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodeli pozitivne i negativne proteinske ekspresije u odnosu na pušačke navike ( $p=0,713$ ). Sličnu procentualnu zastupljenost između pušača i nepušača (75%:25%) zabeležili su *Ilievska Poposka i sarad.* (264), dok su drugačiju raspodelu 72,7% prema 27,3% u korist nepušača zabeležili *Li i sarad.* (272).

U odnosu na starosne grupe, pozitivna ekspresija HER2 receptora se najčešće javljala kod pacijenata 61-70 godina starosti. Nije dokazana statistički značajna razlika u raspodeli pacijenata sa pozitivnom i negativnom ekspresijom HER2 receptora u odnosu na starosne grupe ( $p$  vrednost Fisher-ovog testa je bila 0,562), što je u skladu sa rezultatima drugih studija (264, 272).

Kada smo analizirali odnos proteinske ekspresije HER2 receptora za HercepTest Dako prema karakteristikama primarnog tumora koristeći Fisher-ov neparametarski test ( $p=0,7$ ) nismo dobili statistički značajnu razliku u raspodeli proteinske ekspresije HER2 receptora u odnosu na klase veličine tumora. U našoj studiji najčešće pozitivna proteinska ekspresija HER2 receptora je nađena u klasi veličine tumora III (31-50 mm). Naši rezultati se poklapaju sa objavljenom srednjom veličinom tumora od 37 mm u studijama drugih autora (285).

Infiltracija pleure je bila prisutna kod samo 2 od ukupno 11 pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora dobijene pomoću HercepTest Dako, dok infiltracija okolnih struktura nije nađena. *Kim i sarad.* su u svojoj studiji evidentirali veći broj pacijenata sa infiltracijom pleure (4/6) (285).

Najveći broj pacijenata je imalo T2a deskriptor tumora. Slične rezultate dobili su i drugi autori (206). Analizirajući podatke u našoj studiji nismo dobili statistički značajnu

povezanost ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću HercepTest Dako i T deskriptora (p vrednost Fisher-ovog testa iznosi 0,993).

Od ukupno 11 pacijenata sa HER2 pozitivnim statusom, 9 pacijenata je bilo bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N0), 2 pacijenta su bila u N1 deskriptoru. Primenom Fisher-ovog testa dobijena je p vrednost 0,584, što ukazuje da ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije HER2 receptora i N deskriptora. Slično našim rezultatima, *Grob i sarad.* su prijavili najčešće pozitivnu ekspresiju HER2 receptora u N0 deskriptoru, a zatim u N2 deskriptoru, dok su N1 i N3 deskriptori bili minimalno zastupljeni (206).

Kod svih analiziranih pacijenata u našoj studiji sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora nisu nađene udaljene metastaze, što se podudara sa rezultatima drugih autora (206), a vrednost p ( $p=0,499$ ) dobijena upotrebom Fisher-ovog testa pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji HER2 receptora u odnosu na M deskriptor.

U našem uzorku najveći broj pacijenata sa povećanom ekspresijom HER2 receptora dobijene pomoću HercepTest Dako se nalazio u IB stadijumu bolesti (2,7% od ukupnog uzorka). Raspodela pacijenata sa pozitivnom ekspresijom je bila ista u IA, IIA i IIIA stadijumima, a Fisher-ov neparametarski test nije pokazao statistički značajnu povezanost između ekspresije HER2 receptora i patoloških stadijuma bolesti ( $p=0,543$ ). Suprotno našim rezultatim *Tateishi i sarad.* su zabeležili najveći broj pacijenata u stadijumu III i IV, što govori o lošijoj prognozi ovih pacijenata (224). Slične rezultate su naveli *Osaki i sarad.* kod kojih je najzastupljeniji bio IIIB stadijum (234). Studija u kojoj su stadijumi I i II bili zastupljeniji u odnosu na stadijum III i IV, kao i kod naših pacijenata, objavili su *Suzuki i sarad.* u analizi 1275 NSCLC od kojih je bilo 1055 adenokarcinoma (203).

Prisustvo prekomerne ekspresije HER2 proteina dobijene pomoću HercepTest Dako je bila češća kod solidnih (45,5%) i acinarnih (36,4%), nego kod papilarnih (9,1%) i mikropapilarnih (9,1%) tipova adenokarcinoma. Kod lepidičnih i enteričnih slučajeva adenokarcinoma nije nađena prekomerna ekspresija HER2 receptora. *Kim i sarad.* su dobili najveću prekomernu proteinsku ekspresiju HER2 receptora kod papilarno predominantnog adenokarcinoma (50%), drugi po učestalosti je bio acinarni (33,3%), treći mucinozni (16,7%), dok su ostali tipovi bili bez prekomerne ekspresije (285). *Li* je objavio najveću zastupljenost prekomerne proteinske ekspresije kod acinarnog tipa (38,5%), zatim papilarnog (23,1%) i solidnog tipa (15,4%), dok su ostali tipovi bili zastupljeni u malim procentima (272). Upoređujući naše podatke sa podacima drugih autora možemo zaključiti da je procentualna zastupljenost pozitivne ekspresije HER2 receptora određene upotrebom HercepTest Dako slična kada je acinarni tip adenokarcinoma u pitanju. Za razliku od drugih autora gde je papilarni tip adenokarcinoma bio često praćen povećanom ekspresijom HER2 receptora, u našoj studiji povećana ekspresija HER2 receptora je najčešće pratila solidni tip adenokarcinoma. Kada su u pitanju mikropapilarni, lepidični i enterični tip, naši podaci ne odstupaju od rezultata drugih autora, odnosno ovi tipovi su retko praćeni prekomernom proteinskom ekspresijom HER2 receptora.

Nakon analize rezultata proteinske ekspresije HER2 receptora korišćenjem HercepTest Dako uporedili smo rezultate dobijene drugim antitelom (Ventana anti-HER2/neu (4B5)) sa kliničkim karakteristikama pacijenata i sa karakteristikama tumora. Od ukupno 148 pacijenata pozitivnu ekspresiju smo našli kod 4 pacijenta (2,7%), kod 1 pacijenta ocenjenu sa 1+ i kod 3 pacijenta ocenjenu sa 2+. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora nađena je kod 3 pacijenta muškog pola i 1 pacijenta ženskog pola, a vrednost p ( $p=1$ ) dobijena pomoću Fisher-ovog neparametarskog testa ukazaala je na sličnost u raspodeli između polova, što su potvrdile i druge studije (203, 285).

Upoređivanjem pozitivne ekspresije sa pušačkim navikama 3 pacijenata su bili aktivni pušači i 1 pacijent je bio bivši pušač. Naši rezultati su slični sa rezultatima drugih autora (203, 285), i pokazuju da ne postoji značajna povezanost pozitivne ekspresije sa pušačkim navikama ( $p=0,1$  dobijena Fisher-ovim neparametarskim testom).

U odnosu na starosne grupe, pozitivna ekspresija HER2 receptora se najčešće javljala kod pacijenata 61-70 godina starosti, bez statistički značajne razlike u raspodeli pacijenata sa pozitivnom i negativnom ekspresijom HER2 receptora po starosnim grupama ( $p$  vrednost Fisher-ovog testa je bila 0,611). Slične podatke su objavili i drugi autori, 66,7% pacijenata sa pozitivnom ekspresijom je bilo starosti preko 62 godine (285), odnosno prosečna starost pacijenata sa pozitivnom ekspresijom je bila 62,7 godina (203).

Nakon kliničkih karakteristika pacijenata uporedili smo pozitivnu ekspresiju HER2 receptora dobijenu pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela sa karakteristikama tumora.

Pozitivna ekspresija je bila najfrekventnija u okviru klase III (31-50 mm) sa sličnom raspodelom po klasama veličine tumora (Fisher-ov neparametarski test,  $p=0,891$ ), odnosno ne postoji statistički značajna razlika u raspodeli pozitivne ekspresije HER2 receptora određene ovom metodom u odnosu na klase veličine tumora. Rezultati drugih autora su slični i ukazuju da je pozitivna ekspresija HER2 receptora najčešća kod tumora prosečne veličine 37 mm (203).

U našem uzorku samo kod jednog pacijenta sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora smo našli infiltraciju pleure (25%), dok infiltracija okolnih struktura nije nađena. *Kim i sarad.* su našli češću zastupljenost infiltracije pleure (kod 4 od 6 pacijenata) (285).

U rezultatima našeg istraživanja upotrebom Fisher-ovog neparametarskog testa dobijena je vrednost  $p=1$ , što ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji pacijenata sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora (dobijenom upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela) u odnosu na T deskriptor. Slične rezultate su objavili *Kobyakov i sarad.* (305).

Da ne postoji statistički značajna povezanost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora sa N deskriptorom dokazali smo upotrebom Fisher-ovog testa ( $p=0,596$ ). Najveći broj pacijenata (3 od 4 pacijenta) sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora je bio bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima (N0), dok se 1 pacijent nalazio u N2 deskriptoru. Suprotno našim rezultatima, rezultati drugih autora pokazuju da je većina pacijenata sa pozitivnom

ekspresijom HER2 receptora imala metastaze u regionalnim limfnim nodusima. *Suzuki* je objavio da je kod 53,3% pacijenata sa povećanom ekspresijom HER2 receptora imalo metastaze u regionalnim limfnim nodusima (203), dok je u studiji *Kima i sarad.* taj procenat bio 66,7% (285). *Kobyakov* je u studiji koja je obuhvatila 218 karcinoma pluća dokazao povezanost između povećane proteinske ekspresije HER2 receptora sa metastazama u limfnim čvorovima (305). Slične rezultate je objavio i *Suzuki sa sarad.* 2015. godine (203).

Kada je u pitanju M deskriptor svi pacijenti u našoj studiji sa pozitivnom ekspresijom HER2 receptora nisu imali udaljene metastaze, odnosno nije dokazana statistički značajna povezanost ekspresije HER2 receptora i M deskriptora (p vrednost Fisher-ovog testa iznosila je 1), što je u skladu sa rezultatima i drugih autora (206).

Raspodela pacijenata sa pozitivnom ekspresijom je bila ista u IA, IB, IIB i IIIA stadijumima. Fisher-ovim neparametarskim testom nismo dobili statistički značajnu povezanost između ekspresije HER2 receptora i stadijuma bolesti (p=0,861). Slična distribucija pozitivne ekspresije po stadijumima bolesti je zabeležena i u drugim studijama (203, 285). *Suzuki i sarad.* su dokazali povezanost između povećane proteinske ekspresije HER2 receptora (dobijene upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela) i višeg stadijuma bolesti (36,7%, p=0,031) (203).

Prisustvo pozitivne ekspresije HER2 proteina koja je dobijena pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5), nađeno je kod acinarnog (75%) i solidnog (25%) tipa. *Kim i sarad.* su u studiji sa uzorkom od 321 adenokarcinoma, najčešće proteinsku ekspresiju HER2 receptora našli kod papilarnih karcinoma (50%), što se razlikuje u odnosu na naše rezultate gde papilarno predominantni tumori nisu pokazali povećanu ekspresiju HER2 receptora. U istoj studiji acinarni tip je bio zastupljen u svega 33,3% (drugi najčešći histološki tip), što je značajno manja procentualna zastupljenost nego u našoj studiji (285). *Li i sarad.* su objavili najčešću pozitivnu ekspresiju HER2 receptora kod acinarno predominantnog tipa (38,5%), što je procentualno manje, ali predstavlja najzastupljeniji histološki tip kao i u našoj studiji. Na drugom mestu po učestalosti objavljuju papilarno predominantni tip (23,1%). U našoj studiji u slučajevima papilarnog tipa nismo našli prekomernu proteinsku ekspresiju HER2 receptora. Solidni tip je u njihovoj studiji bio praćen povećanom ekspresijom HER2 receptora u 15,4% slučajeva, što je slično našim rezultatima (272). Da ne postoji povezanost između povećane proteinske ekspresije HER2 receptora (dobijene upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela) i predominantnog histološkog tipa adenokarcinoma objavili su *Suzuki i sarad.* (203).

Upoređivanjem dobijenih rezultata povećane tj. pozitivne proteinske ekspresije HER2 receptora korišćenjem antitela HercepTest Dako i rezultata dobijenih korišćenjem antitela Ventana anti-HER2/neu (4B5) utvrđeno je preklapanje samo u 3 slučaja, što je 2% od ukupnog uzorka. Kada je u pitanju negativna proteinska ekspresija HER2 receptora, ova dva antitela su se preklapala u 136 slučajeva (91,9%). U našem istraživanju veći broj pacijenata (11) je pokazao povećanu proteinsku ekspresiju HER2 receptora upotrebom Hercep Test Dako u odnosu na svega 4 pacijenta kod kojih je nađena povećana proteinska ekspresija



upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela. Analizirajući procentualnu zastupljenost povećane proteinske ekspresije HER2 receptora kod adenokarcinoma pluća u studijama koje su koristile HercepTest Dako i studijama koje su koristile Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitelo, uočili smo veću procentualnu zastupljenost kod upotrebe Hercep Testa Dako u odnosu na Ventanino antitelo, što je slučaj i u našoj studiji (203, 206, 267, 285, 304, 305). Upotrebom neparametarskog Fisher-ovog testa, dobijena vrednost  $p=0,001$  ukazuje na visoku statističku povezanost rezultata dobijenih primenom ova dva antitela. Ukupna podudarnost između ova dva antitela iznosi 93,9%. Koeficijent korelacije Phi za nominalne vrednosti iznosio je 0,429 čime je dokazana srednje jaka korelacija između HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela.

Prisustvo amplifikacije HER2 gena pomoću in situ hibridizacije (ISH) (Dual IHC HER2 kit; Ventana Medical Systems) testirano je kod svih 148 pacijenata. Amplifikacija je bila prisutna kod 26 pacijenata (17,6%), od toga je kod 4 pacijenata bila prisutna *high grade* amplifikacija (2,7%). Prema objavljenim podacima učestalost amplifikacije HER2 gena kreće se u rasponu od 10-20% kod NSCLC (196- 202), pri čemu je *high grade* amplifikacija retka i čini svega 1-5% (306-309). *Kim i sarad.* su objavili učestalost amplifikacije od 14,3% u uzorku od 321 adenokarcinoma, sa *high grade* amplifikacijom od 1,6% (285). *Kobyakov* je evidentirao amplifikaciju HER2 gena kod 16,6% adenokarcinoma, sa *high grade* amplifikacijom od 2% (305). Rezultati amplifikacije u našem uzorku se slažu sa objavljenim podacima drugih autora.

Vrednost  $p$  ( $p=0,336$ ) dobijena pomoću  $\chi^2$  neparametarskog testa ukazuje na statistički značajnu povezanost pola i amplifikacije HER2 gena. U našem uzorku je bilo 24 muškarca i 12 žena sa amplifikacijom HER2 gena, a ravnomernu raspodelu među polovima beleže i drugi autori (203, 285).

Fisher-ovim neparametarskim testom nije utvrđena statistički značajna povezanost između pušačkih navika i amplifikacije HER2 gena ( $p=1$ ). Od ukupnog broja pacijenata sa postojanjem amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH, 20 pacijenata su bili aktivni pušači (77%), 5 pacijenata su bili bivši pušači (19,2%), dok je samo jedan pacijent bio nepušač (3,8%). Naši podaci pokazuju amplifikaciju kod pušača i bivših pušača, dok je kod nepušača amplifikacija bila minimalno zastupljena, što se razlikuje u odnosu na podatke iz literature. U literaturi je približno podjednaka zastupljenost amplifikacije HER2 gena kod pušača i nepušača. *Kim i sarad.* su zabeležili nešto veću procentualnu zastupljenost amplifikacije HER2 gena kod nepušača (58,7%) nego kod pušača i bivših pušača zajedno (41,3%) (285). *Suzuki i sarad.* su u svom istraživanju objavili procentualno nešto veću amplifikaciju HER2 gena kod pušača i bivših pušača (52,7%) u odnosu na nepušače (47,3%) (203).

U našoj studiji amplifikacija HER2 gena je bila najčešća u starosnim grupama od 51-60 godina i 61-70 godina starosti (14,9% od ukupnog uzorka). Nije dokazana statistički značajna razlika u raspodeli pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena po starosnim grupama ( $p$  vrednost Fisher-ovog testa je bila 0,615), što se podudara sa drugim studijama (203, 285).

Upoređivanjem amplifikacije HER2 gena sa karakteristikama primarnog tumora, zabeležili smo sledeće rezultate. Raspodela amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH po klasama veličine tumora je bila slična (Fisher-ov neparametarski test,  $p=0,452$ ). Amplifikacija je bila najčešća u okviru klase IV (preko 50 mm). U objavljenim naučnim radovima veći procenat pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena je kod veličine tumora manje od 30 mm (285) sa srednjom veličinom tumora od 29 mm (203).

Infiltracija pleure kod naših pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena nađena je kod 6 od ukupno 26 slučajeva (23,1%), dok je infiltracija okolnih struktura nađena kod 1 pacijenta (3,8%). *Kim i sarad.* su dokazali povezanost amplifikacije HER2 gena sa infiltracijom pleure (54,3% pacijenata sa amplifikacijom HER2 gena je imalo infiltraciju pleure) (285).

Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa nismo dobili statistički značajnu povezanost između amplifikacije HER2 gena i patološkog T deskriptora ( $p=0,832$ ). Amplifikacija HER2 gena kod naših pacijenata je bila najčešća u pT2a deskriptoru (53,8%). Slične rezultate su dobili *Grob i sarad.* u svojoj studiji, gde je amplifikacija HER2 gena bila prisutna najčešće u pT2a deskriptoru (64,7%) (206).

Analizirajući amplifikaciju HER2 gena sa N deskriptorom nismo dobili statistički značajnu povezanost ( $p$  vrednost Fisher-ovog testa iznosi 0,48). Najveći broj pacijenata (65,4%) sa amplifikacijom HER2 gena je bio bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima. U N1 i N2 deskriptoru se nalazilo ukupno 8 pacijenata, dok je samo jedan pacijent bio u N3 deskriptoru tumora. Slične rezultate su dobili i drugi autori, u čijim radovima je najveći broj pacijenata bio u N0 deskriptoru i to 56,5% slučajeva (285), odnosno 66,1% (203).

Primenom Fisher-ovog testa i dobijene vrednosti  $p=0,393$  nismo dokazali statistički značajnu povezanost između amplifikacije HER2 gena i M deskriptora. Najveći broj pacijenata (23) sa amplifikacijom HER2 gena je bio bez udaljenih metastaza (15,5% od ukupnog uzorka). Naši rezultati se podudaraju sa rezultatima drugih studija u kojima je amplifikacija HER2 gena najčešće bila praćena odsustvom udaljenih metastaza (206).

U našem uzorku pacijenti sa amplifikacijom HER2 gena su približno slično raspoređeni u odnosu na patološki stadijum bolesti, a primenom Fisher-ovog neparametarskog testa nismo dobili statistički značajnu povezanost između genske amplifikacije i patoloških stadijuma bolesti ( $p=0,684$ ). Ovu korelaciju su potvrdile i druge studije (203, 285, 305).

U našoj studiji prisustvo HER2 genske amplifikacije je bilo češće kod solidnih (42,3%), acinarnih (27%) i papilarnih (23%) tipova u odnosu na mikropapilarni tip (7,7%). U grupi lepidičnog i enteričnog tipa adenokarcinoma nije nađena amplifikacija. *Kim sa sarad.* je amplifikaciju HER2 gena u najvećem broju slučajeva zabeležio kod predominantno acinarnih adenokarcinoma (58,7%), zatim papilarnih (15,2%), mikropapilarnih (13%), solidnih (8,7%), dok je najređe amplifikacija bila zastupljena kod lepidičnih adenokarcinoma (4,3%) (285). Za razliku od drugih autora, u našoj studiji solidni tip adenokarcinoma je najčešće bio praćen amplifikacijom HER2 gena.

Analizirajući amplifikaciju HER2 gena kod uzoraka kod kojih je povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena korišćenjem HercepTest Dako uočili smo sledeću povezanost. Prisustvo HER2 genske amplifikacije se podudara sa povećanom proteinskom ekspresijom HER2 receptora dobijenog pomoću HercepTest Dako kod 10 (90,9%) od ukupno 11 pacijenta sa prekomernom proteinskom ekspresijom HER2 receptora. Sa druge strane negativan status HER2 genske amplifikacije se slaže sa odsustvom prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću HercepTest Dako kod 121 (81,8%) pacijenta u ukupnom uzorku. Pomoću Fisher-ovog neparametarskog testa utvrđena je povezanost amplifikacije HER2 gena utvrđene sa “Dual ISH HER2 kit;Ventana Medical Systems” i ekspresije HER2 receptora dobijenog uz pomoć HercepTest Dako ( $p < 0,001$ ). Vrednost koeficijenta Phi ukazuje na jaku povezanost rezultata dobijenih pomoću ova dva testa ( $\Phi = 0,546$ ). Značajnu povezanost između amplifikacije HER2 gena i ekspresije HER2 receptora dobijene korišćenjem HercepTest Dako zabeležili su i drugi autori (206, 267). *Yoshizawa i sarad* su u uzorku od 243 adenokarcinoma pluća koristeći Hercep Test Dako, kod 37 pacijenata dobili prekomernu proteinsku ekspresiju HER2 receptora (ocenjenu sa 2+ i 3+), od toga je kod 4 pacijenta koristeći “Dual ISH, Ventana Medical Systems” nađena amplifikacija HER2 gena (267). U našem uzorku je znatno veće podudaranje između prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora (HercepTest Dako) i genske amplifikacije (10/11) nego u drugim studijama 4/37 (267), 2/16 (304).

Upoređujući prisustvo HER2 genske amplifikacije i prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) u našem uzorku, uočen je pozitivan nalaz kod 3 od 4 pacijenta (75%). Odsustvo amplifikacije HER2 gena je uočeno kod 81,8% pacijenata iz ukupnog uzorka koji nemaju povećanu proteinsku ekspresiju HER2 receptora. Primenom Fisher-ovog neparametarskog testa dobili smo statistički značajnu povezanost između amplifikacije HER2 gena i proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela ( $p = 0,017$ ). Vrednost koeficijenta Phi ukazuje na malu povezanost rezultata dobijenih pomoću ova dva testa ( $\Phi = 0,252$ ). Povezanost između amplifikacije i proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela objavili su i drugi autori (203, 285, 267, 310), dok su rezultati nekih autora negirali ovu povezanost (308). *Kim i sarad.* su u studiji koja je ispitivala klinički značaj HER2 alteracija kod adenokarcinoma pluća koristili istu metodologiju za određivanje amplifikacije i ekspresije HER2 receptora (Dual ISH, Ventana Medical Systems; Ventana anti-HER2/neu (4B5)). Od 321 pacijenta sa adenokarcinomom pluća kod 25 pacijenata su našli prekomernu ekspresiju HER2 receptora, od toga je amplifikacija gena bila prisutna kod 11 pacijenata (44%). Odsustvo amplifikacije HER2 gena i povećane ekspresije HER2 receptora su detektovali kod 81,3% pacijenata iz ukupnog uzorka. Oni su dokazali statistički značajnu povezanost između proteinske ekspresije HER2 receptora i genske amplifikacije, ali sa malim stepenom povezanosti. U našem uzorku je znato veće preklapanje između prekomerne proteinske ekspresije i genske amplifikacije (3/4) u odnosu na rezultate drugih studija 11/25. U našoj studiji kao i u rezultatima drugih autora, amplifikacija HER2 gena je češće detektovana u odnosu na proteinsku ekspresiju HER2 receptora (285).

Podudaranje prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako, prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i prisutne amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću Dual ISH je nađeno kod 3 pacijenta, što predstavlja 2% od ukupnog uzorka. Podudaranje odsustva prekomerne proteinske ekspresije HER2 receptora utvrđene pomoću HercepTest Dako, zatim pomoću Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i odsustva amplifikacije HER2 gena utvrđene pomoću DISH-a je nađeno kod 120 pacijenata, što predstavlja 81,1% od ukupnog uzorka. Sva tri analizirana testa za određivanje HER2 statusa na osnovu naše studije u 83,1% slučajeva daju identične rezultate.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora u adenokarcinomu pluća iznosi 7,4% za Hercep Test Dako i 2,7% za Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitelo. Kod pozitivne ekspresije slažu se u 2%, dok se kod negativne ekspresije slažu u 91,9% slučajeva, što je ukupno 93,9%.
2. Učestalost amplifikacije HER2 gena kod adenokarcinoma pluća je 17,6%, od toga je kod 2,7% slučajeva prisutna *high grade* amplifikacija.
3. Postoji statistički značajna povezanost između povećane proteinske ekspresije HER2 receptora dobijene upotrebom HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i amplifikacije HER2 gena. Amplifikacija HER2 gena prisutna je kod 90,9% pacijenata sa povećanom proteinskom ekspresijom HER2 receptora koja se dobije upotrebom HercepTest Dako i kod 75% upotrebom Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela.
4. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena pomoću HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela je najčešća kod solidnog predominantnog tipa adenokarcinoma u patološkom T2a deskriptoru i IB stadijumu i acinarnog predominantnog tipa adenokarcinoma u patološkom T1b deskriptoru i IA stadijumu.
5. Amplifikacija HER2 gena je najčešća kod solidnog a zatim kod acinarnog i papilarnog predominantnog tipa adenokarcinoma.
6. Povećana proteinska ekspresija HER2 receptora dobijena pomoću HercepTest Dako i Ventana anti-HER2/neu (4B5) antitela i amplifikacija HER2 gena se najčešće javljaju kod muškaraca, pušača, u starosnoj dobi od 61-70 godina, tumora veličine 31-50 mm, N0 i M0 statusu bolesti, bez prisustva tumorske infiltracije pleure i okolnih struktura.

## 8. PRILOG

### PROTOKOL ZA ISPITANIK (Prilog br.1)

**Ime i prezime:**

**Pol:** 1. muški 2. ženski

**Datum rođenja:**

**Pušački status:** 1. aktivan pušač 2. bivši pušač 3. nepušač

**Datum operacije:**

**Veličina tumora:**

**Histološki tip adenokarcinoma:**

**Infiltracija pleure:** 1. Da 2. Ne

**Infiltracija okolnih struktura:** 1. Da 2. Ne

**Broj i grupa limfnih čvorova zahvaćenih metastazama:**

**Prisustvo lokalnih metastaza u plućnom parenhimu sa iste i sa kontralateralne strane:**

**Prisustvo udaljenih metastaza:**

**Patološki TNM (pTNM):**

**Patološki stadijum bolesti:**

## 9. LITERATURA

1. American Cancer Society [homepage on the Internet]. Cancer facts and figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014 [cited 2017 May 23]. Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2014.html>.
2. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol*. 1995;26(8):873-9.
3. Henley JS, Richards TB, Underwood MJ, Ehemann CR, Plescia M, Timothy A, et al. Lung cancer incidence trends among men and women United States, 2005-2009. *MMWR*. 2014;63(1):1-5.
4. El-Basmy A. Profile of lung cancer in Kuwait. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(10):6181-4.
5. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
6. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):S29-55.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
8. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):605-44.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):359-86.
10. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002 [homepage on the Internet]. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide; 2004 [cited 2017 May 23]. Available from: [https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference\\_id/723902](https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/723902)
11. American Cancer Society [homepage on the Internet]. Cancer facts and figures 2004. Atlanta: American Cancer Society; 2004 [cited 2017 May 23]. Available from: <http://www.pink-ribbon-pins.com/CancerRates2004.pdf>
12. National Cancer Institute [homepage on the Internet]. SEER Cancer Statistics Review 1975–2008. Lifetime Risk (Percent) of Being Diagnosed with Cancer by Site and Race / Ethnicity: Males, 17 SEER Areas, 2006–2008 [cited 2016 Jul 2]. Available at: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008/results\\_merged/topic\\_lifetime\\_risk\\_diagnosis.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/results_merged/topic_lifetime_risk_diagnosis.pdf). Accessed October 15, 2012.
13. Youlten DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol*. 2008;3(8):819–31.
14. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006;24(14):2137–50.
15. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. *Lung Cancer*. 2001;31(2–3):123–37.
16. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer*. 2005;117(2):294–9.
17. Chen K, Wang PP, Sun B, Li Q, Perruccio A, Power D, et al. Twenty-year secular changes in sex specific lung cancer incidence rates in an urban Chinese population. *Lung Cancer*. 2006;51(1):13–9.
18. Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970–2000. *Ann Oncol*. 2005;16(3):489–511.
19. Lam WK, White NW, Chan-Yeung MM. Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(9):1045–57.

20. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):212–36.
21. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Ehemann C, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(9):1–23.
22. Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut"; 2014.
23. Đorđević MĐ, Mitrović NM. Maligna oboljenja u Srbiji krajem XX veka: istine i zablude. Beograd: Institut za onkologiju i radiologiju Srbije; 1995. p. 85.
24. Petrović V, Miladinov-Mikov M, Dugandžija T. Topographical analyses of lung cancer incidence and mortality in Vojvodina. *Arch Oncol*. 2010;18(3):71-4.
25. American Cancer Society [homepage on the Internet]. Cancer facts and figures 2012. Atlanta: American Cancer Society; 2012 [cited 2017 May 23]. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>
26. Adler I. Primary malignant growths of the lungs and bronchi. New York: Longmans, Green; 1912.
27. Kelley MJ, McCrory DC. Prevention of lung cancer: summary of published evidence. *Chest*. 2003;123(Suppl 1):S50–9.
28. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje karcinoma pluća. Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova; 2012.
29. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*. 2000;321(7257):323–9.
30. Department of Health and Human Services [homepage on the Internet]. The health benefits of smoking cessation: a report of the surgeon general. Washington: US DHHS; 1990 [cited 2017 May 23]. Available from: <https://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/nbbbcv.pdf>
31. Goodman GE. Prevention of lung cancer. *Crit Rev Oncol Hemat*. 2000;33(3):187–97.
32. Dragnev H, Stover D, Dmitrovsky E. Lung cancer prevention: the guidelines. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):S60–71.
33. Kelloff GJ, Sigman CC, Greenwald P. Cancer chemoprevention: progress and promise. *Eur J Cancer*. 1999;35(14):2031-8.
34. Keith RL. Chemoprevention of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(2):187–93.
35. Omenn GS. Chemoprevention of lung cancer is proving difficult and frustrating, requiring new approaches. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(12):959–60.
36. National Comprehensive Cancer Network [homepage on the Internet]. Non-small cell lung cancer. Washington: Commerce Drive; 2011 [cited 2017 May 23]. Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx)
37. Manser R, Lethaby A, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson MJ, et al. Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(6):CD001991.
38. Warner KE, Mendez D. Tobacco control policy in developed countries: yesterday, today, and tomorrow. *Nicotine Tob Res*. 2010;12(9):876–87.
39. Pear R. Tobacco smoking and longevity. *Science*. 1938;87(2253):216–7.
40. Levin ML, Goldstein H, Gerhardt PR. Cancer and tobacco smoking: a preliminary report. *J Am Med Assoc*. 1950;143(4):336–8.
41. Wynder EL, Graham EA. Etiologic factors in bronchiogenic carcinoma with special reference to industrial exposures; report of eight hundred fifty-seven proved cases. *AMA Arch Ind Hyg Occup Med*. 1951;4(3):221–35.
42. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315(7114):980–8.
43. Whitrow MJ, Smith BJ, Pilotto LS, Pisaniello D, Nitschke M. Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature. *Respirology*. 2003;8(4):513–21.



44. Vineis P, Airoidi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ*. 2005;330(7486):277.
45. Ilić D, Kilibarda B, Nikolić N. Rezultati istraživanja o efektima i stavovima u vezi sa Zakonom o zaštiti stanovništva od izloženosti duvanskom dimu. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut"; 2017.
46. Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ. "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(4):371–83.
47. Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ. "IARC group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(9):825–48.
48. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21(48):7435–51.
49. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(2):99–106.
50. Hoffmann D, Djordjevic MV, Rivenson A, Zang E, Desai D, Amin S. A study of tobacco carcinogenesis. II. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumours in A/J mice. *Cancer Lett*. 1993;71(1–3):25–30.
51. Belinsky SA, Devereux TR, Maronpot RR, Stoner GD, Anderson MW. Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines. *Cancer Res*. 1989;49(19):5305–11.
52. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res*. 1992;52(Suppl 9):S2665–6.
53. Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, 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(2):432–8.
54. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*. 1996;274(5286):430–2.
55. Harris JE, Thun MJ, Mondul AM, Calle EE. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982–8. *BMJ*. 2004;328(7431):72.
56. Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, Laszlo J. Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*. 1984;44(12 Pt 1):5940–58.
57. Samet JM, Eradze GR. Radon and lung cancer risk: taking stock at the millenium. *Environ Health Perspect*. 2000;108(Suppl 4):635–41.
58. Samet JM. Residential radon and lung cancer: end of the story? *J Toxicol Environ Health A*. 2006;69(7):527–31.
59. Grosche B, Kreuzer M, Kreisheimer M, Schnelzer M, Tschense A. Lung cancer risk among German male uranium miners: a cohort study, 1946–1998. *Br J Cancer*. 2006;95(9):1280–7.
60. Lubin JH, Boice JD Jr, Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, et al. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(11):817–27.
61. Pawel DJ, Puskin JS. The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon. *Health Phys*. 2004;87(1):68–74.
62. Pershagen G, Akerblom G, Axelson O, Clavensjö B, Damber L, Desai G, et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden. *N Engl J Med*. 1994;330(3):159–64.
63. Schoenberg JB, Klotz JB, Wilcox HB, Nicholls GP, Gil-del-Real MT, Stemhagen A, et al. Case-control study of residential radon and lung cancer among New Jersey women. *Cancer Res*. 1990;50(20):6520–4.

64. Barros-Dios JM, Barreiro MA, Ruano-Ravina A, Figueiras A. Exposure to residential radon and lung cancer in Spain: a population based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2002;156(6):548–55.
65. Cassidy A, Myles JP, van Tongeren M, Page RD, Liloglou T, Duffy SW, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer.* 2008;98(2):270–6.
66. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer.* 2005;93(7):825–33.
67. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):460–74.
68. Kharazmi E, Fallah M, Sundquist K, Hemminki K. Familial risk of early and late onset cancer: nationwide prospective cohort study. *BMJ.* 2012;345:e8076.
69. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböller H, Rosenberger A, McCormack V, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol.* 2012;176(7):573–85.
70. Li X, Hemminki K. Inherited predisposition to early onset lung cancer according to histological type. *Int J Cancer.* 2004;112(3):451–7.
71. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet.* 2008;40(5):616–22.
72. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med.* 2005;26(6):459–516.
73. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Freire-Garabal M, Barros-Dios JM. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Curr Pharm Des.* 2006;12(5):599–613.
74. Lam WK. Lung cancer in Asian women-the environment and genes. *Respirology.* 2005;10(4):408–17.
75. Siems W, Wiswedel I, Salerno C, Crifò C, Augustin W, Schild L, et al.  $\beta$ -carotene breakdown products may impair mitochondrial functions - potential side effects of high-dose  $\beta$ -carotene supplementation. *J Nutr Biochem.* 2005;16(7):385–97.
76. Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.* 1990;50(1):2–9.
77. Woodson K, Tangrea JA, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Serum alpha-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(20):1738–43.
78. Buring JE, Hennekens CH. Beta-carotene and cancer chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl.* 1995;22:226–30.
79. Swanson CA, Brown CC, Sinha R, Kulldorff M, Brownson RC, Alavanja MC. Dietary fats and lung cancer risk among women: the Missouri Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control.* 1997;8(6):883–93.
80. Alavanja MC, Brownson RC, Benichou J. Estimating the effect of dietary fat on the risk of lung cancer in nonsmoking women. *Lung Cancer.* 1996;14(Suppl 1):S63–74.
81. De Stefani E, Fontham ET, Chen V, Correa P, Deneo-Pellegrini H, Ronco A, et al. Fatty foods and the risk of lung cancer: a case-control study from Uruguay. *Int J Cancer.* 1997;71(5):760–6.
82. Goodman MT, Kolonel LN, Yoshizawa CN, Hankin JH. The effect of dietary cholesterol and fat on the risk of lung cancer in Hawaii. *Am J Epidemiol.* 1988;128(6):1241–55.
83. Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;216(2):181–91.
84. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Carzoglio JC, Ronco A, Menilaharsu M. Dietary nitrosodimethylamine and the risk of lung cancer: a case-control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(9):679–82.

85. Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, van den Brandt PA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(3):657–67.
86. Hughes JM, Weill H. Potency versus importance in fiber pathogenicity. *Am J Ind Med.* 1994;25(4):609–10.
87. Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med.* 1955;12(2):81–6.
88. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5 Pt 1):1666–80.
89. Kunzli N, Tager IB. Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med Wkly.* 2005;135(47–48):697–702.
90. Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis.* 2005;26(11):1846–55.
91. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res.* 2006;608(2):157–62.
92. Turner MC, Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun MJ. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(3):285–90.
93. Loganathan RS, Stover DE, Shi W, Venkatraman E. Prevalence of COPD in women compared to men around the time of diagnosis of primary lung cancer. *Chest.* 2006;129(5):1305–12.
94. Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J.* 2009;34(2):380–6.
95. Yang P, Sun Z, Krowka MJ, Aubry MC, Bamlet WR, Wampfler JA, et al. Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. *Arch Intern Med.* 2008;168(10):1097–103.
96. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(1):5–8.
97. Le Jeune I, Gribbin J, West J, Smith C, Cullinan P, Hubbard R. The incidence of cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Respir Med.* 2007;101(12):2534–40.
98. Engels EA, Shen M, Chapman RS, Pfeiffer RM, Yu YY, He X, et al. Tuberculosis and subsequent risk of lung cancer in Xuanwei, China. *Int J Cancer.* 2009;124(5):1183–7.
99. Yu YH, Liao CC, Hsu WH, Chen HJ, Liao WC, Muo CH, et al. Increased lung cancer risk among patients with pulmonary tuberculosis: a population cohort study. *J Thorac Oncol.* 2011;6(1):32–7.
100. Hemminki K, Liu X, Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Effect of autoimmune diseases on risk and survival in histology-specific lung cancer. *Eur Respir J.* 2012;40(6):1489–95.
101. Willey JC, Broussoud A, Sleemi A, Bennett WP, Cerutti P, Harris CC. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18. *Cancer Res.* 1991;51(19):5370–7.
102. Brouchet L, Valmary S, Dahan M, Didier A, Galateau-Salle F, Brousset P, et al. Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer.* 2005;92(4):743–6.
103. Giuliani L, Jaxmar T, Casadio C, Gariglio M, Manna A, D'Antonio D, et al. Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2007;57(3):273–81.
104. Sion-Vardy N, Lasarov I, Delgado B, Gopas J, Benharroch D, Ariad S. Measles virus: evidence for association with lung cancer. *Exp Lung Res.* 2009;35(8):701–12.
105. Kirk GD, Merlo C, O' Driscoll P, Mehta SH, Galai N, Vlahov D, et al. HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clin Infect Dis.* 2007;45(1):103–10.
106. Klein F, Kotb AWF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer.* 2009;65(1):13–8.

107. Denholm R, Schüz J, Straif K, Stücker I, Jöckel KH, Brenner DR, et al. Is previous respiratory disease a risk factor for lung cancer? *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(5):549-59.
108. Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours.* 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2002.
109. Denoix PF. Tumor, node and metastasis (TNM). *Bull Inst Nat Hyg.* 1952;7:743.
110. Goldstraw P. *IASLC staging handbook in thoracic oncology.* 1st ed. Orange Park: Editorial Rx Press; 2009. p. 2.
111. Goldstraw P. *IASLC staging manual in thoracic oncology.* 1st ed. Orange Park: Editorial Rx Press; 2009.
112. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *UICC TNM classification of malignant tumours.* 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
113. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging handbook.* 7th ed. New York: Springer; 2010.
114. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2(7):593–602.
115. Travis WD, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the inclusion of carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008;3(11):1213–23.
116. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2(8):694–705.
117. Travis WD. Reporting lung cancer pathological specimens. Impact of the anticipated 7th Edition TNM Classification based on recommendation of the IASLC Staging Committee. *Histopathology.* 2009;54(1):3-11.
118. Vallières E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4(9):1049-59.
119. Bierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours.* 8th ed. Chichester: Wiley Blackwell; 2017.
120. Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2014;9(11):1618-24.
121. Rami-Porta R, Asamura H, Travis WD, Rusch VW. Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):138–55.
122. Travis WD, Brambilla E, Muller Hermelnik HK, Haris CC. *Tumours of the lung, pleura, thymus and heart.* Lyon: IARC Press; 2004.
123. Fletcher C. *Diagnostic histopathology of tumors.* 4th ed. London: Churchill Livingstone; 2013.
124. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart.* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2015.
125. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thoracic Oncol.* 2011;6(2):244–85.

126. Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima CS, Riely GJ, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(4):448–60.
127. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243–60.
128. Girard N, Deshpande C, Lau C, Finley D, Rusch V, Pao W, et al. Comprehensive histologic assessment helps to differentiate multiple lung primary nonsmall cell carcinomas from metastases. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(12):1752–64.
129. Kadota K, Nitadori J, Sima CS, Ujiie H, Rizk NP, Jones DR, et al. Tumor spread through air spaces is an important pattern of invasion and impacts the frequency and location of recurrences after limited resection for small stage I lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):806–14.
130. Warth A, Muley T, Kossakowski CA, Goeppert B, Schirmacher P, Dienemann H, et al. Prognostic impact of intraalveolar tumor spread in pulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(6):793–801.
131. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol.* 2013;8(1):52–61.
132. Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol.* 2012;30(13):1438–46.
133. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, et al. Proposal of an improved histological sub-typing system for lung adenocarcinoma - significant prognostic values for stage I disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010;3(4):348–66.
134. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ. Prognostic significance of the proposed IASLC/ATS/ERS revised classification of lung adenocarcinoma in 514 stage I lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2011;24(5):653–64.
135. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(8):1155–62.
136. Rossi G, Murer B, Cavazza A, Losi L, Natali P, Marchioni A, et al. Primary mucinous (so-called colloid) carcinomas of the lung: a clinicopathologic and immunohistochemical study with special reference to CDX-2 homeobox gene and MUC2 expression. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(4):442–52.
137. Gaeta M, Blandino A, Scribano E, Ascenti G, Minutoli F, Pandolfo I. Mucinous cystadenocarcinoma of the lung: CT-pathologic correlation in three cases. *J Comput Assist Tomogr.* 1999;23(4):641–3.
138. Gao ZH, Urbanski SJ. The spectrum of pulmonary mucinous cystic neoplasia: a clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases and review of literature. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(1):62–70.
139. Nakatani Y, Kitamura H, Inayama Y, Kamijo S, Nagashima Y, Shimoyama K, et al. Pulmonary adenocarcinomas of the fetal lung type: a clinicopathologic study indicating differences in histology, epidemiology, and natural history of low-grade and high-grade forms. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(4):399–411.
140. Sekine S, Shibata T, Matsuno Y, Maeshima A, Ishii G, Sakamoto M, et al. Beta-catenin mutations in pulmonary blastomas: association with morule formation. *J Pathol.* 2003;200(2):214–21.

141. Zhang J, Wu J, Tan Q, Zhu L, Gao W. Why do pathological stage IA lung adenocarcinomas vary from prognosis? A clinicopathologic study of 176 patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification. *J Thorac Oncol.* 2013;8(9):1196-202.
142. Inamura K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Fukayama M, et al. Pulmonary adenocarcinomas with enteric differentiation: histologic and immunohistochemical characteristics compared with metastatic colorectal cancers and usual pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(5):660-5.
143. Li HC, Schmidt L, Greenson JK, Chang AC, Myers JL. Primary pulmonary adenocarcinoma with intestinal differentiation mimicking metastatic colorectal carcinoma: case report and review of literature. *Am J Clin Pathol.* 2009;131(1):129-33.
144. Hatanaka K, Tsuta K, Watanabe K, Sugino K, Uekusa T. Primary pulmonary adenocarcinoma with enteric differentiation resembling metastatic colorectal carcinoma: a report of the second case negative for cytokeratin 7. *Pathol Res Pract.* 2011;207(3):188-91.
145. Yousem SA. Pulmonary intestinal-type adenocarcinoma does not show enteric differentiation by immunohistochemical study. *Mod Pathol.* 2005;18(6):816-21.
146. Geisinger KR, Stanley MW, Raab SS, Silverman JF, Atati A. Lung modern cytopathology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004. p. 399-432.
147. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, Friedlander MA, Riely GJ, Travis WD, et al. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):451-8.
148. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer.* 2012;76(1):1-18.
149. Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(1):22-31.
150. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 2011;24(10):1348-59.
151. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):442-7.
152. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, 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(4):436-41.
153. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS, Jagirdar J, Napsin A, a new marker for lung adenocarcinoma, is complementary and more sensitive and specific than thyroid transcription factor 1 in the differential diagnosis of primary pulmonary carcinoma: evaluation of 1674 cases by tissue microarray. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(2):163-71.
154. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(6):767-73.
155. Khayyata S, Yun S, Pasha T, Jian B, McGrath C, Yu G, et al. Value of P63 and CK5/6 in distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung fine-needle aspiration specimens. *Diagn Cytopathol.* 2009;37(3):178-83.
156. 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 CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(1):15-25.
157. 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(3):405-15.

158. Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, Maisonneuve P, Rossi G, Barbareschi M, 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(2):281–90.
159. Klempner SJ, Cohen DW, Costa DB. ALK translocation in non-small cell lung cancer with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma markers. *J Thorac Oncol.* 2011;6(8):1439–40.
160. Thunnissen E, Boers E, Heideman DA, Grünberg K, Kuik DJ, Noorduyn A, et al. 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.* 2012;461(6):629-38.
161. Rossi G, Pelosi G, Graziano P, Barbareschi M, Papotti M. A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non-small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int J Surg Pathol.* 2009;17(3):206–18.
162. Fatima N, Cohen C, Lawson D, Siddiqui MT. TTF-1 and napsin A double stain: a useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine-needle aspiration cell blocks. *Cancer Cytopathol.* 2011;119(2):127–33.
163. Suh J, Rekhtman N, Ladanyi M, Riely GJ, Travis WD. Testing of new IASLC/ATS/ERS criteria for diagnosis of lung adenocarcinoma (AD) in small biopsies: minimize immunohistochemistry (IHC) to maximize tissue for molecular studies. *Mod Pathol.* 2011;24(1):424.
164. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(5):668–84.
165. Štraus B. Genomska promjene i karcinogeneza. *Biochemia Medica.* 1995;5:1.
166. Atanacković M, Bacetić D, Basta-Jovanović G, Begić-Janeva A, Boričić I, Brašanac D, et al. *Patologija.* Beograd: Medicinski fakultet; 2003.
167. Budakov P, Eri Ž. *Patologija.* 6th ed. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2014.
168. Schmandt R, Mills GB. Genomic components of carcinogenesis. *Clin Chem.* 1993;39(11 Pt 2):2375-85.
169. Budakov P, Eri Ž. *Patologija.* Novi Sad: Medicinski fakultet; 2011.
170. Knudson AG. Genetics of human cancer. *Genetics.* 1975;79 Suppl:305-16.
171. Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J. Cancer and ageing in mice and men. *Br J Cancer.* 1975;32(4):411-26.
172. Raparia K, Villa C, De Camp MM, Patel JD, Mehta MP. Molecular profiling in non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(4):481–91.
173. de Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araujo AM. Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies. *World J Clin Oncol.* 2011;2(11):367–76.
174. Dacic S. Molecular diagnostics of lung carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):622–9.
175. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA.* 2014; 311(19):1998–2006.
176. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II, et al. Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: the lung cancer mutation consortium experience. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):768–77.
177. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S3-8.
178. Van de Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:251-337.

179. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997;410:83-6.
180. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer.* 2003;89(6):959-65.
181. Pi Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, et al. ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol.* 1998;18(10):6090-101.
182. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 1996;15(10):2452-67.
183. Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Alroy I, Levkowitz G, Lonai P, Yarden Y. Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene.* 1997;15(23):2803-15.
184. Tzahar E, Moyer JD, Waterman H, Barbacci EG, Bao J, Levkowitz G, et al. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J.* 1998;17(20):5948-63.
185. Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, et al. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.* 1997;16(16):4938-50.
186. Tzahar E, Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1377(1):M25-37.
187. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 1996;15(2):254-64.
188. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14661-5.
189. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. In: Klein G, Woude V, editors. *Advances in cancer research.* New York: Academic Press; 2000. p. 25-79.
190. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244(4905):707-12.
191. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene.* 1996;13(1):63-72.
192. Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet.* 1987;2(8550):69-72.
193. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(1):16-32.
194. Lorenzen S, Lordick F. How will human epidermal growth factor receptor 2-neu data impact clinical management of gastric cancer. *Curr Opin Oncol.* 2011;23(4):396-402.
195. Hirsch FR, Garcia MV, Franklin WA, Veve R, Chen L, Helfrich B, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer.* 2002;86(9):1449-56.
196. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 2004;431(7008):525-6.
197. Au NH, Cheang M, Huntsman DG, Yorlida E, Coldman A, Elliott WM, et al. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *J Pathol.* 2004;204(1):101-9.



198. Heinmoller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening forenrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res.* 2003;9(14):5238–43.
199. Buttitta F, Barassi F, Fresu G, Felicioni L, Chella A, Paolizzi D, et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2586–91.
200. Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, Cassani B, Miozzo M, Buttitta F, et al. HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3645–52.
201. Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C, Brouchet L, Milia J, Nicaise Y, et al. Characteristics of lung cancer in women: importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer.* 2012;76(3):280–5.
202. Langer CJ, Stephenson P, Thor A, Vangel M, Johnson DH. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group study 2598. *J Clin Oncol.* 2004;22(7):1180–7.
203. Suzuki M, Shiraishi K, Yoshida A, Shimada Y, Suzuki K, Asamura H, et al. HER2 gene mutations in non-small cell lung carcinomas: concurrence with her2 gene amplification and her2 protein expression and phosphorylation. *Lung Cancer.* 2015;87(1):14–22.
204. Perera SA, Li D, Shimamura T, Raso MG, Ji H, Chen L, et al. HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):474-9.
205. Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell.* 2006;10(1):25-38.
206. Grob T, Kannengiesser I, Tsourlakis M, Atanackovic Đ, Koenig A, Vashist Y, et al. Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2012;25(12):1566-73.
207. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, clinicopathologic associations and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):4910-8.
208. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2005;65(5):1642-6.
209. Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.* 2011;74(1):139-44.
210. Busmanis I, Feleppa F, Jones A, McGrath KM, Reed R, Collins J, et al. Analysis of cerbB2 expression using a panel of 6 commercially available antibodies. *Pathology.* 1994;26(3):261–7.
211. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res.* 1994;54(10):2771–7.
212. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan ST, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. *J Clin Pathol.* 2000;53(5):374–81.
213. Heinmoller P, Gross C, Beyser K, SchmidtgenC, Maass G, Pedrocchi M, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res.* 2003;9(14):5238–44.
214. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1467-72.

215. Bartlett JMS, Forsyth A. HER2 FISH in breast cancer. In: Roulston JE, Bartlett JMS, editors. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Totowa: Humana Press; 2004.
216. Isola T, Tanner M. Chromogenic in situ hybridization in tumor pathology. In: Roulston JE, Bartlett JMS, editors. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Totowa: Humana Press; 2004.
217. Sáez A, Andreu FJ, Seguí MA, Baré ML, Fernández S, Dinarés C, et al. HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridization (FISH) in breast cancer: a study of two hundred cases. *Breast*. 2006;15(4):519-27.
218. Marquez A, Wu R, Zhao T, Yu Y, Tao T, Shi Z. Detection of EGFR gene amplification and protein expression by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in a series of archival human cancers. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13:1-8.
219. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1467-72.
220. Kang J, Kwon GY, Lee YH, Gong G. Comparison of silver-enhanced in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for HER2 gene status in breast carcinomas. *J Breast Cancer*. 2009;12(4):235-40.
221. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, et al. Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol*. 2008;3:41.
222. Fritzsche FR, Bode PK, Moch H, Kristiansen G, Varga Z, Bode B. Determination of the Her-2/neu gene amplification status in cytologic breast cancer specimens using automated silver-enhanced in-situ hybridization (SISH). *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1180-5.
223. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, et al. p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res*. 1990;50(16):5184-91.
224. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 1991;27(11):1372-5.
225. Harpole DH, Herndon JE, Young WG, Wolfe WG, Sabiston D. Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. *Cancer*. 1995;76(5):787-96.
226. Kern JA, Slebos RJ, Top B, Rodenhuis S, Lager D, Robinson RA, et al. C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest*. 1994;93(2):516-20.
227. Kim YC, Park KO, Kern JA, Park CS, Lim SC, Jang AS, et al. The interactive effect of Ras, HER2, p53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 1998;22(3):181-90.
228. Pfeiffer P, Clausen P, Andersen K, Rose C. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185HER-2 in patients with systemically untreated non-small-cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br J Cancer*. 1996;74(1):86-91.
229. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer*. 2003;89(6):959-65.
230. Ochiai A, Akimoto S, Kanai Y, Shibata T, Oyama T, Hirohashi S. c-erbB-2 gene product associates with catenins in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205(1):73-8.

231. Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(18):1403–8.
232. Tateishi M, Ishida T, Kohdono S, Hamatake M, Fukuyama Y, Sugimachi K. Prognostic influence of the co-expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surg Oncol.* 1994;3(2):109–13.
233. Harpole DH, Herndon JE II, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrent and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res.* 1995;55:51-6.
234. Osaki T, Mitsudomi T, Oyama T, Nakanishi R, Yasumoto K. Serum level and tissue expression of c-erbB-2 protein in lung adenocarcinoma. *Chest.* 1995;108(1):157-62.
235. Diez M, Pollan M, Maestro M, Torres A, Ortega D, Gomez A, et al. Prediction of recurrence by quantification of p185-neu protein in non-small cell lung cancer tissue. *Br J Cancer.* 1997;75(5):684-9.
236. Petrussevska G, Ilievska-Poposka B, Banev S, Smickova S, Spirovski Z. Immunohistochemical expression of HER-2/neu in patients with lung carcinoma and its prognostic significance. *Radiol Oncol.* 2004;38(2):131-5.
237. Liu L, Shao X, Gao W, Bai J, Wang R, Huang P, et al. The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data. *J Thorac Oncol.* 2010;5(12):1922–32.
238. Mazieres J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspective. *J Clin Oncol.* 2013;31(16):1997-2003.
239. Tsai CM, Chang KT, Wu LH, Chen JY, Gazdar AF, Mitsudomi T, et al. Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in NSCLC cell lines. *Cancer Res.* 1996;56(1):206–9.
240. Clamon G, Herndon J, Kern J, Govindan R, Garst J, Watson D, et al. Lack of trastuzumab activity in non small cell lung carcinoma with overexpression of erb-B2: 39810: a phase II trial of Cancer and Leukemia group B. *Cancer.* 2005;103(8):1670–5.
241. Gatzemeier U, Groth G, Butts C, Van Zandwijk N, Shepherd F, Ardizzoni A, et al. Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(1):19–27.
242. Lara PN, Laptalo L, Longmate J, Lau DH, Gandour-Edwards R, Gumerlock PH, et al. Trastuzumab plus docetaxel in HER2/neu-positive non-small-cell lung cancer: a California cancer consortium screening and phase II trial. *Clin Lung Cancer.* 2004;5(4):231–6.
243. Mar N, Vredenburgh J, Wasser J. Targeting HER2 in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2015;87(3):220–5.
244. Gatzemeier U, Groth G, Butts C, Van Zandwijk N, Shepherd F, Ardizzoni A, et al. A randomised phase II study of gemcitabine/cisplatin alone and herceptin in patients with HER2- positive non-small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(1):19-27.
245. Peters S, Zimmermann S. Targeted therapy in NSCLC driven by HER2 insertions. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(2):84-8.
246. Ross HJ, Blumenschein GR Jr, Aisner J, Damjanov N, Dowlati A, Garst J, et al. Randomized phase II multicenter trial of two schedules of lapatinib as first- or second-line monotherapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(6):1938-49.
247. National Comprehensive Cancer Network [homepage on the Internet]. Non-small cell lung cancer 2015 [cited 2016 Jan 12]. Available from: [http://www.hts.org.gr/assets/files/omades\\_ergasias/cancer/NCCN%20guidelines%20NSCLC%202016.pdf](http://www.hts.org.gr/assets/files/omades_ergasias/cancer/NCCN%20guidelines%20NSCLC%202016.pdf)
248. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 3997- 4013.

249. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV) - associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(3):175-201.
250. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
251. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):11–30.
252. Holford TR, Levy DT, McKay LA, Clarke L, Racine B, Meza R. Patterns of birth cohort-specific smoking histories, 1965–2009. *Am J Prev Med.* 2014;46(2):e31–7.
253. Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer.* 1996;77(12):2464–70.
254. Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(21):1580–6.
255. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer.* 1995;75(12):2844–52.
256. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):288–300.
257. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Paz-Ares L, Belda-Iniesta C, Hidalgo M, et al. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol.* 2013;15(7):503–8.
258. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(36):5311–20.
259. Levi F, Franceschi S, La, Vecchia C, Randimbison L. Lung carcinoma trends by histologic type in Vaud and Neuchâtel, Switzerland, 1974-1994. *Cancer.* 1997;79(5):906–14.
260. Sobue T, Ajiki W, Tsukuma H, Oshima A, Hanai A, Fujimoto I. Trends of lung cancer incidence by histologic type: a population-based study in Osaka, Japan. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:6–15.
261. Stellman SD, Muscat JE, Thompson S, Hoffmann D, Wynder EL. Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer.* 1997;80(3):382–8.
262. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011;12(2):175–80.
263. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA.* 2014;311(19):1998–2006.
264. Ilievska Poposka B, Smickova S, Jovanovska Crvenkovska S, Zafirova Ivanovska B, Stefanovski T, Petrusevska G. Prognostic value of immunohistochemical expression of HER-2/neu in patients with lung carcinoma. *Radiol Oncol.* 2008;42(3):151-8.
265. Warth A, Muley T, Kossakowski C, Stenzinger A, Schirmacher P, Dienemann H, et al. Prognostic impact and clinicopathological correlations of the cribriform pattern in pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2015;10(4):638–44.
266. Kim HJ, Choi EY, Jin HJ, Shin KC. Relationship between EGFR mutations and clinicopathological features of lung adenocarcinomas diagnosed via small biopsies. *Anticancer Res.* 2014;34(6):3189-96.
267. Yoshizawaa A, Sumiyoshib S, Sonobec M, Kobayashic M, Ueharaa T, Fujimotob M. HER2 status in lung adenocarcinoma: a comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations. *Lung Cancer.* 2014;85(3):373–8.
268. Youliden D, Cramb S, Baade P. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol.* 2008;3(8):819–31.
269. Morgensztern D, Huey S, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J Thorac Oncol.* 2010;5(1):29–33.

270. Harris JE, Thun MJ, Mondul AM, Calle EE. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982–8. *BMJ*. 2004;328(7431):72.
271. Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, Laszlo J. Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*. 1984;44(12 Pt 1):5940–58.
272. Li X, Zhao C, Su C, Ren S, Chen X, Zhou C. Epidemiological study of HER-2 mutations among EGFR wild-type lung adenocarcinoma patients in China. *BMC Cancer*. 2016;16(1):828.
273. Nagy-Mignotte H, Guillem P, Vesin A, Toffart AC, Colonna M, Bonnetterre V, et al. Primary lung adenocarcinoma: characteristics by smoking habit and sex. *Eur Respir J*. 2011;38(6):1412–9.
274. Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, et al. Effect of tumor size on prognosis in patients with non-small cell lung cancer: the role of segmentectomy as a type of lesser resection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129(1):87-93.
275. Zhang J, Gold KA, Lin HY, Swisher SG, Xing Y, Lee J, et al. Relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC): an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) registry. *J Thorac Oncol*. 2015;10(4):682–90.
276. Yang F, Chen H, Xiang J, Zhang Y, Zhou J, Hu H, et al. Relationship between tumor size and disease stage in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:474.
277. Zhao LL, Xie HK, Zhang LP, Zha JY, Zhou FY, Jiang GN, et al. Visceral pleural invasion in lung adenocarcinoma  $\leq 3$  cm with ground-glass opacity: a clinical, pathological and radiological study. *J Thorac Dis*. 2016;8(7):1788-97.
278. Manach M, Riquet M, Medioni J, Pimpec-Barthes FL, Dujon A, Danel C. Visceral pleura invasion by non-small cell lung cancer: an underrated bad prognostic factor. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(4):1088–93.
279. Brewer LA, Bai AF, Little JN, Rabago YPG. Carcinoma of the lung: practical classification of early diagnosis and survival treatment. *JAMA*. 1958;166:1149-55.
280. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*. 1997;111(6):1710–7.
281. Stoelben E, Ludwig C. Chest wall resection for lung cancer: indications and techniques. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;35(3):450-6.
282. Filosso PL, Sandri A, Guerrera F, Solidoro P, Bora G, Lyberis P, et al. Primary lung tumors invading the chest wall. *J Thorac Dis*. 2016;8(Suppl 11):S855-62.
283. Lu S, Tan KS, Kadota K, Eguchi T, Bains S, Rekhtman N, et al. Spread through Air Spaces (STAS) is an independent predictor of recurrence and lung cancer – specific death in squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2017;12(2):223-34.
284. Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Kuwata T, Chikaishi Y, Oka S, et al. The prognostic significance of HER2 over expression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2011;31(12):4631-6.
285. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Shim HS. The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171280.
286. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44(4):388-96.
287. Little AG, Gay EG, Gaspar LE, Stewart AK. National survey of non-small cell lung cancer in the United States: epidemiology, pathology and patterns of care. *Lung Cancer*. 2007;57(3):253-60.
288. Tamura T, Kurishima K, Nakazawa K, Kagohashi K, Ishikawa H, Satoh H, et al. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(1):217-21.
289. Sorensen JB, Hansen HH, Hansen M, Dombernowsky P. Brain metastases in adenocarcinoma of the lung: frequency, risk groups, and prognosis. *J Clin Oncol*. 1988;6(9):1474-80.

290. Jacot W, Quantin X, Boher JM, Andre F, Moreau L, Gainet M, et al. Brain metastases at the time of presentation of non-small cell lung cancer: a multi-centric AERIO analysis of prognostic factors. *Br J Cancer*. 2001;84(7):903-9.
291. Sanchez de Cos J, Sojo Gonzalez MA, Montero MV, Perez Calvo MC, Vicente MJ, Valle MH. Non-small cell lung cancer and silent brain metastasis. Survival and prognostic factors. *Lung Cancer*. 2009;63(1):140-5.
292. Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol*. 2012;30(13):1438-46.
293. López-Encuentra A, García-Luján R, Rivas JJ, Rodríguez-Rodríguez J, Torres-Lanza J, Varela-Simo G. Comparison between clinical and pathologic staging in 2,994 cases of lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(3):974-9.
294. Li H, Pana Y, Li Y, Li C, Wanga R, Hua H, et al. Frequency of well-identified oncogenic driver mutations in lung adenocarcinoma of smokers varies with histological subtypes and graduated smoking dose. *Lung Cancer*. 2013;79(1):8-13.
295. Zhang J, Wu J, Tan O, Zhu L, Gao W. Why do pathological stage IA lung adenocarcinomas vary from prognosis? A clinicopathologic study of 176 patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification. *J Thorac Oncol*. 2013;8(9):1196-202.
296. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. 2011;24(5):653-64.
297. Russell PA, Barnett SA, Walkiewicz M, Wainer Z, Conron M, Wright GM, et al. Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol*. 2013;8(4):461-8.
298. Liu Y, Xu ML, Zhong HH, Heng WJ, Wu BQ. EGFR mutations are more frequent in well-differentiated than in poor-differentiated lung adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2008;14(4):373-9.
299. Mandal SK, Singh TT, Sharma TD, Amrithalingam V. Clinico-pathology of lung cancer in a regional cancer center in Northeastern India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7277-81.
300. Yanagawa N, Shiono S, Abiko M, Ogata S, Sato T, Tamura G. New IASLC/ATS/ERS classification and invasive tumor size are predictive of disease recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013;8(5):612-8.
301. Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima CS, Riely GJ, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):448-60.
302. Isaka T, Yokose T, Ito H, Imamura N, Watanabe M, Imai K, et al. Comparison between CT tumor size and pathological tumor size in frozen section examinations of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2014;85(1):40-6.
303. Ricciardi GRR, Russo A, Franchina T, Ferraro G, Zanghì M, Picone A, et al. NSCLC and HER2. Between lights and shadows. *J Thorac Oncol*. 2014;9(12):1750-62.
304. Awaya H, Takeshima Y, Furonaka O, Kohno N, Inai K. Gene amplification and protein expression of EGFR and HER2 by chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol*. 2005;58(10):1076-80.
305. Kobayakov DS, Avdalyan AM, Bobrov IP, Bychkova EY, Lazarev AF, Lushnikova EL, et al. Correlation of HER-2/Neu protein expression and HER2 gene amplification with clinical morphological parameters of nonsmall cell lung cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2014;157(6):789-93.

306. Cappuzzo F, Cho YG, Sacconi A, Alì G, Siclari O, Incarbone M, et al. p95HER2 truncated form in resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;7(3):520-7.
307. Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, et al. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003;103(1):61-6.
308. Pelosi G, Del Curto B, Dell'Orto P, Pasini F, Veronesi G, Spaggiari L, et al. Lack of prognostic implications of HER-2/neu abnormalities in 345 stage I non-small cell carcinomas (NSCLC) and 207 stage I-III neuroendocrine tumours (NET) of the lung. *Int J Cancer*. 2005;113(1):101-8.
309. Tan D, Deeb G, Wang J, Slocum HK, Winston J, Wiseman S, et al. HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-III non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2003;12(4):201-11.
310. Cox G, Vyberg M, Melgaard B, Askaa J, Oster A, O' Byrne KJ. Herceptest: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2001;92(4):480-3.

## 10. LISTA SKRAĆENICA

AAH	atipična adenomatozna hiperplazija
AIS	adenokarcinom in situ
AJCC	(od eng.- American Joint Comitete for Cancer)
BAC	bronhioloalveolarni karcinom
CDK	ciklin zavisne kinase
CISH	hromogena in situ hibridizacija
CT	kompjuterizovana tomografija
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EGF	(od eng.- epidermal growth factor)
EGFR	(od eng.- epidermal growth factor receptor)
ErbB2/HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ErbB3/HER3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
ErbB4/HER4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
HIV	(od eng.- human Immunodeficiency Virus)
HPV	(od eng.- human papilloma virus)
HOBP	hronična opstruktivna bolest pluća
IARC	(od eng.- International Agency for Research on Cancer)
IASLC	(od eng.- International Agency for the Study of Lung cancer)
IHC	imunohistohemija
IPBV	Institut za plućne bolesti Vojvodine
ISH	in situ hibridizacija
ISC	(od eng.- International Staging Committete)
KCCG	Klinički centar Crne Gore
KRAS	(od eng.- homologous to the oncogene of the Kirsten rat sarcoma virus)
LCMC	(od eng.- Lung Cancer Consortium)
MAPK	Rs/Raf mitogen-aktivirajuća protein kinaza
MIA	minimalno invazivni adenokarcinom
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NDF	Neuregulin 1
NNK	4-(metilnitrozoamino)-1-(3-piridil)-1-butanone
NSCLC	(od eng.- non-small cell lung cancer)
PI3K/AKT	fosfatidilinozitol-3-kinaza
SAB	streptavidin biotin
SAD	Sjedinjene Američke Države
SD	standardna devijacija
SISH	silver in situ hibridizacija
STAS	(od eng.- Spread Through Air Spaces)
SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija



TGF- $\beta$	transformišući factor rasta- $\beta$
TMA	(od eng.- Tissue microarray)
TNM	(od eng.- Tumor, Nodes and Metastases)
TTF-1	(od eng.- Thyroid transcription factor-1)
VEGF	vaskularni endotelni factor rasta
UICC	(od eng.- Union Internationale Control Cancer)