

UNIVERZITET ODBRANE U BEOGRADU
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
MEDICINSKI FAKULTET



Mr. sc. med. GORDANA Ž. CVETKOVIĆ

**EKSPRESIJA P-GLIKOPROTEINA, TIROIDNOG TRANSKRIPCIONOG
FAKTORA-1 I P63 KAO PREDIKTIVNIH FAKTORA ODGOVORA NA
POLIHEMIOTERAPIJU KOD BOLESNIKA SA NESITNOĆELIJSKIM
KARCINOMOM PLUĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD 2016.

Ova doktorska disertacija je izrađena u Klinici za pulmologiju VMA u Beogradu. Imunohistohemijska ispitivanja su rađena u Institutu za patologiju VMA u Beogradu. Studija je delimično finansijski i logistički potpomognuta od projekta br. 175056 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije čiji je rukovodilac profesor Vladimir Jurišić sa Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu. Kliničku studiju je odobrio Etički odbor VMA.

Članovi komisije:

VS Prof dr Željka Tatomirović

Prof dr Goran Plavec

Prof dr Vladimir Jurišić

SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
1.1. Istorijat i epidemiološke odlike karcinoma pluća.....	3
1.2. Etiologija karcinoma pluća.....	5
1.3. Prevencija karcinoma pluća.....	6
1.4. Genetske osnove karcinoma pluća.....	7
1.5. MDR1 gen i P-glikoprotein (P-gp).....	14
1.6. Klinička slika karcinoma pluća.....	15
1.7. Dijagnostički postupci.....	18
1.8. Patohistološka klasifikacija nesitnoćelijskih karcinoma pluća.....	20
1.9. Imunohistohemijska analiza u dijagnostici nesitnoćelijskih karcinoma pluća.....	26
1.10. TNM klasifikacija.....	28
1.11. Lečenje obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća.....	31
1.11.1 Hirurško lečenje.....	31
1.11.2. Radijaciona terapija nesitnoćelijskog karcinoma pluća.....	32
1.11.3. Hemioterapija i ciljana terapija nesitnoćelijskog karcinoma pluća.....	33
2. HIPOTEZA.....	39
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	39
4. ISPITANICI I METODE RADA.....	39
4.1. Dizajn istraživanja	39
4.2. Ispitanici	40
4.3. Obeležja posmatranja.....	40
4.4. Statistička obrada podataka.....	42
5. REZULTATI.....	44
5.1. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća.....	44
5.2. Rezultati imunohistohemijskih analiza ekspresije p63, TTF-1 i P-gp	48
5.3. Rezultati inicijalnog odzivanja na hemioterapiju.....	58
5.4. Rezultati preživljavanja bez progresije bolesti i ukupnog preživljavanja.....	66
5.5. Prilog 1.....	80

6. DISKUSIJA.....	83
<i>6.1. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća.....</i>	<i>84</i>
<i>6.2. Rezultati imunohistohemijskih analiza ekspresije p63,TTF-1 i P-gp</i>	<i>85</i>
<i>6.3. Rezultati inicijalnog odzivanja na hemioterapiju.....</i>	<i>87</i>
<i>6.4. Rezultati preživljavanja bez progresije bolesti i ukupnog preživljavanja.....</i>	<i>89</i>
<i>6.5. Ograničenja studije.....</i>	<i>90</i>
<i>6.6. Značaj istraživanja.....</i>	<i>93</i>
<i>6.7. Buduća istraživanja.....</i>	<i>94</i>
7. ZAKLJUČCI.....	95
8. LITERATURA.....	98
9. DODATAK	113
<i>9.1. Skraćenice.....</i>	<i>113</i>

1. UVOD

Karcinomi pluća su zbog svoje učestalosti, kao i zbog činjenice da se ubrajaju u najsmrtonosnije oblike karcinoma, jedan od najvećih problema i izazova onkologije XXI veka. Godišnje se u svetu dijagnostikuje između 1,6 i 1,8 miliona karcinoma pluća, što čini oko 13% novoobolelih od karcinoma, pri čemu je procenjeno da su odgovorni za oko 18% smrtnih ishoda u odnosu na sve karcinome^{1,2}. Visok procenat smrtnih ishoda od karcinoma pluća najvećim delom je posledica toga što se bolest češće dijagnostikuje u odmaklom stadijumu. Prema histološkoj klasifikaciji primarnih plućnih karcinoma, usvojenoj po preporuci Svetske zdravstvene organizacije, najučestalija su sledeća četiri histološka tipa: 1. skvamocelularni (plano- ili epidermoidni) karcinom (koji se u odnosu na ukupan broj karcinoma pluća javlja u oko 25% slučajeva kod žena i u oko 44% kod muškaraca); 2. adeno-karcinom (koji je zastupljen u oko 28% slučajeva kod muškaraca i oko 42% kod žena); 3. mikrocelularni karcinom (javlja se u oko 20 %); i 4. makrocelularni karcinom (oko 9% slučajeva)³. Imajući u vidu osnovne karakteristike i principe lečenja karcinoma usvojena je praktična klinička podela kojom se ova četiri histološka tipa svrstavaju u dve grupe: 1. nesitnoćelijske karcinome pluća (skvamo-, adeno i makrocelularni karcinomi) i 2. sitnoćelijske karcinome pluća (mikrocelularni karcinomi) . Oko 80-85% karcinoma pluća čine nesitnoćelijski karcinomi pluća (NSČKP), dok postoji tendencija pada učestalosti sitnoćelijskih karcinoma pluća u protekle dve decenije⁴. Čak 40% bolesnika pri otkrivanju bolesti ima lokalno uznapredovalu bolest i većina ih je neoperabilno⁵. Srednje preživljavanje bolesnika sa nelečenim NSČKP u odmaklom stadijumu bolesti je četiri do pet meseci, a na godišnjem nivou stopa preživljavanja iznosi svega 10%⁶.

1.1. Istorijat i epidemiološke odlike karcinoma pluća

Karcinomi su stari koliko i ljudska vrsta. Paleopatološka istraživanja pokazuju da su tumori bili prisutni kod praistorijskih životinja , mnogo pre pojave čoveka na Zemlji. Egipatski opis karcinoma u dokumentu poznatom pod nazivom „*Edwin Smith Papyrus*“ iz 3000-te godine

pre nove ere predstavlja prvi pisani dokument o karcinomu⁷. U petom veku pre nove ere Hipokrat je opisao bolest sa lošom prognozom kojoj je dao ime karcinom. Uticajni lekar iz doba renesanse, Galen je smatrao da karcinom ne treba lečiti. Humanista, lekar, naučnik Agrikola je u 16. veku opisao „rudarsku ftizu“, bolest rudara i livaca, a kasnije se ispostavilo da je u pitanju bio karcinom bronha. Radeći kao gradski lekar u rudarskom mestu *Joachimsthal* u Saksoniji, zapazio je povezanost oboljevanja sa radnim mestom. *Harting* i *Hesse* su 1879. godine publikovali seriju radova o uzrocima smrti rudara u *Schneeberg*-u. To je bio prvi opis karcinoma bronha, ali su oni verovali da se radi o sarkomu. Prošlo je nekoliko desetina godina dok nije razjašnjena priroda ove bolesti. Iz rude tih istih rudnika *Marie Curie* je izolovala radijum, kome je tek posle razjašnjenja pojma radioaktivnosti pripisana prava uloga. On je bio pravi uzrok smrti rudara u *Schneeberg*-u. Pola veka posle radova *Harting*-a i *Hesse*-a objavljena su slična zapažanja o uzrocima smrti rudara *Joachimsthal*-a, koji se nalazi na obroncima iste planine⁸.

Pre 150 godina karcinom pluća je bio izuzetno retko oboljenje. U Institutu za patologiju Univerziteta u Drezdenu u Nemačkoj, tokom 1878. godine maligni tumor pluća činilo je svega 1% od svih karcinoma viđenih pri autopsiji. Taj procenat dostigao je 10% 1918.godine i 14% 1927.godine. *Springer Handbook of Special Pathology* iz 1930. godine ističe da postoji izraziti porast malignih tumora pluća posle Prvog svetskog rata⁹. Posle Drugog svetskog rata ekspanzija karcinoma bronha dobija epidemijske razmere i osamdesetih godina dostiže maksimum među muškarcima, dok u nekim zemljama i dalje ima trend rasta.

Incidenca karcinoma pluća u svetu je, u poslednjoj deceniji prošlog veka, u zavisnosti od geografskog područja, iznosila 22 do 86 kod muškaraca i kod žena 3,7 do 37 na 100 000 stanovnika¹⁰. Procenjeno je da je u 2012. godini bilo dijagnostikovano 1,8 miliona slučajeva karcinoma pluća ili 13% svih dijagnostikovanih karcinoma, što ga svrstava u najučestalije karcinome u 2012.godini. Standardizovana stopa incidence karcinoma pluća kod muškaraca u 2012.godini u razvijenim zemljama iznosila je 44,7/100 000 (po učestalosti iza karcinoma prostate), a u manje razvijenim zemljama 30,0/100 000 (prvo mesto po učestalosti). Kod žena u razvijenim zemljama standardizovana stopa incidence karcinoma pluća iznosila je 19,6/100 000 (po učestalosti iza karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma), dok je u manje razvijenim zemljama iznosila 11,1/100 000 (po učestalosti iza karcinoma dojke i grlića materice). U istoj godini standardizovana stopa mortaliteta od karcinoma pluća kod muškaraca u razvijenim zemljama iznosila je 36,8/100 000 (na prvom mestu po smrtnosti), u manje razvijenim zemljama 27,2/100

000 (na prvom mestu po smrtnosti), a kod žena u razvijenim zemljama 14,3/100 000 (iza karcinoma dojke) i u manje razvijenim zemljama 9,8/100 000 (iza karcinoma dojke). Prema ovim podacima očigledno je da je karcinom pluća najsmrtonosniji karcinom kod muškaraca i među najsmrtonosnijim kod žena. Standardizovana stopa incidence za karcinome pluća u centralnoj i istočnoj Evropi u 2012.godini iznosila je za muškarce 53,5/100 000, a za žene 10,4/100 000 ¹. Prema izveštajima iz "Registra za rak u centralnoj Srbiji" za 2012. godinu od karcinoma pluća je te godine obolelo 4076 osoba (3117 muškaraca i 959 žena), a umrla je 3541 osoba (2588 muškaraca i 963 žene). Karcinomi pluća su vodeća maligna lokalizacija (ispred karcinoma prostate) kod muškaraca u centralnoj Srbiji (22,5%) i četvrta maligna lokalizacija (iza karcinoma dojke, kolorektalnog i karcinoma grlića materice) kod žena u centralnoj Srbiji u odnosu na sve kacinome (7,8%). Standardizovana stopa incidence za karcinome pluća u centralnoj Srbiji za muškarce iznosi 65,0/100 000, a za žene 18,2/100 000. Standardizovana stopa mortaliteta za karcinome pluća u centralnoj Srbiji za muškarce iznosi 51,6/100 000, a za žene 17,1/100 000 ¹¹. Naša zemlja svrstava se u grupu zemalja centralne i istočne Evrope sa visokim stopama oboljevanja i smrtnosti od karcinoma pluća ¹².

1.2. Etiologija karcinoma pluća

Dokazi o povezanosti pušenja i karcinoma pojavili su se još 1920.godine. Hemičar *Angel Honorio Roffo* objavio je nekoliko radova, u periodu između 1920. i 1940. godine, u kojima je dokazao da se karcinom može izazvati izlaganjem katranu iz cigarete. Tokom pedesetih godina XX veka u vodećim medicinskim časopisima objavljeno je nekoliko značajnih radova koji su ukazivali na vezu pušenja i karcinoma ^{13,14}. Pušenje je jedan od najvažnijih faktora rizika za karcinom pluća. Približno 90% muškaraca obolelih od karcinoma pluća su pušači, dok kod žena taj procenat iznosi oko 80% ¹⁵. Veliki broj studija pokazuje da je relativni rizik za nastanak karcinoma pluća veći 20 puta kod pušača u odnosu na nepušače ¹⁶. Rizik od nastanka karcinoma kod bivših pušača snižava se tokom vremena. Bivši pušači koji su prekinuli pušenje u trajanju više od 15 godina, smanjuju rizik za karcinom pluća od 80% do 90% u odnosu na pušače ¹⁷.

Neosporna je i uloga genetske predispozicije za nastanak karcinoma pluća. Jedna studija kojom je praćeno 2400 rođaka od 316 nepušača obolelih od carcinoma, pokazala je da rizik za oboljevanje od carcinoma pluća kod najbližih srodnika doseže do 25%¹⁷.

Niske koncentracije antioksidanasa u serumu dovode se u vezu sa razvojem karcinoma. Vitamin A, C, E, kao i β -karoten imaju protektivnu ulogu kada je reć o karcinomu pluća.

Utvrđeno je da je zbog profesionalne izloženosti karcinogenima kao što je azbest, arsen, berilijum, kadmijum, hrom, nikl, silicijum i policiklični aromatićni ugljovodonici, od carcinoma pluća umire oko 10% muškaraca i 5% žena širom sveta¹⁷. Pojedine bolesti pluća, kao što je tuberkuloza, fibroza, silikoza, hronični bronhitis i emfizem takođe pojaćavaju rizik za nastanak karcinoma pluća¹⁸.

1.3. Prevencija karcinoma pluća

Primarna prevencija, tj. delovanje u cilju smanjenja rizika za nastanak bolesti, podrazumeva kvalitetan, sveobuhvatan nacionalni program ne samo borbe protiv pušenja, već i protiv aerozagadenja, kao i program adekvatne zaštite na radu. Neke zemlje su zahvaljujući dobrim programima primarne prevencije dovele do stagnacije incidence karcinoma pluća.

Sekundarna prevencija podrazumeva rano otkrivanje bolesti putem osjetljivog, jednostavnog, brzog, finansijski isplativog pregleda (pre svega rizićnih grupa). Identifikacija genetski predisponiranih za malignitet pluća, detekcija abnormalnog genetskog materijala ili u sputumu ili u plazmi, citološka analiza sputuma, fluorescentna bronhoskopija u identifikaciji displastićnog epitela, neke su od mogućnosti. Amerićki Nacionalni institut za karcinom je 2002.godine započeo prospektivnu randomizovanu studiju za skrining karcinoma bronha pod nazivom National Lung Screening Trial (NLST). Ovo ispitivanje je poredilo upotrebu niskodoznog skenera (low-dose computed tomography -LDCT) sa upotrebom radiografije grudnog koša jedanput godišnje i to inicijalno i tokom naredne dve godine, tj. ukupno tri pregleda (po jedan pregled godišnje). Rukovodeći se rezultatima NLST studije koja je klinićki potvrdila dobrobit i opravdanost upotrebe LDCT skrininga kod viskorizićnih grupa, National Comprehensive Cancer

Networka (NCCN) preporučuje pregled grudnog koša LDCT-om takođe kod viskorizičnih ispitanika, odnosno kod: 1) osoba starosti 55 do 75 godina, koje su pušači preko 30 paklo/godina (broj dnevno popušanih pakli cigareta pomnožen sa pušači staž izraženim u godinama) ili bivši pušači koji su pušili preko 30 paklo/godina, a koji su prestali da puše u poslednjih 15 godina. 2) osoba starosti preko 50 godina, koje su pušači preko 20 paklo/godina i sa pridruženim faktorom rizika za karcinom pluća (istorija maligniteta, hronična opstruktivna bolesti pluća, plućna fibroza, pozitivna porodična anamneza za karcinom pluća, izlaganje radonu, ili profesionalna ekspozicija arsenu, hromu, azbesti, niklu, kadmijumu, berilijumu, silicijumu, dizel gorivu, dimu uglja i čađi) ¹⁹. Ovakav oblik prevencije je značajan jer omogućava otkrivanje bolesti u ranim stadijumima, kada postoje veće šanse za izlečenje, uz istovremeno smanjenje novootkrivenih slučajeva u uznapredovalim stadijumima, a samim tim i smanjenje stope mortaliteta.

1.4. Genetske osnove karcinoma pluća

Zahvaljujući brojnim, pre svega bazičnim istraživanjima, poslednje dve decenije XX veka, kao i početkom XXI veka značajno je unapređeno razumevanje molekularnih osnova karcinoma pluća. Otkriven je veći broj genetskih lezija koje su neophodne za nastanak malignog fenotipa. Neke od ovih lezija su u neposrednoj vezi sa pušenjem koje je, jedan od najvažnijih faktora rizika za nastanak karcinoma pluća ²⁰. Nije poznato da li su malignoj transformaciji podložne sve epitelne ćelije ili samo matične („stem“) i progenitorske ćelije. U svakom slučaju, inicijalno tumorske ćelije pretrpe mnoštvo mutacija, a njihov dalji razvoj podrazumeva brojne dodatne mutacije. Pušenje dovodi do oštećenja kompletnog respiratornog epitela, tako da se regije sa molekularnim promenama javljaju u do tada histološki normalnom plućnom epitelu. Sa druge strane preneoplastične, tj. premaligne histološke lezije imaju sopstvene molekularne promene, tj. sebi svojstvene abnormalnosti. Ove promene vode ka karcinomu pluća sa svim malignim obeležjima kao što su sopstveni faktori rasta, neosetljivost na inhibitore faktora rasta, izbegavanje apoptoze, neograničeni potencijal umnožavanja, neoangiogeneza, invazija okolnog tkiva i metastaziranje. Karcinom pluća je klinički, biološki, histološki i molekularno heterogeno

oboljenje. Otkrivanje gena i puteva onkogeneze doprinosi razotkrivanju veze sa biološkim karakteristikama i ponašanjem određenog tipa karcinoma, kao i mogućnosti njihove upotrebe kako u dijagnostičke, tako i u terapijske svrhe. Tri nezavisne studije su 2008 godine identifikovale varijacije gena na lokusu 15q24-q25.1 koje su u vezi sa povišenim rizikom za nikotinsku zavisnost i razvoj karcinoma pluća. Nešto kasnije su dve meta analize pružile dokaze da varijacije na lokusima 15q25.1, 5p15.33, i 6p21.33 utiču na rizik za razvoj karcinoma pluća. Konzorcijum za genetsku epidemiologiju karcinoma pluća (*Genetic Epidemiology of Lung Cancer Consortium - GELCC*) je istraživanjem nasledne sklonosti ka karcinomu pluća identifikovao potencijalni uzročni gen za karcinom pluća na lokusu 6q23-25²¹.

Pojednostavljeno rečeno proces karcinogeneze započinje kada kao posledica izlaganja karcinogenima nastanu pretežno ireverzibilne promene, tj. mutacija genetskog materijala, što predstavlja fazu inicijacije. Inicirana ćelija postupno poprima karakteristike maligne ćelije tokom faze promocije. U fazi konverzije ćelija dobija svojstva invazivnosti, dok faza progresije podrazumeva kontinuirano umnožavanje i metastaziranje .

Da bi nastao maligni fenotip neophodna je akumulacija većeg broja genetskih oštećenja. Geni koji su uključeni u proces karcinogeneze dele se u tri osnovne grupe: protoonkogene (dominantni geni), tumor supresor gene (recesivni) i gene koji vrše reparaciju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Do aktivacije protoonkogena može doći usled: tačkastih (point) mutacija; umnožavanja (amplifikacije) gena; prekomerne ekspresije; ili hromozomske translokacije. Kao posledica njihove aktivacije stvaraju se određeni proteini koji imaju ulogu u kaskadnom procesu prenosa mitogenih signala ili utiču na važne metaboličke procese u ćeliji²².

Među najčešće aktiviranim onkogenima kod karcinoma pluća su : *EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, MET, fuzionisani EML4-ALK, and BCL2*. Ovi onkogeni značajni su kao pokretači procesa onkogeneze ili za ključne signalne puteve u karcinogenezi . Oni sa druge strane postaju važni u terapijskom smislu, zbog mogućnosti ciljanog delovanja na tumorske ćelije, bez oštećenja normalnih ćelija²¹.

Receptor epidermalnog faktora rasta (Epidermal growth factor receptor -EGFR)

ErbB familija tirozin kinaznih receptora ima ukupno četiri člana – EGFR, ErbB-2 (HER2), ErbB-3, and ErbB-4 . Oni mogu da formiraju homo- i heterodimere i tada vezuju različite ligande. Na taj način dolazi do aktivacije receptora i pokretanja nishodnih puteva signalizacije.

Prekomerna ekspresija EGFR ili aberantna aktivacija nađena je u oko 50–90% bolesnika sa NSĆKP. Inicijalna istraživanja sa monklonskim antitelima (kao što je cetuximab) koja se vezuju za ekstracelularni tirozin kinazni domen, potisnuta su razvojem malih molekula koji inhibiraju intracelularni tirozin kinazni domen EGFR. EGFR tirozin kinazni inhibitori (TKI) blokiraju nishodni deo signalnog puta. Senzitivnost i značajan odgovor tumora na terapiju TKI (kao što su erlotinib i gefitinib) potvrđena je kod tumora sa delecijom na egzonu 19 deletion i mutacijom egzona 21. EGFR mutacije su češće kod pacijenata sa adenokarcinomom, žena, nepušača koji su azijske etničke pripadnosti. Rezistencija na terapiju TKI povezana je sa insercijom 20 egzona ili sekundarnom mutacijom T790M, KRAS mutacijom i amplifikacijom *MET* protoonkogenom²¹.

RAS/RAF/MEK/MAPK signalni put

Activacija signalnog puta RAS/RAF/MEK/MAPK veoma često se javlja kod karcinoma pluća i to najčešće putem aktivacije mutacija u KRAS-u²¹. Mutacije u K-Ras onkogenima nalaze se u približno 15-20% bolesnika sa NSĆKP^{23,24}. Preko 30% bolesnika sa adenokarcinomom ima mutiran K-Ras onkogen, dok se kod metastatske bolesti mutacije u K-Ras onkogenu nalaze u čak 80%^{23,25}. U humanim karcinomima K-Ras se aktivira tačkastom mutacijom na jednom od »vrućih« mesta (»hot spots«) u 12.,13. i 61. kodonu. Najviše ovih mutacija je detektovano u 12. i 13. kodonu²⁰. Većina istraživanja pokazuje da su Ras mutacije dominantno povezane sa adenokarcinomima pluća²⁶⁻²⁸, dok su ređa istraživanja u kojima je K-Ras češće bio mutiran u slučajevima skvamocelularnog u odnosu na adenokarcinome²⁹. Mutacije u K-Rasu mogu biti direktna posledica izlaganja karcinogenima iz duvanskog dima²⁷.

MYC

MYC protoonkogen je jedan od najvažnijih nishodnih efektor RAS/RAF/MEK/MAPK signalnog puta. U normalnim uslovima ovaj transkripcioni faktor ima ulogu da kontroliše ćelijsku proliferaciju. Kod karcinoma pluća često se nalazi izmenjena ili prekomerna ekspresija ovog onkogenom. Članovi MYC proto-onkogenom (MYC, MYCN and MYCL) su meta RAS signalnog puta i ključni reglulatori brojnih nishodnih puteva. Upravo je jedan od tih puteva važan i za ćelijsku proliferaciju. Activacija onkogenom MYC familije najčešće se odvija putem amplifikacije gena. MYC je najčešće aktiviran kod NSĆKP. Myc ekspresija vodi ka nezavisnom ćelijskom ciklusu, dok putem aktivacije mitohondrijalnog puta apoptoze može dovesti do ćelijske smrti. S toga da bi

se pokrenuo proces tumorogeneze putem Myc onkogen neophodna je koekspresija antiapoptotičnih BCL2 proteina²¹. Bcl-2 onkogen kodira BCL-2 proteine koji imaju ulogu u procesu programirane ćelijske smrti (apoptoza). Prekomerna ekspresija Bcl-2 onkogen dovodi do inhibicije apoptoze³⁰.

EML4-ALK fuzioni gen

U maloj podgrupi bolesnika sa NSČKP 2007. godine otkriven je novi fuzionisani gen sa sposobnošću transformisanja. Ovaj gen je nastaje inverzijom dva blisko locirana gena na 2p hromozomu i to kinaza anaplastičnog limfoma (ALK) i EML4 (*echinoderm microtubule-associated protein like-4*). Nastanak fuzionog EML4-ALK proteina dovodi do perzistentnog mitogenog signala i maligne transformacije. Tumori sa EML4-ALK fuzijom imaju veoma dobar odgovor na ciljanu terapiju ALK inhibitorom (crizotinib)²¹.

PI3K/AKT/mTOR signalni put

Fosfoinozimid 3-kinaza (PI3Ks) je lipidna kinaza koja reguliše proliferaciju, opstanak, atezivnost i pokretljivost ćelije²¹.

SOX2 i NKX2-1 (TTF1) – poreko zavisni onkogeni

Proučavanje genoma kod NSČKP dovelo je do otkrića histološki specifičnih fokalnih amplifikacija na lokusu 14q13.3 kod adenokarcinoma, a na lokusu 3q26.33 kod skvamocelularnih karcinoma. Funkcionalnim ispitivanjima identifikovani su geni *NKX2-1* (ili *TTF1*) i *SOX2* kao značajne mete ovih amplifikacija. *NKX2-1* kodira transkripcioni faktor koji je značajan za formiranje pneumocita tip II, dok je *SOX2* neophodan za normalan razvoj ezofagusa. Ova saznanja su doprinela razvoju poreklo-zavisnog koncepta tumorogeneze. Prema ovom konceptu je za

opstanak i progresiju tumora potrebniji kontinuiran signalni put kroz specifične puteve normalnog razvoja ćelija, nego kontinuirani signalni putevi u onkogenoj transformaciji²¹.

Tumor supresor geni (TSG) i putevi inhibicije rasta ćelije

Gubitak funkcije TSG je veoma važan korak u nastanku tumora pluća i nastaje najčešće usled inaktivacije oba alela, bilo jednog alela putem hromozomske delecije ili translokacije, ili putem tačkaste mutacije, epigeneske ili transkripcione inaktivacije sekundarnog alela. Najčešće

inaktivirani TSG kod karcinoma pluća su : *TP53*, *RB1*, *STK11*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* and *PTEN* ²¹.

P53 signalni put; *TP53* (17p13) kodira fosfoprotein koji sprečava akumulaciju genskih oštećenja u kćerki ćeliji. Kao odgovor na stres, p53 indukuje ekspresiju nishodnih gena, kao što je inhibitor ciklin zavisne kinaze - CDK (*cyclin-dependent kinase*) koji reguliše signale ključne za reparaciju DNA ili apoptozu ²¹.

CDKN2A/RB signalni put kontroliše prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Prvi TSG koji je identifikovan kod karcinoma pluća je hipofosforilizovan protein retinoblastoma (**RB**). Mutirani RB protein viđa se kod oko 90% SČKP i kod 10–15% NSČKP ²¹.

Heterozigotno oštećenje **3p hromozoma** nalazi se u oko 96% karcinoma pluća i u oko 78% premalignih oštećenja pluća. Serin-treonin kinaza ***STK11 (ili LKB1)*** ima funkciju tumor supresora. STK11 reguliše polaritet , pokretljivost, metabolizam i diferencijaciju ćelije, kao i metastaziranje ²¹.

Neoangiogeneza

Da bi tumor dostigao veličinu iznad 3mm prečnika neophodno je stvaranje novih krvnih sudova (***neoangiogeneza***). Neoangiogeneza je složeni proces koji obuhvata stimulaciju proliferacije endotelnih ćelija putem aktivatora endogene angiogeneze, razgradnju tkiva pomoću enzima metaloproteinaze i kolagenaze, kao i pojačano stvaranje endotelne bazalne membrane ³¹. U angiogene proteine se ubrajaju factor rasta vaskularnog endotela (*vascular endothelial growth factor- VEGF*), faktor rasta trombocitnog porekla (*platelet-derived growth factor-PDGF*), fibroblastni faktor rasta (*fibroblast growth factor-FGF*), interleukin-8, i angiopoetini 1 and 2. VEGF stimuliše proliferaciju, migraciju, inhibira apoptozu, omogućava opstanak ćelije i reguliše propustljivost endotelnih ćelija ²¹. Inhibitori angiogeneze predstavljaju značajnu dopunu standardnoj antitumorskoj terapiji.

Aktivacija enzima ***telomeraze*** , u premalignim ćelijama sprečava gubitak krajeva telomera što je inače kritična tačka neophodna za besmrtnost ćelije. U normalnoj ćeliji telomeraza je neaktivna, dok je aktivirana u preko 80% kod NSČKP i kod skoro svih SČKP ²¹.

Epigenetske promene u karcinomu pluća

Metilacija i modifikacija histona

Epigenetski događaji mogu dovesti do promena u ekspresiji gena bez ikakvih promena u sekvenci DNK i potencijalno su reverzibilne. Hipermetilacija aberantnog promotora je jedan od epigenetskih događaja koji se javlja rano u procesu tumorogeneze i rezultira u sprečavanju transkripcije gena tako da predstavlja jedan od načina inaktivacije tumor supresor gena u karcinomu pluća. Prevalenca metilacije promotora različitih gena kod pušača razlikuje se u odnosu na nepušače. Znatno je češća metilacija *p16*, *MGMT*, *RASSF1*, *MTHFR* i *FHIT* kod pušača, dok je metilacija *RASSF2*, *TNFRSF10C*, *BHLHB5*, i *BOLL* češća kod nepušača. Modifikacija histona je drugi značajan mehanizam epigenetske kontrole transkripcije gena u kome dezacetilacija histona dovodi do zgušnjavanja hromatina i tako onemogućava transkripciju inaktivne DNK. Demetilacioni agensi (kao 5-azacitidin) i dezacetilaza (HDAC) predstavljaju oblike ciljanih terapija usmerenih na ove epigenetske događaje ²¹.

MicroRNK-posredovana regulacija karcinoma pluća

MikroRNK (miRNA) pripadaju neproteinskoj klasi i kodiraju malu RNK sposobnu za regulaciju ekspresije gena, bilo direktnim kidanjem ciljane mRNA ili inhibicijom translacije putem interakcije sa 3' regionom (3' *untranslated region* -UTR) ciljane mRNA. Otuda oni imaju ulogu u patogenezi karcinoma pluća kao onkogeni ili tumor supresor geni. Do sada najbolje proučeni miRNK koji ima značajnu ulogu tumor supresora je familija *let-7* miRNK koji regulišu N-RAS, K-RAS, MYC and HMGA2 vezivanjem za *let-7* vezujuća mesta na njihovim 3' UT regionima. MikroRNK predstavljaju potencijalne dijagnostičke i prognostičke biomarkere, kao i terapijske mete ²¹.

Interesantno je istraživanje Blanka, Iwakawa-e i saradnika koje je imalo za cilj proučavanje učestalosti tačkastih mutacija i homozigotnih/intragenjskih delecija od ranije poznatih 17 kancerskih gena (*AKT1*, *BRAF*, *MET*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *STK11*, *MYC*, *MYCL*, *MYCN*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *CDKN2A*, *RBI*, *TP53* i fuzija *EML4-ALK*) u ćelijskim linijama sitnoćelijskog, skvamoznog, adeno, krupnoćelijskog karcinoma i karcinoida. Rezultati ovog istraživanja objavljenog 2009. godine otkrili su postojanje alteracija u čak 98% ćelijskih linija .

Od 88 testiranih ćelijskih linija u 86 linija nađene su alteracije u najmanje jednom genu. Nije detektovana fuzija *EML4-ALK* ni alteracija u *AKT1* genu. Rezultat učestalosti alteracija izražen u procentima izgleda ovako: T *TP53* (79%), *CDKN2A* (59%), *RBI* (35%), *STK11* (27%), *MYC*-family (20%), *KRAS* (17%), *PTEN* (11%), *PIK3CA* (8%), *EGFR* (7%), *NRAS* (6%), *MET* (5%), *BRAF* (2%), i *ERBB2* (2%). Ovom studijom nije obuhvaćen jedan od tumor supresor gena *SMARCA4*, za koga je otkriveno da je često alterisan u NSĆKP. Pojedinačne mutacije nađene su u 28% ćelijskih linija, po dve mutacije u 26% linija, a u 3% ćelijskih linija karcinoma pluća nađeno je istovremeno prisustvo po tri mutacije ³². Ova studija je značajna kako za unapređenje dijagnostike, tako i za budući personalizovani terapijski pristup.

Proučavanje ranih promena u nastanku karcinoma pluća otežava činjenica da su pluća organ koji ima veliku površinu, te da je zato teže otkriti premaligne lezije u bronhijalnom stablu. Zahvaljujući bioptiranju lezija različitog stepena displazije i poređenju genetskih abnormalnosti u tim uzorcima bilo je moguće otkriti sled genetskih promena u procesu karcinogeneze. Najranije promene koje se javljaju u hiperplastičnom i metaplastičnom bronhijalnom epitelu su heterozigotna oštećenja 3p i 9p hromozoma. Displazija epitela se dovodi u vezu sa pojavom mutacija p53 i daljeg oštećenja 3p, dok je morfološka pojava mikroinvazije kod adenokarcinoma u vezi sa mutacijom u K-Rasu i delecijom 5q hromozoma ³¹.

Istraživanja izvršena tokom poslednjih par decenija pokazuju da tumori sadrže malu subpopulaciju ćelija nalik matičnim ćelijama. Ove ćelije su nazvane tumorske “stem-like”ćelije (cancer stem-like cells) ili kancer-inicirajuće ćelije koje karakteriše sposobnost samoobnavljanja i koje su odgovorne za opstanak i metastaziranje tumora. Gutova i saradnici su iz tri ćelijske linije karcinoma pluća izolovali uPAR-pozitivne tumorske “stem-like”ćelije sa koekspresijom CD44 and MDR1 (multi drug resistance). Ove ćelije su imale sposobnost hemiorezistencije ³³.

1.5. MDR1 gen i P-glikoprotein (P-gp)

Sposobnost ćelije da razvije unakrsnu otpornost, tj rezistenciju na širi spektar strukturno različitih lekova naziva se „*multidrug resistance*“ (**MDR**). MDR je rezultat smanjene akumulacije leka usled ekspresije jedne ili više ATP(adenozin trifosfat) zavisnih transportera, koje imaju uloge efluksnih pumpi, odnosno pumpi koje izbacuju lek iz ćelije. Do sada je proučeno 48 različitih ATP- vezujućih transportera u humanom genomu, koji su svrstani u 7 različitih klasa (A,B,C,D,E,F i G). Prvi je otkriven i opisan 1986 godine **P-glikoprotein**. P-gp je protein 150-170 kDa koji pripada porodici ATP vezujućih transportnih proteina plazma membrane i kao takav ima ulogu pumpe koja iz ćelije izbacuje hidrofobne lekove. On je produkt MDR1 gena lociranog na hromozomu 7q21. Sastoji se od 2 transmembranska domena, od kojih svaki ima po 6 transmembranskih segmenata, i dva nukleotidna vezujuća domena. Uloga ovog glikoproteina je da deluje praktično kao brana za strane supstance i dovodi do njihove ekskrecije u žuč i u urin. P-gp se nalazi u epitelnim ćelijama gastrointestinalnog trakta, jetre, bubrega, testisa, ovarijuma i moždanih kapilara³⁴.

Postoje dva osnovna mehanizma unosa leka u ćeliju u zavisnosti od toga da li rastvorljivi u vodi ili ne. Hidrofilni lekovi kao što je cisplatin mogu proći kroz plazma membranu samo uz pomoć nosača ili transportera, ili kroz hidrofilne membranske kanale. Ukoliko dođe do nastanka mutacije na nosačima razvija se rezistencija na taj lek i to označava rezistenciju na jedan lek. Sa druge strane ako dođe do generalizovanog nedostatka transportera i nosača na površini ćelije, to praktično znači da se javila istovremena rezistencija na veći broj lekova, tj. MDR. Za hidrofobne lekove, kao što je vinkristin, vinblastin, doksorubicin, etoposid, paklitaksel, koji u ćeliju dospevaju difuzijom kroz plazma membranu, znači da nemaju potrebu za nosačima. Međutim, da bi oni dospeli van ćelije, neophodno je da se aktivira energetska, tj. ATP zavisni transporter, kao što je P-gp³⁴. Prekomerna ekspresija P-gp se s toga dovodi u vezu sa otpornošću na različite antikancerske lekove kao što su vinka alkaloidi, antraciklini i taksani³⁵⁻³⁷.

1.6. Klinička slika karcinoma pluća

Simptomi i znaci karcinoma pluća pre svega zavise od lokalizacije, veličine tumora, postojanja metastaza, kao i od sistemskih manifestacija koje nastaju kao posledica tzv. paraneoplastičnih sindroma. Preko 90% bolesnika u vreme otkrivanja bolesti ima ispoljene simptome ^{38,39}.

Centralno lokalizovani tumori javljaju se u glavnom bronhu, ili lobarnom bronhu, ili u proksimalnom delu segmentnog bronha. Najčešće su praćeni kašljem i otežanim disanjem usled opstruktivnog poremećaja ventilacije. Takođe kod ovakve lokalizacije mogu se javiti hemoptizije, »sviranje u grudima« ili stridor, a kod postojanja postopstruktivnog pneumonitisa javlja se i febrilnost.

Kada su tumori periferne lokalizacije najčešći simptomi su kašalj, dispneja usled restriktivnog poremećaja ventilacije, i bolovi.

Simptomi intratorakalnog ekstenzivnog rasta tumora:

a) Pancoast tumor ili superior sulkus tumor

Karcinom koji raste u plućnom vrhu u blizini brahijalnog plexusa i često prodire u VII vratni i I grudni pršljen, što je praćeno intenzivnim bolom u ramenu sa širenjem duž ulnarne regije ruke. Većina ovih tumora probija plućnu maramicu i urasta u zid grudnog koša, vrši destrukciju I i II rebra. Zbog invazije ogranaka i gangliona vratnog simpatikusa može se ispoljiti Hornerov sindrom (unilateralna ptoza, mioza, enoftalmus i anhidroza lica).

b) Sindrom gornje šuplje vene

Sindrom gornje šuplje vene je u oko 46% do 75% posledica karcinoma pluća. U kliničkoj slici dominiraju otok lica i vrata, pletora, prošireni venski sudovi u koži vrata, ramena i gornjeg dela grudnog koša, a praćen je bolom, dispnejom, glavoboljom, vrtoglavicom, kašljem, pa i disfagijom.

c) Paraliza rekurentnog (povratnog) nerva

Najčešća je kod tumora levog gornjeg plućnog reznja i praćena je promuklošću.

d) Pareza freničnog (prečaznog) nerva

Usled pareze nervusa frenicusa kupola dijafragme je podignuta, a pri disanju se paradoksalno pokreće.

f) Zahvatanje plućne maramice i dijafragme

Zahvatanje plućne maramice karcinomom pluća javlja se u oko 15% bolesnika. Kod takvog rasta tumora obično nastaje pleuralni izliv, a stanje je praćeno bolom, otežanim disanjem, brzim zamaranjem, gušenjem, kašljem.

e) Zahvatanje zida grudnog koša

Prodiranje tumora u zid grudnog koša dovodi do intenzivnog bola na mestu urastanja tumora.

f) Zahvatanje perikarda i srca

Perikardijalni izliv javlja se u 5% do 10% obolelih od karcinoma pluća. Najčešće se manifestuje dispneom i ortopneom. Može dovesti do iznenadnih aritmija ili do srčane slabosti, a u slučajevima preteće tamponade ili tamponade manifestuje se kao šokno stanje.

g) Zahvatanje jednjaka

Može biti posledica direktnog urastanja tumora u jednjak ili posledica kompresije od strane uvećanih limfnih čvorova.

Simptomi i znaci izazvani ekstratorakalnim širenjem karcinoma pluća:

a) Metastaze u centralnom nervnom sistemu

Kod približno 10-20% obolelih od karcinoma pluća u vreme postavljanja dijagnoze postoje metastaze u centralnom nervnom sistemu, dok se u daljem toku bolesti javljaju u znatno većem procentu. Uzrokuju glavobolju, muku, povraćanje, izmenu mentalnog statusa, fokalne neurološke ispade (motorne ispade, hemiparezu, ataksiju, afaziju...).

b) Metastaze u jetri

Javljaju se kod 35% bolesnika, a praćene su gubitkom apetita, bolom u trbuhu, mučninom.

c) Metastaze u nadbubrežnim žlezdama

Nadbubrežne žlezde predstavljaju jedan od najčešćih metastatskih lokusa karcinoma bronha, a uz to ove metastaze su najčešće „klinički neme“.

d) Metastaze u kostima

Najčešće su zahvaćena pršljenska tela, rebra, karlica, butna kost, a kao posledica ovih metastaza javljaju se intenzivni bolovi, patološke frakture, neurološki ispadi ³⁸⁻⁴⁰...

Paraneoplastični sindromi

Nastaju kod 10 do 20% bolesnika, kao posledica stvaranja sistemskih faktora (polipeptidni hormoni, citokini, amini, hormonima slične supstance, imuni kompleksi, antitela...) od strane karcinoma pluća. Ispoljavaju se u obliku sistemskih, endokrinoloških, neuroloških, kožnih, hematoloških i bubrežnih manifestacija. Sistemske manifestacije su najčešće nespecifične i uključuju gubitak apetita, gubitak telesne mase i povišenu telesnu temperaturu. Ektopična sekrecija adrenokortikotropnog hormona (najčešće kod mikrocelularnog karcinoma) dovodi do Cushing-ovog sindroma kod 30 do 50% bolesnika i loš je prognostički znak. Kada tumor produkuje supstancu sličnu paratiroidnom hormonu nastaje nemetastatska hiperkalcemija, neurološki simptomi, dehidracija, oštećenje bubrežne funkcije zbog hiperkalcemije, pa čak i hipokalemijska alkalozna. Kod 70% bolesnika sa karcinomom pluća javlja se sindrom pojačane sekrecije antidiuretskog hormona (*Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion -SIADH*), a kao posledica nastaju anoreksija, mučnina, povraćanje, sniženje natrijuma. Subakutna senzorna neuropatija, encefalomijelitis, *Lambert-Eaton-ov* mijastenični sindrom, nastaju kao posledica autoimune reakcije usled stvaranja antitela protiv nervnog tkiva (najčešće kod mikrocelularnog karcinoma). Promene u perifernoj krvi u vidu anemije, leukemoidne reakcije, tromboze, poremećaja hemostaze, diseminovane intravaskularne koagulacije postoje kod 25 do 35% bolesnika (češće kod adenokarcinoma). Često se paraneoplastični sindromi ispoljavaju u vidu dermatozna poput eritematozne hiperkeratoze, hiperpigmentne seboroične dermatoze, hipertrichoze ili *acanthosis nigricans*-a. Veoma često se javlja hipertrofična osteoartropatija koju karakteriše trijas: maljičasti prsti, periosealna proliferacija kosti i artritis (obično kolena, skočni i zglobovi ruku) ³⁸⁻⁴¹.

1.7. Dijagnostički postupci

Radiološka dijagnostika tumora pluća

Radiografija grudnog koša je najčešće korišćen metod vizualizacije promene u plućima. Najčešći histološki tipovi karcinoma pluća imaju svoje uobičajene radiološke karakteristike:

- Adenokarcinom je na radiografiji lokalizovan najčešće periferno, obično je manji od 4cm, retko ekskaviran, a u preko 50% ovih karcinoma viđa se uvećenje limfnih čvorova hilusa i medijastinuma. Mogu se razlikovati spororastući čije je vreme udvostručavanja duže od godinu dana i brzorastući koji imaju vreme udvostručavanja kraće od godinu dana. Bronhioloalveolarni (prema novoj klasifikaciji lepidični) karcinom (podtip adenokarcinoma) javlja se kao solidan tumor u 41%, kao multicentričan u 36% ili kao difuzna bolest u 22% (kod njega su retko uvećani hilarni i medijastinalni limfni čvorovi).
- Skvamozni karcinom je obično centralno lokalizovan, često ekskaviran i udružen sa segmentnom ili lobarnom atelektazom.
- Makrocelularni karcinom se radiološki prezentuje najčešće kao nepravilna tumorska masa.
- Mikrocelularni na radiografiji pluća najčešće je lokalizovan centralno, spojen sa hilusom i prećen uvećanim limfnim čvorovima medijastinuma ⁴².

Kompjuterizovana tomografija (MSCT-multislice computed tomography)izuzetno je važna u detekciji plućnih promena manjih od 10 mm, uvećanih limfnih čvorova, zahvaćenosti pleure, zida grudnog koša, kao i vaskularnih struktura ⁴³.

Magnetna rezonancija (MR) ima prednosti u odnosu na CT kod superior sulkus tumora, za procenu aortopulmonalnog prozora, zahvatanja struktura zida grudnog koša, pleure, koštanih struktura i dijafragme ⁴³.

Virtuelna bronhoskopija je kombinacija spiralnog CT-a i virtuelnih kompjuterskih tehnika kojima se vrši trodimenzionalna (3D) rekonstrukcija slike disajnih puteva. Postoji unutrašnji (interni) prikaz kojim se rekonstruiše intraluminalni izgled koji imitira endoskopski pregled, i

spoljašnji (eksterni) prikaz koji rekonstruiše izgled okolnih struktura i limfnih čvorova u odnosu na disajne puteve ⁴⁴.

Pozitronska emisiona tomografija (PET) zasnovana je na merenju koncentracije pozitronne emisije radioizotopa ¹⁸F-fluorodezoksiglucose (FDG). Zahvaljujući osobini tumorskih ćelija da pojačano unose i metabolišu glukozu FDG dospeva u ćelije kao analog glukoze, s tim da se neko vreme akumulira upravo u ćelijama koje ga pojačano unose. Usled različite metaboličke aktivnosti tumorskih ćelija u odnosu na zdrave ćelije moguće je izmeriti preuzimanje FDG pri čemu se uobičajeno koristi tzv. *Standardized Uptake Value* (SUV). PET-CT ima značaj u detekciji fokalnih plućnih promena, metastaza u limfnim čvorovima, kostima, nadbubregu, jetri, mozgu ^{45,46}.

Uzorkovanje ćelija i tkiva iz traheobronhijalnog stabla za citološku i patohistološku dijagnostiku

- Citološki se može analizirati sadržaj koji se iskašlje ujutru ili nekoliko časova posle bronhoskopije.
- Fleksibilna fiberoptička bronhoskopija ima ključnu ulogu za dobijanje dijagnostičkog materijala, kao i u proceni stadijuma karcinoma pluća. Kod endoskopski vidljivih tumora uzima se nekoliko bioptičkih uzoraka za patohistološku (PH) analizu, a za citološki pregled uzima se aspirat, »brushing« (pomoću četkice) tumorske proneme i otisci bioptičkih uzoraka. Kod perifernih tumora radi se bronhioalveolarna lavaža za citološki pregled, a transbronhijalna biopsija (TBB) za PH analizu. Kod perifernih tumora, kod submukoznih lezija i izmenjenih limfnih čvorova uzorci za citološku analizu mogu se dobiti transbronhijalnom iglenom aspiracijom (*transbronchial needle aspiration-TBNA*).
- Florescentna bronhoskopija se koristi za otkrivanje ranih promena u zidu bronha, karcinoma in situ i displazije epitela ⁴⁴.
- Transtorakalnom iglenom aspiracijom i biopsijom (pod kontrolom rentgena, tj. fluoroskopa, ultrazvuka ili skenera) dobijaju se uzorci za citološki pregled i PH analizu⁴².

Za dijagnostiku pleuralnog izliva uzorak za citiološku analizu dobija se torakocentezom, a za patohistološku analizu uzorak se može dobiti slepom biopsijom pleure Abramsovom iglom ili pleuroskopijom koja omogućava bioptiranje promena kako na parijetalnoj, tako i na visceralnoj pleuri. Videoasistirana torakoskopija (*VATS*) omogućava preciznu vizuelnu procenu pleuralnog prostora, pleure i struktura medijastinuma. U dijagnostici proširenosti bolesti značajna je i medijastinoskopija ⁴⁷. Endobronhijalni ultrazvuk (*endobronchial ultrasound-EBUS*) predstavlja kombinaciju ultrazvuka i bronhoskopije, a koristi se za procenu invazije struktura medijastinuma ⁴⁴.

1.8. Patohistološka klasifikacija nesitnoćelijskih karcinoma pluća

Raznolikost ćelija tumora pluća posledica je raznovrsnosti normalnih tipova ćelija duž traheobronhijalnog stabla i njihovih pluripotentnih ćelija preteča. Od nediferentovane submukozne žlezdane ćelije nastaju serozne, mukozne tubularne ćelije, duktalne, cilijarne i mioepitelijalne ćelije. Od bazalnih i progenitorskih kuboidnih ćelija nastaju kuboidne epitelne, cilijarne i peharaste ćelije. Prelazne bronhoalveolarne ćelije su takođe pluripotentne i iz njih se mogu razviti kuboidne, cilijarne, peharaste, alveolarne ćelije tip I i tip II. Neuroendokrine, sekretorne ćelije nalaze se u proksimalnom delu respiratornog trakta. Alveolarne ćelije tip I i tip II su tipične za distalni alveolarni deo pluća. Epitelnih ćelija proksimalnog dela respiratornog trakta mogu se maligno transformisati u skvamocelularni karcinom. Iz neuroendokrinih i sekretonih ćelija proksimalnog i prelaznog dela mogu da nastanu mikrocelularni karcinomi. Iz alveolarnih ćelija tip II ili iz Clara ćelija mogu nastati adenokarcinomi. Specifičnost populacije matičnih (*stem*) ćelija respiratornog trakta doprinosi raznovrsnosti ćelija karcinoma pluća. Pored toga ova raznovrsnost smatra se odgovornom i za nastanak rezistencije na citostatsku terapiju ⁴⁸.

Preinvazive lezije

Promene u regulaciji ćelijske proliferacije predstavljaju prve korake u procesu maligne transformacije. S obzrom na to da genske lezije koje su neophodne za maligni genotip češće nastaju

prilikom ćelijske deobe, veća je verovatnoća da malignu transformaciju pretrpi hiperproliferisani epitel. Upravo iz tog razloga hiperplazija epitela predstavlja prvu morfološki prepoznatljivu preinvazivnu leziju bronhijalnog epitela. Skvamozna metaplazija je sladeći korak prema displaziji i nastanku „karcinoma in situ“. Odgovor svake mukozne membrane na hroničnu iritaciju je pojačano stvaranje sekreta (mukusa). Ta pojačana sekrecija javlja se kao posledica povećanja broja mukoznih – peharastih ćelija. Hiperplazija bazalnih ćelija označava prisustvo tri ili više nivoa bazalnih ćelija, koje mogu imati ulogu rezervnih ćelija i praktično mogu kompletno zameniti redove diferenciranih ćelija, a da pri tome ne pokazuju atipiju. Skvamozna metaplazija nastaje kada se respiratorni epitel zameni zadebljalim skvamoznim epitelom, sa zonom bazalnih ćelija i intermedijarnom zonom krupnijih ćelija. Može postojati i keratinizacija, ali bez atipije. Skvamozna metaplazija obično nastaje kao posledica hronične iritacije bronhijalne sluznice. Treba napomenuti da skvamozna metaplazija ne mora napredovati u skvamoznu displaziju i karcinom in situ. Skvamozna displazija i karcinom in situ su prepoznatljive prekursorske lezije za nastanak bronhogennog skvamocelularnog karcinoma, kao i za mikrocelularni karcinom. Displazija može biti blaga, umerena ili teška.

Atipična adenomatozna hiperplazija predstavlja preteču, odnosno preinvazivnu leziju adenokarcinoma i podrazumeva proliferaciju ćelijskih linija sa blagom ili umereno izraženom atipijom u alveolarnim ili respiratornim bronhiolama. Inače se radi ili o Clara ćelijama ili o alveolarnim ćelijama tip II ⁴⁹.

Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*-WHO) je 1967., 1981. i 1999. godine preporučila patohistološku klasifikaciju karcinoma pluća koja se primarno bazirala na uzorcima dobijenim resekcijom tumora, upotrebi svetlosnog mikroskopa i bojenja hematoksilin-eozinom. Međutim, s obzirom na to da je oko 70% karcinoma pluća neresektabilno, jer se radi o pacijentima koji pri otkrivanju već imaju uznapredovalu bolest, najčešće dostupan dijagnostički materijal čine mali bioptirani tkivni uzorci ili citološki uzorci tumora. Prvi put su u patohistološku klasifikaciju karcinoma pluća uključeni citološki uzorci 2004. godine, ali bez uključivanja malih bioptiranih tkivnih uzoraka. Zahvaljujući značajnom napretku u razumevanju onkogeneze tumora pluća, postojala je potreba da se revidira postojeća klasifikacija bazirana na histomorfologiji i kao rezultat multidisciplinarnog pristupa kojim su uključeni molekularni biolozi, radiolozi, hirurzi i patolozi, 2011. godine plasirana je nova patohistološka klasifikacija karcinoma

pluća koja je bazirana na malim tkivnim i na citološkim uzorcima. Ovu klasifikaciju su predložili *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, *American Thoracic Society (ATS)* i *European Respiratory Society (ERS)* ⁵⁰.

Izvod iz WHO PATOHISTOLOŠKE KLASIFIKACIJE NESITNOĆELIJSKIH KARCINOMA PLUĆA iz 2004.godine

Skvamocelularni karcinom

sitnoćelijski,
svetloćelijski,
papilarni,
bazaloidni.

Adenkarcinom

mešoviti,*

acinarni,

papilarni,

bronhioloalveolarni (BAC)*:

- *nemucinozni,**
- *mucinozni,**
- *mešoviti nemucinozni i mucinozni ili nedeterminisani,**

solidni sa produkcijom mucina:

- fetalni adenoakrcinom*
- mucinozni (koloidni) adenokarcinom
- mucinozni cistadenokarcinom*
- “Signet ring” adenokarcinom*
- svetloćelijski karcinom*

Krupnoćelijski karcinom

neuroendokrini

- kombinovani krupnoćelijski karcinom,
bazaloidni,
limfoepiteliomu sličan,
svetloćelijski

sa rabdoidnim fenotipom.

Adenoskvamozni karcinom

Sarkomatoidni karcinom

pleomorfni,
vretenastoćelijski,
gigantocelularni,
karcinosarkom,
plućni blastom ⁵¹.

Postoje značajne izmene i preporuke koje je donela IASLC/ATS/ERS klasifikacija iz 2011. godine, a koje se odnose kako na resekcione tkivne uzorke, tako i na male uzorke dobijene biopsijom i citološke uzorke (u prethodnoj klasifikaciji su * označeni oni tipovi karcinoma koji su pretrpeli izmene):

- Kod invazivnih adenokarcinoma neohodno je sveobuhvatno histološko tipiziranje. Ne koristi se više izraz “mešoviti tip karcinoma”, već se klasifikacija vrši prema predominantnom tipu karcinoma, dok se ostale histološke slike označavaju u vidu procenata.
- Kod pacijenata sa većim brojem plućnih adenocarcinoma, preporuka je da se histološki verifikuje da li su u pitanju metastaze, ili odvojeni sinhroni ili metahroni primarni tumori.
- Raniji mešoviti tip sa predominantnim nemucinoznim BAC sada se označava kao predominantno lepidični adenokarcinom (*Lepidic predominant adenocarcinoma -LPA*)
- Izdvaja se i predominantno **mikropapilarni** adenokarcinom, kao histološki važan podtip, koga karakteriše agresivna proroda i loša prognoza (kao kada su u pitanju o solidni adenokarcinomi)
- Raniji mucinozni BAC se označava kao mucinozni adenokarcinom.
- Redukuje se korišćenje NSČKP, zbog potrebe za specifičnijom dijagnozom, te je potrebno kad god je moguće NSČKP klasifikovati kao skvamocelularni ili kao adenokarcinom
- Ako tumori ne mogu da se dijagnostikuju kao skvamozni i adenokarcinomi prema WHO klasifikaciji iz 2004. godine, preporučena je nova terminologija NSČKP najverovatnije skvamocelularni ili NSČKP najverovatnije adenokarcinom.
- Mucinozni cistadenokarcinom se pridružuje koloidnom karcinomu

- Uklanjaju se svetloćelijski (*clear cell*) i signet ring kao podtipovi
- Uvodi se termin enteričnog adenocarcinoma
- Fetalni adenokarcinom se jasno razdvaja u dva entiteta *low* i *high grade*

Ranije korišćen termin BAC više nije u upotrebi jer se sada praktično reklasifikuje u 5 različitih entiteta: 1)adenocarcinoma in situ (AIS) - mali solitarni adenokarcinom promera do 3cm sa čisto lepidičnim rastom (karakteriše ga 100% 5-godišnje preživljavanje posle kompletne resekcije); 2)minimalno invazivni adenokarcinom (MIA) - mali solitarni adenokarci-nom promera do 3cm sa čisto lepidičnim rastom i fokalnom invazijom promera do 0,5mm (karakteriše ga 100% 5-god-išnje preživljavanje posle kompletne resekcije);3) invazivni adenokarcinom sa lepidičnom komponentom;4) invazivni mucinozni adenokarcinom (ranije mucinozni BAC); 5)uznapredovali adenokarcinom sa lepidičnom komponentom ⁵².

Novi pristup patohistološkoj dijagnostici podrazumeva poštedno, odnosno minimalno trošenje bioptiranog tkiva da bi se sačuvalo za potrebne molekularnih analiza. Ukoliko je moguće potrebno je opredeliti se prema morfološkim kriterijumima da li se radi o adeno- ili skvamocelularnom karcinomu. Kod adenokarcinoma se može uočiti žlezdana diferencijacija sa lepidičnom, acinarnom, papilarnom, mikropapilarnom ili solidnom građom. Ukoliko se ovi tipovi građe uočavaju, treba ih pomenuti u opisu. Inače za ćelije adenokarcinoma je karakteristična bazofilna citoplazma, koja može biti homogena, granulirana, penasta, tipično je prozirna, sa citoplazmatskim vakuolama, ekscentrično položenim jedrima. Hromatin može varirati od uniformnog fino granuliranog do hiperhromtičnog sa neravnomernom distribucijom. Većina ćelija ima po jedno veliko jedarce (nukleolus). Ćelije mogu biti pločasto ili loptasto raspoređene, kao pseudopapilarne nakupine, ili prave papile sa centralnom fibrovaskularnom potkom, ili kao acinarne, palisadne strukture, ili nepravilne sačaste. Sa druge strane skvamoznu diferencijaciju karakterišu keratinizacija, perlasti raspored i intracelularni mostići. Citoplazma je neprovidna i gusta. Ćelije često imaju zaobljen ili izdužen izgled sa jasno definisanim granicama, a ponekad se mogu videti i ćelije čija je citoplazma u obliku repa ili punoglavca. Jedra su obično solitarna, centralno postavljena, hiperhromatična, sa pravouglim ili uglastim ivicama. Hromatin je veoma gust, homogen, piknotičkog izgleda, dok su jedarca nerazvijena. Kada se na osnovu morfologije ne može odrediti da li se radi o adeno ili skvamocelularnom karcinomu, potrebno je histohemijsko bojenje mucina i/ili imunohistohemijska analiza radi patološke dijagnoze. Treba napomenuti i to

da se neki adenokarcinomi prezentuju kao „pseudoskvamozni“. Preporuka je da se koristi tiroidni transkripcioni faktor-1 (TTF-1) kao najpouzdaniji marker za adenokarcinome. Za skvamoznu histologiju se preporučuje p63, ali se u novije vreme kao specifičniji pokazao polikonski p40. Kod čak 20% do 30% adenokarcinoma može se javiti fokalno ili slabo prebojavanje sa p63! Preporuka je da se ne koristi izraz NSČKP ni za male uzorke, već da se kada su TTF-1 pozitivni, p63 negativni koristi termin NSČKP, naverovatnije adenokarcinom, odnosno kada je negativno bojenje mucina, TTF-1 negativno i p63 pozitivno (makar i slabo pozitivno) opredeliti se da se radi o NSČKP, najverovatnije skvamocelularnom (*NSCLC, favor adenocarcinoma /NSCLC, squamous carcinoma*). Kada je u istom uzorku jedna grupa ćelija pozitivna na TTF-1, a druga pozitivna na skvamozne markere raste verovatnoća da se radi o adenoskvamoznom karcinomu, ali takvu dijagnozu treba postaviti samo na resekcionom uzorku, tako da je preporuka da se takav tumor označi kao *Not otherwise specified (NOS)*. Sa druge strane ukoliko morfološki i IHH nije moguće opredeliti se da li je verovatnije da se radi o adeno ili skvamocelijski karcinom, preporuka je klasifikovati ga kao *Not otherwise specified (NOS)*. Tumore koji su morfološki nejasni, a TTF-1 negativni i diskretno ili fokalno p63 pozitivni treba svrstati u *Not otherwise specified (NOS)*. Tumori koji ne pokazuju skvamoznu morfologiju, a kod kojih postoji koekspresija TTF-1 i p63 najverovatnije pripadaju adenokarcinomima. Kod suspektne neuroendocrine morfologije obavezno se koriste neuroendokrini imunohistohemijski marker⁵⁰. Važno je napomenuti da je praktično svaki NSCLC-NOS; NSCLC verovatno adenokarcinom ili NSCLC verovatno skvamocelularni zapravo slabodiferentovani karcinom⁵⁰.

Veoma je veliki značaj nove klasifikacije tumora upravo zbog mogućnosti korišćenja histološke dijagnoze kao prediktora za ishod terapije kod pacijenata u odmaklom stadijumu bolesti. Primer je histološka dijagnoza adenocarcinoma kao pozitivnog prediktora za ishod terapije pemetreksedom. Takođe je značajno napomenuti da je kontraindикована primena bevacizumaba kod pacijenata sa svkamocelularnim karcinomom, zbog potencijalnog fatalnog krvavljenja. Za lečenje adenocarcinoma za sada su značajni molekularni markeri kao što je EGFR, KRAS, EML4-ALK fuzija⁵⁰.

1.9. Imunohistohemijska analiza u dijagnostici nesitnoćelijskih karcinoma pluća

Imunohistohemijska analiza je nezaobilazna procedura u dijagnostici tumora pluća, ne samo kao dopuna kod morfološke klasifikacije primarnih karcinoma pluća, već je i od neprocenljivog značaja za orijentaciju da li je adenokarcinom plućnog ili vanplućnog porekla. Ipak ova dijagnostička procedura ima i svoje nedostatke, odnosno ograničenja. Ne postoji univerzalni sistem procene i praktično intenzitet bojenja, kao i proporcija obojenih ćelija utiču na interpretaciju rezultata i takozvani „cut-off“ nivo, tj. nivo preseka. Za neka antitela i njihovu primenu kod određenih tumora postoje na stotine publikovanih radova sa ujednačenim rezultatima, dok su za druga antitela i tumore objavljeni radovi sa dijametralno različitim rezultatima. Razlozi za ovakvu raznovrsnost kada su rezultati u pitanju često su neobjašnjivi. Senzitivnost antitela može se dobiti iz rezultata objavljenih radova, ali kada je specifičnost u pitanju postoje izvesni probemi. Zapravo numerička vrednost specifičnosti je primenljiva samo za binarnu klasifikaciju, kao na primer za razlikovanje plućnog adenokarcinoma, od adenokarcinoma poreklom iz debelog creva ili za razlikovanje plućnog adenokarcinoma i mezotelioma. Treba biti svestan činjenice da ne postoji apsolutno specifično antitelo ⁵³.

TTF-1

Najvažniji za imunohistohemijsku dijagnostiku plućnih karcinoma jeste tiroidni transkripcioni faktor 1 (TTF-1). Molekulska težina ovog tkivno specifičnog jedarnog transkripcionog proteina Nkx2 familije gena je 38 kilodaltona (kDa). Humani TTF-1 polipeptid sadrži 371 aminokiselinu. Njegova ekspresija je pod kontrolom nekoliko gena, a jedan od tih gena je HOXB3. Ovaj gen se eksprimira u ranoj embriogenezi u prednjem neuroektodermu i branhijalnim lukovima i njihovim derivatima, uključujući i regiju iz koje će se razviti štitasta žlezda, kao i štitastu žlezdu. U štitastoj žlezdi TTF-1 aktivira transkripciju promotera tiroid-specifičnih gena vezivanjem za njih i na taj način ima jednu od ključnih uloga u njenoj diferencijaciji. U plućima HOXB3 je glavni regulatorni gen za promotore apoproteina surfaktanta A,B,C i D, Clara ćelijski antigen i T1a. Ekspresija TTF-1 se normalno javlja u pneumocitima tip II, epitelijalnim ćelijama štitaste žlezde, određenim moždanim regijama, prednjoj pituitarnoj i paratiroidnoj žlezdi. Za normalnu morfogenezu i funkciju pluća neophodna

je grupa transkripcionih faktora u koje se ubraja i TTF-1. To su: FOX, GATA, SOX i ETS. Za razliku od njih, druga grupa proteina: POD1, GLI, HOX i FOXF1, imaju važnu ulogu u razvoju mezenhima pluća, krvnih sudova pluća i bronhijalnih glatkih mišića. TTF-1 ima veoma važnu ulogu u razvoju cilijarnih i necilijarnih ćelija bronhijalnog, bronhiolarnog i alveolarnog epitela. Ekspresija TTF-1 javlja se u fetalnim plućima u 11 nedelji gestacije, a kasnije tokom razvoja njegova ekspresija opada, tako da perzistira u 39-oj nedelji u manjem broju bronhijalnih, bronhiolarnih i alveolarnih ćelijama tip II, dok su alveolarne ćelije tip I negativne. Ukoliko se ekspresija TTF-1 ne smanji posle 24 nedelje gestacije javlja se hipoplazija pluća. TTF-1 je široko primenjen kao imunohistohemijski (IHH) marker za karcinome pluća i štitaste žlezde. Nivo pozitivnosti TTF-1 varira i javlja se kod oko 84% sitonćelijskih karcinoma, 77% adenokarcinoma i 8% skvamocelularnih karcinoma. Za TTF-1 je dijagnostički informativno prebojavanje jedra. Kao pozitivno prebojavanje se računa čak i samo fokalno prebojavanje u tumoru (1% do 10% tumorskih ćelija). Kod oko 10% TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma prebojavanje je prisutno u manje od 10% neoplastičnih ćelija. Citoplazmatsko prebojavanje varira od klona TTF-1, zavisno od dobavljača, kao i pufera koji se koristi, tako da je češće ako se kao pufer koristi EDTA u odnosu na DTRS⁵³.

P63

P63 je član porodice p53 tumor supresor gena. Lociran je na hromozomu 3q27-29. Kodira šest različitih transkripcija sa transaktivacijom (Tap63) ili negativnim efektima (Δ Np63) na p53 reporter gene, što dovodi do tumor supresorskog ili do onkogenog efekta. Izoforma Δ Np63 onemogućava transaktivaciju N-terminalnog domena i dovodi do inhibicije p53. Ekspresija p63 prisutna je dominantno kod skvamocelularnih karcinoma, kao i kod karcinoma urotela. Preporučeni „Cut off“ nivo je 10% pozitivnih tumorskih ćelija⁵³.

Ostali markeri

Napsin A je eksprimiran u pneumocitima tip II i ima značajnu ulogu u procesu sinteze surfaktanta, a nalazi se i u alveolarnim makrofagima što ga dovodi u vezu sa procesom fagocitoze. Pozitivan je u oko 82% primarnih adenokarcinoma pluća, a oko 5% adenokarcinoma vanplućnog porekla je takođe pozitivno na napsin. Proteini surfaktanta A, B, C i D, *Clara* ćelijski protein su eksprimirani u oko 63% primarnih plućnih karcinoma, ali i u oko 46% metastatskih, uključujući i karcinome dojke⁵³.

Neuroendokrini markeri kao što su hromogranin A, hromogranin B i hromogranin C detektuju se kod skoro svih neuroendokrinih tumora. U Neuroendokrine markere se ubrajaju i sinaptofizin , CD 56 i neuron specifična enolaza.

Citokeratini (CK) 5, 6 i 14 su karakteristični za skvamocelularnu diferencijaciju, dok je za adenokarcinome karakteristično da su CK 7 pozitivni i CK 20 negativni ⁵³.

1.10. TNM klasifikacija

Određivanje stadijuma karcinoma pluća zavisi od njegove od anatomske lokalizacije i širenja. Internacionalni sistem klasifikacije karcinoma pluća bazira se na definiciji tumora (**T**), postojanja metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (**N**) i udaljenih metastaza (**M**). **TNM** klasifikacija je proistekla iz rada Pierre Denoix-a objavljenog četrdesetih godina prošlog veka. Međunarodna unija za borbu protiv karcinoma (Union Internationale Contre le Cancer-UICC) i Američki udruženi komitet za karcinom (American Joint Committee on Cancer-AJCC) adaptirali su i doprineli standardizaciji TNM klasifikacije. Ova klasifikacija je doživela više revizija, a aktuelno sedmo izdanje je proisteklo iz sugestija Internacionalne asocijacije za proučavanje karcinoma pluća (International Association for the Study of Lung Cancer-IASLC) ⁵⁴.

Definicija tumora (**T**)

T_x- citološkim pregledom je dokazan tumor, ali se ne može videti radiografski niti bronhoskopskim pregledom.

T₀- ne postoji dokaz o primarnom tumoru.

T_{is}- karcinoma in situ.

T₁- tumor veličine do 3cm, okružen plućima ili visceralnom pleurom, lokalizovan distalno od lobarnog bronha.

T_{1a}- tumor veličine do 2 cm;

T_{1b}- tumor veličine od 2 do 3cm;

T2- tumor veći od 3 cm i veličine do 7cm; ili tumor glavnog bronha udaljen više od 2cm od karine traheje; ili zahvata visceralnu pleuru; ili sa opstruktivnim pneumonitisom ili atelektazom koja zahvata hilarnu regiju, ali ne zahvata celo pluće.

T2a- tumor veličine od 3 do 5cm;

T2b- tumor veličine od 5 do 7cm;

T3- tumor veći od 7cm ili tumor:

- direktno zahvata zid grudnog koša; i /ili dijafragmu; i/ili medijastinalnu pleuru; i/ili parijetalni perikard; i/ili frenični nerv; i/ili je u glavnom bronhu lokalizovan na manje od 2 cm od karine traheje, ali je ne zahvata;

-i/ili je udružen sa opstruktivnim pneumonitisom ili atelektazom celog pluća;

- i/ili sa odvojenim tumorskim nodusom /nodusima/ u istom režnju.

T4- tumor ma koje veličine koji zahvata medijastinum; i/ili srce; i/ili velike krvne sudove; i/ili traheju; i/ili karinu traheje; i/ili jednjak; i/ili kičmeni pršljen (pršljenove); i/ili rekurentni laringealni nerv;

- i/ili sa odvojenim tumorskim nodusom /nodusima/ u drugom istostranom režnju.

Definicija prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (**N**)

Nx- ne mogu se dokazati metastaze u regionalnim limfnim čvorovima.

N0- bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

N1- metastaze u istostranim peribronhijalnim i/ili hilarnim limfnim čvorovima; ili zahvatanje ovih limfnih čvorova direktnom invazijom tumora.

N2- metastaze u istostranim medijastinalnim limfnim čvorovima i/ili u subkarinealnim limfnim čvorovima.

N3- metastaze u medijastinanim i hilarnim limfnim čvorovima sa suprotne strane; ili u skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima sa iste i/ili sa suprotne strane.

Definicija udaljenih metastaza (**M**)

M0- bez udaljenih metastaza.

M1- postoje udaljene metastaze;

M1a- odvojeni tumorski nodus(i) u režnju sa suprotne strane; tumor sa pleuralnim nodusima/ ili maligni pleuralni i/ili maligni perikardni izliv.

M1b-udaljene metastaze.

Sinhroni multipli tumori pluća klasifikuju se svaki posebno, a terapijski pristup „diktira“ tumor koji ima lošiju prognozu.

Na osnovu TNM klasifikacije određuju se stadijumi proširenosti bolesti po internacionalnom „staging“ sistemu ⁵⁴ .

Stadijumi bolesti

Okultni	Tx N0 M0
0	Tis N0 M0
I A	T1a N0 M0 T1b N0 M0
I B	T2a N0 M0
II A	T1a N1 M0 T1b N1 M0 T2b N0 M0 T2a N1 M0
II B	T2b N1 M0 T3 N0 M0

III A	T1 ili T2 N2 M0 T3 N1 ili N2 M0 T4 N0 ili N1 M0
III B	bilo koji T N3 M0 T4 N2 M0
IV	bilo koji T bilo koji N M1a bilo koji T bilo koji N M1b

1.11. Lečenje obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća

1.11. 1. Hirurško lečenje NSĆKP

Hirurško lečenje predstavlja najefikasniji oblik lečenja obolelih od NSĆKP, koji pruža najveće šanse za izlečenje ⁵⁵. Nažalost, svega 20% do 25% NSĆKP se otkriva u I ili II stadijumu bolesti. Pored toga petogodišnje preživljavanje ovih ranih stadijuma bolesti, posle kompletne hirurške resekcije iznosi od 40% do 50% ⁵⁶. Tumor je resektabilan ukoliko postoji mogućnost kompletnog uklanjanja samog tumora i njegovog lokalnog širenja. Hirurško lečenje sprovodi se u slučaju okultnog karcinoma pluća (ako je moguće lokalizovati režanj u kome je njegovo ishodište), kao i u I, II i IIIA stadijumu NSĆKP ⁵⁷.

Zbog invazije vitalnih struktura (T4) ili limfogene diseminacije bolesti supraklavikularno, ili kontralateralno medijastinalno (N3), IIIB stadijum bolesti definiše se kao neresektabilan. Ukoliko se sprovodi preoperativna indukciona hemioterapija i radijaciona terapija moguće je povećati resektabilnost i lokalnu kontrolu bolesti, ali sa skromnim uticajem na ukupno preživljavanje. Kod manjeg broja operisanih sa T4N0 petogodišnje preživljavanje je 19%. Ukoliko se sprovede postoperativna radijaciona terapija lokalna kontrola bolesti je bolja, ali nema

značaja za preživljavanje ⁵⁷. Primena postoperativne adjuvantne hemioterapije poboljšava petogodišnje preživljavanje za oko 5% ⁵⁶.

Hirurško lečenje moguće je sprovesti i u slučaju IV stadijuma bolesti ako postoje solitarne sinhronne ili metahrone metastaze u CNS-u ili u nadbubregu ⁵⁷.

1.11. 2. Radijaciona terapija NSČKP

Radijaciona terapija (RT) se u lečenju NSČKP može koristiti kao: 1) samostalna; 2) u kombinaciji sa hirurškom i/ili hemioterapijom; 3) palijativna ⁵⁸. Ukupna doza zračenja najčešće iznosi 40 do 70Gy. Zahvaljujući primeni novih tehnologija, iz dvodimenzionalnog (2D) sistem planiranja zračne terapije koje se oslanjala na upotrebu rentgenografskih simulatora, uvođenjem CT simulatora i trodimenzionalnog sistema planiranja (Three-Dimensional Radiation Treatment Planning System-3DTPS) omogućeno je rutinsko izvođenje 3D konformalne radioterapije (3D Conformal Radiation Therapy-3DCTR). Upotrebom 3DCTR postignuta je isporuka visoke doze zračenja u ciljno tkivo uz maksimalnu poštedu okolnog zdravog tkiva i organa ⁵⁹. Postoji nekoliko terapijskih protokola: 1) »*split-course*« protokol kada se dnevno aplikuje do 2Gy tokom 7 do 14 dana, sa pauzom od 2 do 4 nedelje; 2) *hiperfrakcionisano* zračenje kada se aplikuju 2 do 3 frakcije dnevno u dozi 1 do 1,2 Gy po frakciji, sa razmakom od 6 sati u ukupnoj dozi oko 60Gy; 3) *akcelerisano hiperfrakcionisano* zračenje kada se aplikuju 2 frakcije dnevno u dozi od 2Gy tokom tri nedelje i 4) *hipofrakcionisano* zračenje koje se koristi za palijaciju i podrazumeva do 4 frakcije nedeljno kada se aplikuju doze od 3 do 8 Gy dnevno ⁵⁸.

Palijativna radioterapija ima ulogu u kontroli simptoma kao što su hemoptizije, kašalj, bol, dispneja, kao i ulogu u poboljšanju kvaliteta života (kod sindroma gornje šuplje vene, metastaza u centralnom nervnom sistemu, kod invazije traheje i glavnih bronha...). Palijativnu terapiju endobronhijalnih tumora moguće je sprovesti *endobronhijalnom brahiterapijom*, kada se izvor radijacije dovodi kroz fleksibilni kateter koji se plasira pomoću fiberbronhoskopa ⁵⁸.

Radijaciona terapija se može kombinovati sa hemioterapijom (HT) i to konkurentno, što podrazumeva istovremenu primenu RT i HT, ili sekvencijalno, kada se RT sprovodi posle indukcione HT. Ovi kombinovani režimi lečenja imaju značajnu ulogu u postizanju efikasnije kontrole bolesti ⁶⁰.

1.11. 3. Hemioterapija i ciljana terapija NSČKP

Hemioterapija u multimodalnom pristupu lečenja bolesnika sa NSČKP zauzima veoma važno mesto uprkos postizanju značajnih molekularno bioloških i tehnoloških pomaka. Hemioterapija je aktuelna i kao indukciona, i kao adjuvantna terapija, tj. dodatni sistemski tretman u lečenju I do III stadijuma NSČKP, jer kao takva doprinosi uspešnijim rezultatima lečenja. Pored toga i dalje ima izuzetno važnu ulogu u lečenju bolesnika sa uznapredovalim NSČKP. Osnovni ciljevi hemioterapije u slučaju uznapredovale bolesti su poboljšanje kvaliteta života, uklanjanje i redukcija simptoma bolesti, kao i produženje života. Ono što obeshrabruje je ispoljavanje toksičnosti kao i nedovoljna efikasnost hemioterapije. Ipak, istraživanjima koja su se bavila poređenjem rezultata hemioterapije i najbolje potporne terapije/nege (tzv. “best supportive care”) potvrđena je značajna prednost hemioterapije^{5,6}. Prema dosadašnjim kliničkim istraživanjima smatra se da je primena hemioterapije indikovana i opravana kod bolesnika sa performans statusom od 0 do 2⁶¹. Ona poboljšava simptome bolesti (najčešće kašalj, bol, hemoptizije i dispneju) kod oko 50% bolesnika⁶².

Hemioterapijski režimi koji su korišćeni u lečenju NSČKP polovinom osamdesetih i početkom devedesetih godina prošlog veka, bili su bazirani na kombinaciji derivata platine (cisplatin, karboplatin) i drugih citotoksičnih agenasa II generacije (etoposid, mitomicin, vindezin, vinblastin, ciklofosfamid, ifosfamid). Devedesetih godina u kliničku praksu uvode se agensi III generacije:

- gemcitabin-antimetabolit, analog piridina;
- paklitaksel i docetaksel-taksani, inhibitori depolimerizacije mikrotubula;
- irinotecan-inhibitor topoizomeraze II i
- vinorelbine (navelbine)-novi polusintetski vinka alkaloid /61/.
- pemetreksed-antifolatni agens višestruke ciljane aktivnosti (inhibira timidilat sintetazu, dihidrofolat reduktazu i glicinamid ribonukleotidnu formiltransferazu-folat zavisne enzime koji su ključni za *de novo* sintezu timidinskih i purinskih nukleotida⁶³.

Pojavljivanje ovih novih citotoksičnih agenasa je krajem devedesetih prošlog i početnih godina ovog veka rezultovalo u brojnim istraživanjima kojima je procenjivan značaj njihove primene kao monoterapije ili u kombinaciji sa agensima II (najčešće derivatima platine) ili III generacije u terapiji uznapredovalog NSČKP⁶¹. *D'Addario* i saradnici su 2005. godine publikovali opsežnu meta-analizu (37 studija, obuhvaćeno 7633 bolesnika sa uznapredovalim NSČKP) kojom su pokazali da terapijski protokoli bazirani na derivatima platine daju bolju stopu terapijskog odgovora, bez značajne razlike u odnosu na jednogodišnje preživljavanje, uz veću toksičnost, u odnosu na protokole bazirane na drugim citotoksičnim lekovima⁶⁴. *Le Chevalier* i saradnici su objavili meta-analizu 13 randomizovanih istraživanja (obuhvaćeno 4556 bolesnika sa uznapredovalim NSČKP) u kojima je poređen gemcitabin/cisplatin protokol sa drugim protokolima. Jednogodišnje preživljavanje, u poređenju sa protokolima koji u sebi sadrže platinu i agense II generacije, povećano je za 3,9% , srednje preživljavanje iznosilo je 9 meseci (u odnosu na 8,2 meseca). Nije bilo značajne prednosti u odnosu na protokole koji u sebi sadrže platinu i neki od drugih agenasa III generacije⁶⁵. Prednost protokola gemcitabine/cisplatin u odnosu na mitomicine/ifosfamid/cisplatin potvrđena je i randomizovanim istraživanjem *London Lung Cancer Group-a*⁶⁶, dok su *Cardenal* i saradnici potvrdili prednost ovog protokola i u odnosu na protokol etoposid/cisplatin⁶⁷. *Schiller* i saradnici poređenjem sledećih protokola: cisplatin/paklitaksel; cisplatin/gemcitabin; cisplatin/docetaksel i karboplatin/paklitaksel, u okviru velikog istraživanja (E 1594) *Eastern Cooperative Oncology Group-a (ECOG)*, koje je obuhvatilo 1207 bolesnika, nisu našli značajnu razliku u preživljavanju⁶. Istraživači *Southwest Oncology Group-a (SWOG)* objavili su studiju koja je obuhvatila 408 bolesnika sa uznapredovalim NSČKP kojom je potvrđena podjednaka efikasnost protokola karboplatin/paklitaksel i cisplatin/vinorelbin, gde je stopa odgovora na terapiju iznosila 25% i 28%; jednogodišnje preživljavanje 38% i 36% i srednje preživljavanje 8 meseci⁶⁸. U rezultatima studije *Manegolda* i saradnika objavljene 2000. godine ispitivana je efikasnost protokola pemetreksed/cisplatin kod pacijanata sa uznapredovalim NSČKP- ukupna stopa odgovora bila je 39%, srednje preživljavanje 10,9 meseci , jednogodišnje preživljavanje 50%. Kanadska studija čiji su rezultati objavljeni 2001.godine takođe je pratila efikasnost dubleta pemetreksed/cisplatin i ukupna stopa odgovora bila je 45%, srednje preživljavanje 8.9 meseci, dok je jednogodišnje preživljavanje bilo 49%⁶⁹.

U kliničkoj praksi standard u lečenju uznapredovalog NSČKP predstavlja primena do 6 ciklusa hemioterapijskih protokola baziranih na kombinaciji derivata platine i nekog od

pomenutih citostatika III generacije. U randomizovanim istraživanjima koja su poredila stopu odgovora na terapiju i vreme preživljavanja nije bilo značajne razlike u odnosu na broj primenjenih ciklusa hemioterapije (3 ciklusa, u odnosu na 6 ciklusa i 4 ciklusa u odnosu na primenu 8 ciklusa do progresije bolesti), ali je postojala razlika u ispoljavanju toksičnih efekata usled dugotrajnije primene hemioterapije^{70,71}.

Zahvaljujući istraživanju molekularnih osnova, kao i signalnih puteva koji su značajni u procesu karcinogeneze početkom XXI veka došlo je do razvoja molekularne ciljane terapije koja se koristi u lečenju NSČKP:

- Bevacizumab-rekombinovano monoklonsko antitelo koje blokira vaskularni endotelijalni faktor rasta (*Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF*) i primenjuje se kod bolesnika sa neskvamoznim NSČKP, bez hemoptizija
- Erlotinib- inhibitor tirozin kinaznog (*TKI*) receptora epidermalnog faktora rasta (*Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR*). Prema rezultatima faze III *EURTAC* studije koja je poredila efikasnost terapije Erlotinibom u odnosu na HT platinski dublet kod pacijanata sa NSČKP i EGFR pozitivnim mutacijama zabeležen je porast preživljavanja bez progresije bolesti i to 9,7 meseci u odnosu na 5,2 meseca.
- Gefitinib- inhibitor TK. Rezultati III faze *IPASSS* studije pokazali su porast preživljavanja bez progresije bolesti 24,9% kod bolesnika sa neskvamoznim NSČKP koji su primali gefitinib prema 6,7% kod bolesnika koji su primali paklitaksel/karboplatin.
- Afatinib-TKI. Prema rezultatima III faze randomizovane studije povećano je preživljavanje bez progresije bolesti kod primene afatiniba 11,1 mesec u odnosu 6,9 meseci kod bolesnika sa adenokarcinomom i pozitivnim mutacijama EGFR, koji su primali cisplatin/pemetrexed.
- Krizotinib- inhibitor ALK proteina koji se primenjuje kod bolesnika sa ALK translokacijom. Prema rezultatima II faze studije kod bolesnika sa uznapredovalim NSČKP koji su prethodno imali progresiju bolesti beleži se 80% stopa odgovora na terapiju.

- Cetuksimab-monoklonsko antitelo protiv EGFR . Poređenjem efikasnosti HT protokola cisplatin/vinorelbin sa i bez cetuksimaba u sklopu III faze studije *FLEX*, ukupno preživljavanje kod onih koji su dobijali i cetuksimab bilo duže 11,3 meseci u odnosu na 10,1 mesec⁷².

Uobičajeni hemioterapijski protokoli koji se koriste u prvoj liniji u lečenju uznapredovalog NSČKP u prvoj liniji su sledeći:

- Cisplatin ili karboplatin u kombinaciji sa jednim od sledećih citostatika:

paklitaksel, docetaksel, gemcitabin, vinorelbin, etoposid, pemetreksed;

- Bevacizumab uz paklitaksel/karboplatin kod neskvamoznih karcinoma i ECOG PS 0 ili 1;
- Erlotinib ili gefinitinib kod pacijenata sa mutacijom EGFR u 19 i/ili 21 egzonu ;
- Krizotinib kod pozitivne ALK translokacije;
- Cisplatin /pemetreksed kod neskvamoznih karcinoma su efikasnija kombinacija u odnosu na cisplatin/gemcitabin;
- Cisplatin/gemcitabin kod skvamoznih karcinoma su efikasnija kombinacija u odnosu na cisplatin/pemetreksed;
- Cetuksimab uz vinorelbin/cisplatin

Posle jedan do dva ciklusa vrši se procena odgovora na HT, a potom posle svakih 2 do 4 ciklusa. Kada se posle 4 do 6 ciklusa prve linije HT proceni da nema progresije bolesti može se primeniti terapija održavanja i to kao nastavak sa jednim od lekova koji su dati u prvoj liniji ili kao tzv. “switch“ terapija koja podrazumeva uvođenje leka koji nije prethodno korišćen. Ukoliko posle prve linije terapije postoji progresija bolesti preporučuje se kod bolesnika sa ECOG PS 0-2 u zavisnosti od profila tumora druga linija terapije: docetaksel ili pemetreksed ili erlotinib ili krizotinib ⁷².

Prosečna stopa odgovora na terapiju sa novijim agensima i platinom kod uznapredovalog NSČKP iznosi 25% do 35%, vreme do progresije bolesti je 4 do 6 meseci, a prosečno

preživljavanje 8 do 10 meseci ⁷². Uporođo sa napretkom ciljane molekularne terapije u toku su ispitivanja koja su usmerena ka mogućnosti borbe protiv karcinoma putem aktiviranja imunog sistema pacijanta, odnosno ka razvoju imunoterapije. Na žalost vreme do progresije bolesti, kao i prosečno preživljavanje kod uznapredovalog NSČKP i dalje se meri u mesecima i bez obzira na to što se svakodnevno intenzivno traga, pre svega za novim oblicima ciljane terapije, rezultati su i dalje skromni. Individualizovan i pri tome multimodalni pristup zasnovan na karakteristikama pacijenta i karakteristikama tumora se pokazao kao najispravniji dijagnostičko-terapijski pristup.

Jedan od najvećih problema u terapiji karcinoma pluća je postojanje ili razvoj rezistencije malignih ćelija na citostatike. Ova otpornost na različite antitumorske lekove posledica je složenosti i različitih promena u ćelijama karcinoma. Sposobnost ćelije da razvije unakrsnu otpornost, tj rezistenciju na širi spektar strukturno različitih lekova naziva se „*multidrug resistance*“ (**MDR**). MDR je rezultat smanjene akumulacije leka usled ekspresije jedne ili više ATP(adenozin trifosfat) zavisnih transportera, koje imaju uloge efluksnih pumpi, odnosno pumpi koje izbacuju lek iz ćelije, a prvootkriveni i najviše proučavan do sada je P-gp je protein koji ima ulogu pumpe koja iz ćelije izbacuje hidrofobne lekove ³⁴. Prekomerna ekspresija P-glikoproteina se dovodi u vezu sa otpornošću na različite antikancerske lekove kao što su vinka alkaloidi, antraciklini i taksani ^{35,37,73}. Rezistencija na paklitaksel ispitivana u ćelijskim kulturama javlja se u dva oblika, kao alteracija ili mutacija α - i β -tubulina ili prekomerna ekspresija P-gp-a ⁷³. S druge strane istraživanjima na ćelijskim kulturama utvrđena je veća senzitivnost na Gemcitabin onih ćelija koje pokazuju prekomernu ekspresiju P-gp-a ⁷⁴. Svakako da je rezistencija na citostatike rezultat sadejstva više faktora, tako da je mala verovatnoća da će dejstvo na jedan od mehanizama rezistencije dovesti do premošćavanja ovih problema, ali svakako postoji potreba za razotkrivanjem ovih mehanizama ⁷⁵. Odatle proizilazi i potreba za iznalaženjem i prepoznavanjem potencijalnih prediktivnih faktora koji bi bili od značajne pomoći za odabir najefikasnije terapije, kao i za dalji razvoj novih oblika terapije. Uloga TTF-1 u kancerogenezi je nerazjašnjena, ali se zna da je njegova ekspresija najčešća kod adenokarcinoma pluća ⁷⁶. Visoka ekspresija TTF-1 prema većem broju istraživanja predstavlja pozitivan prognostički faktor kod NSČKP ^{77,78}. Njegovo prisustvo se povezuje sa rezistencijom na Gemcitabin, Taksane i Cisplatin ⁷⁹. P63 i p73 su otkriveni kao genski homolozi p53 sa kojim imaju zajedničku biološku ulogu poput indukcije apoptoze. Ipak p53 može remetiti njihovu normalnu funkciju ⁸⁰. P63 ima i ulogu aktivatora miR-

200 mikro RNA familije. Mikro RNA su važni regulatori ekspresije gena, dok je familija miR-200 značajna kao regulator tumorskih matičnih ćelija i epitelijalno-mezenhimske tranzicije⁸¹. P63 je značajan kao faktor skvamozne diferencijacije, a pojačana ekspresija p63 dovodi se u vezu sa osetljivošću na cisplatinske terapijske režime^{82,83}.

Postoji potreba za daljim istraživanjima prognostičkih i prediktivnih faktora za karcinome pluća. Prognostičke faktore čine karakteristike obolelog, kao i karakteristike tumora na osnovu kojih je moguće predvideti ishod bolesti nezavisno od terapijskog pristupa. Prognostički faktori određuju efekte tumorskih karakteristika na bolesnika. Prediktivni faktori su klinički parametri, ćelijski i molekularni markeri kojima je moguće predvideti odgovor tumora na terapiju, što znači da oni određuju efekte terapije na tumor⁸⁴. Da li P-gp, TTF1 i p63 mogu imati uloge prediktivnih faktora kod karcinoma pluća? Sa informacijom o profilu rezistencije kod svakog bolesnika ponaosob mogao bi biti individualizovan terapijski pristup i time bi se moglo predvideti kod kojih bolesnika bi koji oblik hemioterapije zaista imao prednost.

2. HIPOTEZA

Kod bolesnika sa NSĆKP utvrđivanje ekspresije PGP, TTF1 i p63 ima prediktivni značaj za odgovor na polihemioterapiju.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj ovog istraživanja je da se imunohistohemijski analizira PGP, TTF1 i p63 ekspresija kod bolesnika sa NSĆKP i proceni moguća korelacija te ekspresije kao prediktivnog faktora odgovora na hemioterapiju.

Za proveru navedene radne hipoteze postavljeni su sledeći sekundarni ciljevi istraživanja:

1. Imunohistohemijska detekcija ekspresije i određivanje učestalosti ekspresije PGP, TTF1 i p63 kod bolesnika sa NSĆKP u III i IV stadijumu bolesti (prema međunarodnoj TNM klasifikaciji) ⁵⁴.

2. Analiza ekspresije PGP, TTF1 i p63 u različitim histološkim tipovima NSĆKP-a.

3. Ispitivanje i utvrđivanje terapijskog odgovora nakon primene dva ciklusa hemioterapije prema standardnim protokolima za nesitnoćelijske tumore pluća.

4. Ispitivanje i utvrđivanje korelacije ekspresije PGP, TTF1 i p63 sa preživljavanjem bez progresije bolesti (*Progression free survival-PFS*) i ukupnim preživljavanjem (*Overall survival-OS*).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Dizajn istraživanja:

Radi se o kombinovanom kliničko-laboratorijskom, retrospektivno-prospektivnom opservacionom istraživanju.

4.2. Ispitanici:

Analizirano je 85 bolesnika sa histopatološkom dijagnozom NSČKP u III i IV stadijumu bolesti (prema međunarodnoj TNM klasifikaciji). Ispitivanje je obavljeno u Vojnomedicinskoj akademiji Beograd u Klinici za pulmologiju i Institutu za patologiju, dok je dodatna imunohistohemijska dijagnostika za P-gp rađena na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu u Laboratoriji za patologiju.

Shodno kliničkim studijama koje se bave procenom efekata hemioterapije svi bolesnici su ispunili sledeće uslove:

- 1) da su stariji od 18 godina
- 2) da je opšte stanje bolesnika procenjeno prema skali Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (tzv. performans status) ≤ 2 /85/;
- 3) zadovoljavajuća hematološka funkcija (broj leukocita $\geq 3,5 \times 10^9/l$;broj trombocita $\geq 100 \times 10^9/l$ hemoglobin $\geq 100g/l$);
- 4) zadovoljavajuća funkcija jetre i bubrega;
- 5) nisu prethodno lečeni hemioterapijom⁶.

4.3. Obeležja posmatranja:

1) Svim bolesnicima je urađena (na početku i po isteku četiri nedelje od ordiniranja drugog ciklusa hemioterapije) kompletna krvna slika, osnovni biohemijski profil (glukoza, urea, kreatinin, proteini, AST,ALT, LDH), EKG, radiografija grudnog koša, ehotomografija abdomena, bronhoskopija, eventualno i drugi raspoloživi dijagnostički postupci (kompjuterizovana tomografija grudnog koša i gornjeg abdomena, scintigrafija kostiju, kompjuterizovana tomografija centralnog nervnog sistema, transkutana iglena biopsija pluća, pleuralna punkcija, punkcija perikarda...).

2) Detekcija ekspresije P-gp, TTF-1 i p63, u dijagnostičkom patohistološkom uzorku tumorskog tkiva rađena je imunohistohemijskom metodom. Tkivni uzorci dobijeni su biosijom prilikom bronhoskopije ili transkutanom iglenom biopsijom tumora pluća. Uzorci tkiva fiksirani

su 5% puferisanim neutralnim formalinom, dehidrisani, prosvetljeni i prožeti parafinom u aparatu Leica ASP 300 i ukalupljeni u parafin. Parafinski kalupi su isečeni na automatskom rotacionom mikrotomu na rezove debljine 4 μ . Rezovi su hvatani na Superfrost+ predmetnim staklima. Demaskiranje epitopa za Pgp i TTF-1 radi se u 0.05M citratnom puferu pH 6.0 a za p63 radi se u Target Retrieval Solution pH 9.0 firme Dako (kat.br. S2367) u mikrotalasnoj pećnici. Kao primarna antitela korišćena su: anti-humani TTF-1 (Dako kat. br. M 3575, klon 8G7G3/1) u razblaženju 1:50 i anti-humani p63 protein (Dako kat.br M 7247, klon 4A4) u razblaženju 1:300, a kao anti humani Pgp je korišćeno Mdr-1 ((UIC2): sc-73354) mišje monoklonsko antitelo u razblaženju 1:300. Kao sistem za vizuelizaciju koristi se EnVision kat. br. K5007 i hromogen DAB Liquid kat.br K3466 firme Dako. Obojeni preparati se analiziraju svetlosnim mikroskopom.

Ekspresija P63 i TTF je označena kao negativna (-) ukoliko se tumorske ćelije ne prebojavaju. U slučaju prebojavanja do 10% tumorskih ćelija rezultat se označava kao slabo pozitivan (+-), a ukoliko se na preparatu nađe preko 10% prebojenih tumorskih ćelija, rezultat se označava kao pozitivan (+).

Ekspresija PGP izražena je u odnosu na ukupnu ćelijsku populaciju kao negativna (-) ukoliko se ćelije ne prebojavaju, a u zavisnosti od procenta ćelija koje se prebojavaju označena je na sledeći način: 1+ <25%; 2+ =25% do 50% i 3+ u slučaju >50%.

3) Pored navedene podele prema rezultatima IHH analize, ispitanici su grupisani na osnovu prisustva i/ili odsustva ekspresije PGP, TTF-1 i p63 na sledeći način:

I grupa - sa ekspresijom PGP (PGP +)

podgrupa Ia - sa ekspresijom TTF1 i p63 (TTF1 +, p63 +);

podgrupa Ib - sa ekspresijom TTF1, bez ekspresije p63 (TTF1 +, p63-);

podgrupa Ic - bez ekspresije TTF1, sa ekspresijom p63 (TTF1 -, p63+);

podgrupa Id- bez ekspresije TTF1 i p63 (TTF1 -, p63-).

II grupa – bez ekspresije PGP (PGP -)

podgrupa IIa - sa ekspresijom TTF1 i p63 (TTF1 +, p63 +);

podgrupa IIb - sa ekspresijom TTF1, bez ekspresije p63 (TTF1 +, p63-);

podgrupa IIc - bez ekspresije TTF1, sa ekspresijom p63 (TTF1 -, p63+);

podgrupa IId- bez ekspresije TTF1 i p63 (TTF1 -, p63-).

4) Svim ispitanicima su posle odluke Konzilijuma za maligne bolesti pluća i pleure VMA i informisanog pristanka ordinirana po dva ciklusa polihemioterapije po protokolu gemcitabin/platina (**GP**) ili paklitaksel/platina (**TP**)^{6,86}. U zavisnosti od primenjenog terapijskog režima ispitanici su raspoređeni u dve podgrupe: 1) bolesnici koji su dobili polihemioterapiju po protokolu sa gemcitabinom 2) bolesnici koji su dobili polihemioterapiju po protokolu sa paklitakselom.

Po isteku četiri nedelje od ordiniranja drugog ciklusa polihemioterapije izvršena je procena odgovora na terapiju na osnovu *RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)* kriterijuma.⁸⁷ Teorijski su mogući sledeći odgovori na terapiju:

1. kompletan odgovor (*Complete Response-**CR***)-potpuni nestanak tumora;
2. parcijalni odgovor (*Partial Response-**PR***)- redukcija u zbiru najdužih dijametara „target“ lezija za najmanje 30% u odnosu na početnu veličinu);
3. stabilna bolest (*Stabile Disease-**SD***) bez značajnih promena i
4. progresija bolesti (*Progressive Disease-**PD***) uvećanje u zbiru najdužih dijametara „target“ lezija za najmanje 20% u odnosu na početnu veličinu)⁸⁷.

U povoljan odgovor na terapiju spadaju **CR**, **PR** i **SD**, dok je **PD** nepovoljan odgovor na terapiju.

4.8. Statistička obrada podataka

Kompletna statistička analiza podataka izvršena je pomoću komercijalnog statističkog softvera *SPSS Statistics 18*.

Od parametara deskriptne statistike korišćeni su srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD), 95%-ne granice poverenja i medijana. Provera normalnosti distribucije podataka izvršena je primenom *Kolmogorov-Smirnov* testa. U zavisnosti od rezultata ovog testa, statistička značajnost između grupa proveravana je primenom *Studentovog t*-testa (alternativno *Mann-Whitney* test) ili analizom varijanse u 1 pravcu (alternativno *Kruskal-Wallis* test) uz naknadna *post hoc* parna poređenja.

Pojedine varijable su predstavljene u vidu frekvencija pojedinih obeležja (kategorija) a statistička značajnost razlika utvrđena je primenom Hi-kvadrat testa.

Dužina preživljavanja (eng. *Overall Survival-OS*) i preživljavanje bez progresije bolesti (eng. *Progression Free Survival-PFS*) izračunavana su primenom *Kaplan-Meierove* analize (naknadna parna poređenja putem *Log rang* testa).

Statistički značajna razlika procenjivana je na minimalnom nivou **p< 0,05**.

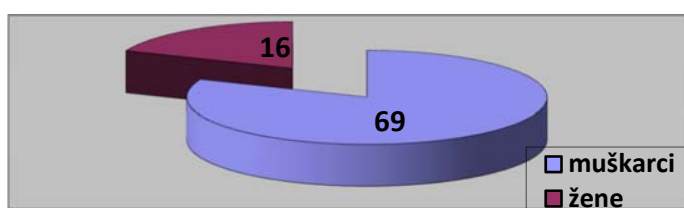
5. REZULTATI

5.1. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 85 bolesnika koji su u trenutku postavljanja dijagnoze imali III ili IV klinički stadijum netitnoćelijskog karcinoma pluća. Njihove osnovne demografske karakteristike, odnosno polna pripadnost (videti grafikon 1) i starosna dob prikazane su u tabeli 1. Prosečna starosna dob pacijenata oba pola pri otkrivanju bolesti bila je 62,9 godina (medijana je iznosila 63 godine) , kod žena 64,6 godina (medijana 66 godina), a kod muškaraca 62,5 (medijna 63 godine). Poređenjem godina starosti u odnosu na pol pomoću t- testa za nezavisna obeležja utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika u starosnoj dobi između polova.

Tabela 1. Raspodela bolesnika prema polu i starosnoj dobi

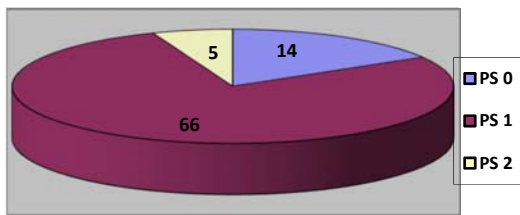
Pol	Broj bolesnika (%)	Prosečna starosna dob u godinama \pm SD	Mediana	Minimum	Maximum
muškarci	69 (81,2)	62,5 \pm 9,1	63,0	43	79
žene	16 (18,8)	64,6 \pm 6,8	66,0	53	75
ukupno	85 (100)	62,9 \pm 8,7	64,0	43	79
t-test	$p = 0,400$				



Grafikon 1. Raspodela bolesnika prema polu

Raspodela bolesnika prema ECOG PS-u prikazana je u tabeli 2 i na grafikonu 2. Najveći broj bolesnika (66 tj. 77,6%) imao je u trenutku postavljanja dijagnoze PS 1.

Tabela 2. Raspodela bolesnika ECOG PS



ECOG PS	Broj bolesnika (%)
PS 0	14 (16,5)
PS 1	66 (77,6)
PS 2	5 (5,9)
ukupno	85 (100)

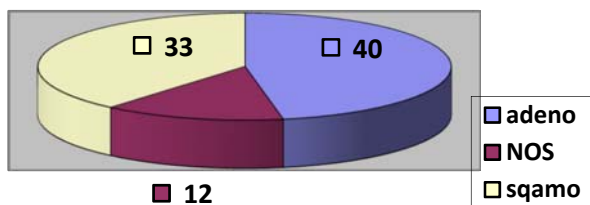
Grafikon 2. Raspodela bolesnika prema ECOG PS

Raspodela bolesnika prema starosnoj dobi i patohistološkom tipu karcinoma prikazana je u tabeli 3 i grafikonu 3. Adenokarcinom je dijagnostikovao kod 40 (47,1%) bolesnika, neklasifikovani nemikrocelularni karcinom pluća (NOS) je dijagnostikovao kod 12 (14,4%), a skvamocelularni karcinom kod 33 (38,8%) bolesnika. Kada je reč o starosnoj dobi u trenutku postavljanja dijagnoze nema statistički značajnih razlika između ova tri patohistološka tipa karcinoma.

Tabela 3. Raspodela bolesnika prema starosnoj dobi i patohistološkom tipu karcinoma

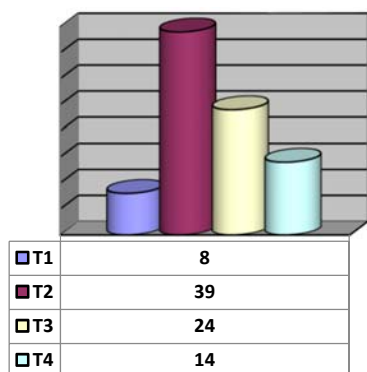
Patohistološki tip karcinoma	Broj bolesnika (%)	Prosečna starosna dob \pm SD (godine)	Mediana	Minimum	Maximum
adeno	40 (47,1)	62,9 \pm 9,0	65,5	43	77
NOS	12 (14,1)	61,2 \pm 9,2	62,0	50	79
skvamo	33 (38,8)	63,4 \pm 8,3	64,0	43	77
ukupno	85 (100)	62,9 \pm 8,7	64,0	43	79
ANOVA	$p = 0,756$				

Grafikon 3. Raspodela bolesnika prema patohistološkom tipu karcinoma

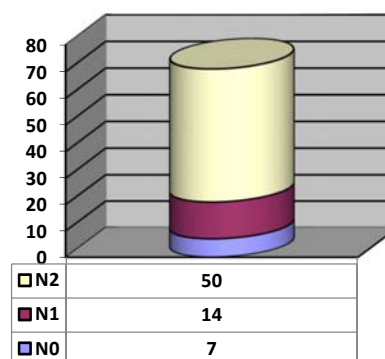


Raspodela bolesnika u odnosu na T, N i M status (prema TNM

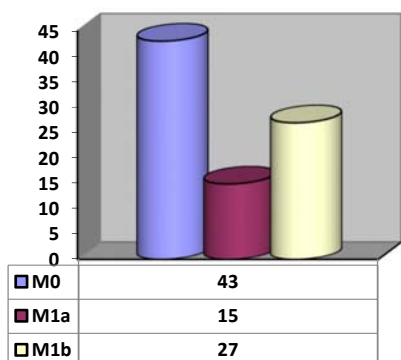
klasifikaciji NSČKP) prikazana je u tabeli 4. i ilustrovana grafikonima 4-6.



Grafikon 4. T status bolesnika



Grafikon 5. N status bolesnika



Grafikon 6. M status bolesnika

U trenutku dijagnostikovanja bolesti najveći broj bolesnika 45,9% je imao T2 bolest; T3 28,2%, T4 16,5%, a T1 9,4% bolesnika. N2 bolest imalo je 58,8%; N1 i N3 bolest po 16,5%, a N0 8,2% bolesnika. Bez udaljenih metastaza bilo je 50,6% bolesnika, M1a bolest imalo je 17,6% bolesnika, dok je M1b bolest imalo njih 31,8% bolesnika.

Tabela 4. Raspodela bolesnika T, N i M statusu

T, N i M status	Broj bolesnika (%)
T1	8 (9,4)
T2	39 (49,5)
T3	24 (28,2)
T4	14 (16,5)
ukupno	85 (100)

N0	7 (8,2)
N1	14 (16,5)
N2	50 (58,8)
N3	14 (16,5)
ukupno	85 (100)

M0	43 (50,6)
M1a	15 (17,6)
M1b	27 (31,8)
ukupno	85 (100)

Tabela 5. Klinički stadijum bolesti

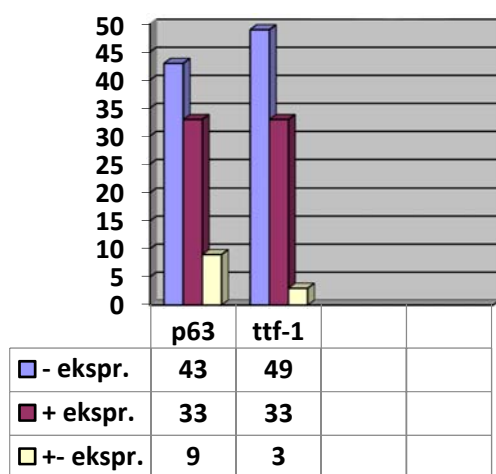
Stadijum bolesti	Broj bolesnika (%)
IIIa	31 (36,5)
IIIb	12 (14,1)
IV	42 (49,4)
ukupno	85 (100)

Naši bolesnici su bili najčešće u IV kliničkom stadijumu bolesti 42 (49,4%), zatim u IIIa 31 (36,5%) . Najmanje bolesnika je imalo IIIb klinički stadijumu bolesti 12 (14,1%).

5.2. Rezultati imunohistohemijskih analiza ekspresije p63, TTF-1 i P-gp i korelacije primenjenih hemioterapijskih protokola sa kliničkim karakteristikama ispitanika i patohistološkim odlikama karcinoma

Rezultati imunohistohemijskih analiza ekspresije p63, TTF-1 i P-gp u tumorskom tkivu pacijenata prikazani su u tabelama 6 – 8 (videti i prilog 1). Kod najvećeg broja bolesnika (50,6%)

ekspresija p63 se nije ispoljila, a najmanji broj (10,6%) ispoljio je slabu ekspresiju. Takođe se ni kod najvećeg broja bolesnika nije ispoljila ekspresija TTF-1 (57,6%) (videti grafikon 7).



Grafikon 7. Rezultati ekspresije P63 i TTF-1

Tabela 6. Učestalost ekspresije p63

Ekspresija p63	Broj bolesnika (%)
p63 -	43 (50,6)
p63 +	33 (38,8)
P63+-	9 (10,6)
ukupno	85 (100)

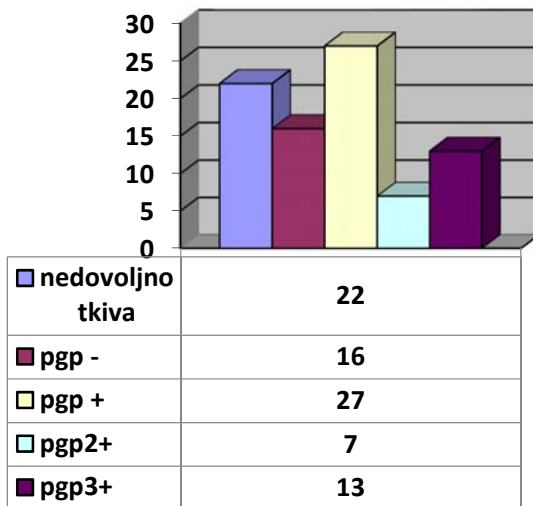
Tabela 7. Učestalost ekspresije TTF-1

Ekspresija TTF-1	Broj bolesnika (%)
TTF-1 -	49 (57,6)
TTF-1 +	33 (38,8)
TTF-1+ -	3 (3,5)
ukupno	85 (100)

Tabela 8. Učestalost ekspresije P-gp

Ekspresija P-gp	Broj bolesnika (%)
P-gp -	16 (25,4)
P-gp +	27 (42,9)
P-gp 2+	7 (11,1)
P-gp 3+	13 (20,6)
ukupno	63 (100)

Zbog nedovoljno tumorskog tkiva ili nekroze nije uspela imunohistohemijska analiza P-gp kod 22 bolesnika (tj. 25,9%). Od preostalih 63 uzorka u 74,6% bolesnika došlo do IHH prebojavanja P-gp u tumorskim ćelijama, dok se kod 25,4% bolesnika nije se ispoljila ekspresija P-gp (tabela 8, grafikon 8).

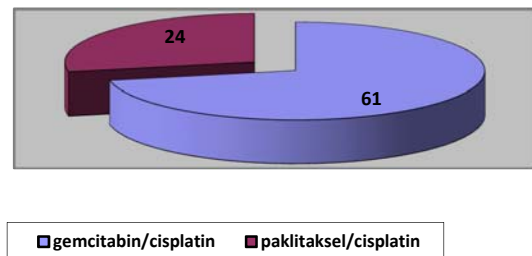


Grafikon 8. Rezultati ekspresije P-gp

Tabela i grafikon 9 prikazuju raspodelu bolesnika u odnosu na primenjeni terapijski protokol. Broj bolesnika kojima je ordinirana hemioterapija po protokolu gemcitabin/platina bio je 61(71,8%), dok je 24 bolesnika (28,2%) dobilo hemioterapiju po protokolu paklitaksel/platina.

Tabela 9. Raspodela bolesnika u odnosu na hemioterapijski protokol

HT protokol	Broj bolesnika (%)
Gemcitabin/cisplatin	61 (71,8)
Paklitaksel/cisplatin	24 (28,2)
ukupno	85 (100)



Grafikon 9. Raspodela bolesnika prema hemioterapijskom protokolu

Kada je u pitanju ekspresija p63 u odnosu na patohistološki tip tumora postoji statistički gledano značajna ekspresija ($p < 0,001$) kod skvamocelularnog karcinoma (od 33 bolesnika sa ekspresijom p63 31 je imao skvamocelularni karcinom, što iznosi 93,6%) u odnosu na adeno i neklasifikovane nesitnoćelijske karcinome (videti tabelu 10). Od ukupno 9 bolesnika sa slabom ekspresijom p63, 5 bolesnika je imalo adenokarcinom (55,6%).

Tabela 10. Ekspresija p63 u odnosu na patohistološki tip tumora

Ekspresija p63		histološki tip karcinoma			ukupno
		adeno	NOS	skvamo	
p63-	Broj bolesnika	33	9	1	43
	% od p63-	76,7%	20,9%	2,3%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	82,5%	75,0%	3,0%	50,6%
p63+	Broj bolesnika	2	0	31	33
	% od p63+	6,1%	0,0%	93,9%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	5,0%	0,0%	93,9%	38,8%
p63+-	Broj bolesnika	5	3	1	9
	% od p63+-	55,6%	33,3%	11,1%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	12,5%	25,0%	3,0%	10,6%
ukupno	Broj bolesnika	40	12	33	85
	% od p63	47,1%	14,1%	38,8%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	100%	100%	100%	100%
χ^2 test		$p < 0,001^*$			

*Statistički značajna razlika

Kod ekspresije TTF-1 situacija je obrnuta. Kod adenokarcinoma postoji statistički značajna ekspresija TTF-1 ($p < 0,001$) uz potpuno odsustvo ekspresije i odsustvo slabe ekspresije TTF-1 kod skvamocelularnog karcinoma. Od 33 bolesnika sa izraženom ekspresijom

TTF-1, histologiju adenokarcinoma imalao je 32 bolesnika, dok je jedan imao histologiju NOS (tabela 11).

Tabela 11. Ekspresija TTF-1 u odnosu na patohistološki tip tumora

Ekspresija TTF-1		histološki tip karcinoma			ukupno
		adeno	NOS	skvamo	
TTF-1-	Broj bolesnika	6	10	33	49
	% TTF-1-	12,2%	20,4%	67,3%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	15,0%	83,3%	100%	57,6%
TTF-1+	Broj bolesnika	32	1	0	33
	% TTF-1+	97,0%	3,0%	0,0%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	80,0%	8,3%	0,0%	38,8%
TTF-1+-	Broj bolesnika	2	1	0	3
	%TTF-1+-	66,7%	33,3%	0,0%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	5%	8,3%	0,0%	3,5%
ukupno	Broj bolesnika	40	12	33	85
	% TTF-1	47,1%	14,1%	38,8%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	100%	100%	100%	100%
χ^2 test		$p < 0,001$ *			

*Statistički značajna razlika

Što se tiče ekspresije P-gp u odnosu na ukupan broj bolesnika, u grupi bolesnika kod kojih nije bilo dovoljno tkiva za analizu ovu IHH analizu 36,4% bolesnika imalo je adenokarcinom, 18,2% NOS, dok je skvamocelularni imalo njih 45,4%. U grupi bolesnika bez ekspresije P-gp 25% je sa adenokarcinomom, 18,8% sa NOS, 56,2% sa skvamocelularnim karcinomom. U grupi onih sa P-gp+ 51,9% je imalo adenokarcinom, 14,8% NOS, 33,3% skvamocelularni karcinom; u grupi sa P-gp2+ 71,4% je bilo sa

adenokarcinomom, a po 14,3% sa NOS i skvamocelularnim karcinomom; u grupi sa P-gp 3+ 69,2% je bilo sa adenokarcinomo i 30,8% sa skvamocelularnim karcinomom. Kod ovakvog grupisanja pri čemu se vodi računa o procentu ekspresije P-gp nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na patohistološki tip tumora (videti tabelu 12).

Tabela 12. Ekspresija P-gp izražena prema nivou ekspresije u odnosu na patohistološki tip tumora

Ekspresija P-gp		histološki tip karcinoma			ukupno
		adeno	NOS	skvamo	
Nije urađena	Broj bolesnika	8	4	10	22
	% nije urađeno	36,4%	18,2%	45,4%	100%
IHH P-gp	% u okviru PH tipa karcinoma	20,0%	33,3%	30,3%	25,9%
Pgp-	Broj bolesnika	4	3	9	16
	% od Pgp-	25,0%	18,8%	56,2%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	10,0%	25,0%	27,3%	18,8%
Pgp+	Broj bolesnika	14	4	9	27
	% od Pgp+	51,9%	14,8%	33,3%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	35,0%	33,3%	27,3%	31,8%
Pgp2+	Broj bolesnika	5	1	1	1
	% od Pgp 2+	71,4%	14,3%	14,3%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	12,5%	8,3%	3,0%	8,2%
Pgp3+	Broj bolesnika	9	0	4	13
	% od Pgp 3+	69,2%	0,0%	30,8%	100%
		22,5%	0,0%	12,1%	15,3%
ukupno	Broj bolesnika	40	12	33	85
	% od Pgp	47,1%	14,1%	38,8%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	100%	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,278$			

Kada grupišemo pacijente na one kod kojih nema ekspresije P-gp i one kod kojih postoji ekspresija P-gp, bez obzira na procenat te ekspresije, u odnosu na histološki tip tumora postoji granična statistička značajnost ($p=0,057$) (tabela 13).

Tabela 13. Ekspresija P-gp u odnosu na patohistološki tip tumora

Ekspresija P-gp		histološki tip karcinoma			ukupno
		adeno	NOS	skvamo	
P-gp-	Broj bolesnika	4	3	9	16
	% od pgp-	25%	18,7%	56,3%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	12,5%	37,5%	39,1%	25,4%
P-gp+ P-gp2+ P-gp3+	Broj bolesnika	28	5	14	47
	% od pgp+	59,6%	10,6%	29,8%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	87,5%	62,5%	60,9%	74,6%
ukupno	Broj bolesnika	32	8	23	63
	% od pgp	50,8%	12,7%	36,5%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	100%	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,057$			

Međutim, ukoliko poredimo rezultate ekspresije P-gp izolovano u dva patohistološka tipa karcinoma, odnosno ukoliko poredimo ove rezultate kod adenokarcinoma u odnosu na skvamocelularne karcinome, zapaža se da se P-gp ekspresija javlja u 87,5% u okviru grupe sa adenokarcinomima, dok se u okviru grupe sa skvamocelularnim karcinomima javlja u 60,9%, kao i da od ukupno 42 pacijenta sa pozitivnom ekspresijom P-gp u ove dve grupe karcinoma, adenokarcinom ima 28 (66,7%) bolesnika, a skvamocelularni 14 (33,3%) bolesnika, odnosno postoji statistički značajno češća ekspresija P-gp kod adenokarcinoma u odnosu na skvamocelularni karcinom ($p=0,022$) (tabela 14).

Tabela 14. Ekspresija P-gp u odnosu na adeno i skvamocelularni tip tumora

Ekspresija P-gp		histološki tip karcinoma		ukupno
		adeno	skvamo	
P-gp-	Broj bolesnika	4	9	13
	% od p-gp-	30,8%	69,2%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	12,5%	39,1%	25,4%
P-gp+ P-gp2+ P-gp3+	Broj bolesnika	28	14	42
	% od p-gp+	66,7%	33,3%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	87,5%	60,9%	74,6%
ukupno	Broj bolesnika	32	23	55
	% od p-gp	58,2%	41,8%	100%
	% u okviru PH tipa karcinoma	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,022$ *		

*Statistički značajna razlika

U tabelama 15 i 16 prikazana je raspodela hemioterapijskih protokola u odnosu na patohistološki tip karcinoma, kao raspodela u odnosu na stadijum bolesti. Nema statistički značajnih razlika kada su ove raspodele u pitanju. U tabelama 17-19 prikazan je odnos prisustva ekspresije p63, TTF-1 i P-gp prema kliničkom stadijumu bolesti, te da nema statistički značajnih razlika kod naših bolesnika.

Tabela 15. Raspodela hemioterpijskih protokola u odnosu na patohistološki tip karcinoma

Hemioterapija		Patohistološki tip karcinoma			ukupno
		adeno	NOS	skvamo	
GP	Broj bolesnika	25	11	25	61
	% sa terapijom	41.0%	18.0%	41.0%	100.0%
	% sa tipom karcinoma	62.5%	91.7%	75.8%	71.8%
TP	Broj bolesnika	15	1	8	24
	% sa terapijom	62.5%	4.2%	33.3%	100.0%
	% sa tipom karcinoma	37.5%	8.3%	24.2%	28.2%
ukupno	Broj bolesnika	40	12	33	85
	% sa terapijom	47.1%	14.1%	38.8%	100.0%
	% sa tipom karcinoma	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
χ^2 test	$p = 0,116$				

Tabela 16. Raspodela hemioterpijskih protokola u odnosu na stadijum bolesti

Hemioterapija		Stadijum bolesti		ukupno
		III	IV	
GP	Broj bolesnika	34	27	61
	% sa terapijom	55.7%	44.3%	100.0%
	% u stadij. bolesti	79.1%	64.3%	71.8%
TP	Broj bolesnika	9	15	24
	% sa terapijom	37.5%	62.5%	100.0%
	% u stadij. bolesti	20.9%	35.7%	28.2%
ukupno	Broj bolesnika	43	42	85
	% sa terapijom	50.6%	49.4%	100.0%
	% u stadij. bolesti	100.0%	100.0%	100.0%
χ^2 test	$p = 0,203$			

Tabela 17. Ekspresija p63 u odnosu na stadijum bolesti

Ekspresija p63		Stadijum bolesti		ukupno
		III	IV	
p63-	Broj bolesnika	18	25	43
	% od p63-	41,9%	58,1%	100,0%
	% u stadij. bolesti	41,9%	59,5%	50,6%
p63+	Broj bolesnika	20	13	33
	% od p63+	60,6%	39,4%	100,0%
	% u stadij. bolesti	46,5%	31,0%	38,8%
p63+-	Broj bolesnika	5	4	9
	% od p63+-	55,6%	44,4%	100,0%
	% u stadij. bolesti	11,6%	9,5%	10,6%
ukupno	Broj bolesnika	43	42	85
	% od p63	50,6%	49,4%	100,0%
	% u stadij. bolesti	100,0%	100,0%	100,0%
χ^2 test	$p = 0,256$			

Tabela 18. Ekspresija TTF-1 u odnosu na stadijum bolesti

Ekspresija TTF-1		Stadijum bolesti		ukupno
		III	IV	
TTF1-	Broj bolesnika	25	24	49
	% od TTF1-	51,0%	49,0%	100,0%
	% u stadij. bolesti	58,1%	57,1%	57,6%
TTF1+	Broj bolesnika	16	17	33
	% od TTF1+	48,5%	51,5%	100,0%
	% u stadij. bolesti	37,2%	40,5%	38,8%
TTF1+-	Broj bolesnika	2	1	3
	% od TTF1+-	66,7%	33,3%	100,0%
	% u stadij. bolesti	4,7%	2,4%	3,5%
ukupno	Broj bolesnika	43	42	85
	% od TTF1	50,6%	49,4%	100,0%
	% u stadij. bolesti	100,0%	100,0%	100,0%
χ^2 test	$p = 0,830$			

Tabela 19.Ekspresija P-gp u odnosu na stadijum bolesti

Ekspresija P-gp		StadBol		ukupno
		III	IV	
Pgp -	Broj bolesnika	8	8	16
	% od Pgp-	50,0%	50,0%	100,0%
	% u stadij. bolesti	25,8%	25,0%	25,4%
Pgp +	Broj bolesnika	12	15	27
	% od Pgp +	44,4%	55,6%	100,0%
	% u stadij. bolesti	38,7%	46,9%	42,9%
Pgp 2+	Broj bolesnika	4	3	7
	% od Pgp 2+	57,1%	42,9%	100,0%
	% u stadij. bolesti	12,9%	9,4%	11,1%
Pgp 3+	Broj bolesnika	7	6	13
	% od Pgp 3+	53,8%	46,2%	100,0%
	% u stadij. bolesti	22,6%	18,7%	20,6%
ukupno	Broj bolesnika	31	32	63
	% od pgp	49,2%	50,8%	100,0%
	% u stadij. bolesti	100,0%	100,0%	100,0%
χ^2 test	$p = 0,912$			

5.3. Rezultati inicijalnog odzivanja na hemioterapiju i korelacija sa kliničkim karakteristikama ispitanika i patohistološkim odlikama karcinoma

Posle ordinirana 2 ciklusa hemioterapije (HT) po protokolima gemcitabin/platina (GP) ili paklitaksel/platina (TP), učinjena je procena stanja bolesti. Povoljan odgovor na HT imala su 63 bolesnika (74,1%), a od toga parcijalni odgovor (PR) 39 bolesnika (45,9% u odnosu na ukupan broj bolesnika), stabilno stanje bolesti (SD) 24 bolesnika (28,25 do ukupnog broja), dok je 22 bolesnika (25,9% od ukupnog broja) imalo progresiju bolesti (PD). Rezultati procene stanja bolesti i njihova korelacija sa kliničkim karakteristikama bolesnika i patohistološkim odlikama tumora prikazani su u tabelama 20-30.

Tabela 20. Odgovor na hemioterapiju u odnosu na polnu pripadnost

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno
			PR+SD	PD	
Pol	muški	Broj bolesnika (%)	51 (73,9%)	18 (26,1%)	69 (100%)
		% bol. sa HT	81,0%	81,8%	81,2%
	ženski	Broj bolesnika (%)	12 (75,0%)	4 (25,0%)	16 (100%)
		% bol. sa HT	19,0%	18,2%	18,8%
ukupno		Broj bolesnika (%)	63 (74,1%)	22 (25,9%)	85 (100%)
		% bol. sa HT	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,929$			

Polna pripadnost nije imala značajan uticaj na odgovor na hemioterapiju. Povoljan odgovor na hemioterapiju u ženskoj populaciji imalo je 75% žena, a u muškoj populaciji bolesnika njih 73,9% (tabela 20).

Naši bolesnici imali su procenjeni ECOG PS u opsegu od 0 do 2. Nađen je značajan uticaj PS na odgovor na hemioterapiju. Povezanost između PS 2 skora i nepovoljnog odgovora na HT vidi se iz tabele 21 (statistička značajnost $p=0,015$). U grupi bolesnika koji su imali nepovoljan odgovor na hemioterapiju čak 80% pripadalo je grupi bolesnika kod kojih je PS skor 2, a oni su činili 18,25% od ukupnog broja bolesnika kojima je ordinirano po dva ciklusa HT.

Tabela 21. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od ECOG PS-a

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno
			PR+SD	PD	
ECOG PS	PS 0	Broj bolesnika (%)	10 (71,4%)	4 (28,6%)	14 (100%)
		% bol. sa HT	15,9%	18,2%	16,5%
	PS 1	Broj bolesnika (%)	52 (78,8%)	14 (21,2%)	66 (100%)
		% bol. sa HT	82,5%	63,6%	77,6%
	PS 2	Broj bolesnika (%)	1 (20,0%)	4 (80,0%)	5 (100%)
		% bol. sa HT	1,6%	18,2%	5,9%
ukupno	Broj bolesnika (%)	63 (74,1%)	22 (25,9%)	85 (100%)	
	% bol. sa HT	100%	100%	100%	
χ^2 test		$p = 0,015^*$			

*Statistički značajna razlika

Tabela 22. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od patohistološkog tipa tumora

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno
			PR+SD	PD	
PH tip karcinoma	adeno	Broj bolesnika (%)	30 (73,9%)	10 (26,1%)	40 (100%)
		% bol. sa HT	47,6%	45,5%	47,1%
	NOS	Broj bolesnika (%)	9 (75,0%)	3 (25,0%)	12 (100%)
		% bol. sa HT	14,3%	13,6%	14,1
	skvamo	Broj bolesnika (%)	24 (72,7%)	9 (27,3%)	33 (100%)
		% bol. sa HT	38,1%	40,9%	38,8%
Ukupno	Broj bolesnika (%)	63 (74,1%)	22 (25,9%)	85 (100%)	
	% bol. sa HT	100%	100%	100%	
χ^2 test		$p = 0,973$			

Tabela 22. prikazuje odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od patohistološkog tipa tumora, a tabela 23. u zavisnosti od T statusa tumora, pri čemu nije nađen statistički značajan uticaj histološkog tipa tumora niti njegovih T karakteristika na inicijalni odgovor na hemioterapiju.

Tabela 23. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od T statusa

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno
			PR+SD	PD	
T status	T1	Broj bolesnika (%)	6 (75,0%)	2 (25,0%)	8 (100%)
		% bol. sa HT	9,5%	9,1%	9,4%
	T2	Broj bolesnika (%)	32 (82,1%)	7 (17,9%)	39 (100%)
		% bol. sa HT	50,8%	31,8%	45,9
	T3	Broj bolesnika (%)	16 (66,7)	8 (33,3)	24 (100%)
		% bol. sa HT	25,4%	36,4%	28,2
	T4	Broj bolesnika (%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)
		% bol. sa HT	14,3%	22,7%	16,5%
Ukupno		Broj bolesnika (%)	63 (74,1%)	22 (25,9%)	85 (100%)
		% bol. sa odgovorom na HT	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,443$			

U tabeli 24. prikazan je uticaj N statusa na inicijalni odgovor, pri čemu postoji statistički značajna povezanost nepovoljnog odgovora na HT sa N2 statusom ($p=0,050$). U odnosu na grupu bolesnika koji su imali PD, čak 81,8% je imalo N2 bolest.

Kada je M status u pitanju kod naših bolesnika nije nađena značajna statistički značajna razlika (tabela 25), kao ni između IIIa, IIIb i IV stadijuma bolesti u odnosu na inicijalni odgovor na hemioterapiju (tabela 26).

Analizom uticaja prisustva ekspresije p63, TTF-1 i P-gp kod naših bolesnika sa na inicijalni odgovor na hemioterapiju nismo dobili statističku značajnost (videti tabele 27- 30).

Tabela 24. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od N statusa

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno
			PR+SD	PD	
N status	N0	Broj bolesnika (%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100%)
		% bol. sa HT	7,9%	9,1%	8,2%
	N1	Broj bolesnika (%)	13 (92,9%)	1 (7,1%)	14 (100%)
		% bol. sa HT	20,6%	4,5%	16,5%
	N2	Broj bolesnika (%)	32 (64,0%)	18 (36,0)	50 (100%)
		% bol. sa HT	50,8%	81,8%	58,8%
	N3	Broj bolesnika (%)	13(92,9%)	1 (7,1%)	14 (100%)
		% bol. sa HT	20,6%	4,5%	16,5%
Ukupno		Broj bolesnika (%)	63 (74,1%)	22(25,9%)	85 (100%)
		% bol. sa HT	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,050^*$			

*Statistički značajna razlika

Tabela 25. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od M statusa

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno
			PR+SD	PD	
M status	M0	Broj bolesnika (%)	34 (79,1%)	9 (20,9%)	43 (100%)
		% bol. sa HT	54,0%	40,9%	50,6%
	M1a	Broj bolesnika (%)	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15 (100%)
		% bol. sa HT	15,9%	22,7%	17,6%
	M1b	Broj bolesnika (%)	19 (70,4%)	8 (29,6%)	27 (100%)
		% bol. sa HT	30,1%	36,4%	31,8%
Ukupno		Broj bolesnika (%)	63 (74,1%)	22 (25,9%)	85 (100%)
		% bol. sa HT	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,544$			

Tabela 26. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od stadijuma bolesti

			Odgovor na hemioterapiju			ukupno
			PD	PR	SD	
Stadijum bolesti	IIIa	Broj bolesnika (%)	7 (22,6%)	13 (41,9%)	11 (35,5%)	31 (100%)
		% bol. sa HT	31,8%	33,3%	45,8%	36,5%
	IIIb	Broj bolesnika (%)	2 (16,7%)	7 (58,3%)	3 (25,0%)	12 (100%)
		%bol. sa HT	9.1%	18.0%	12,5%	14,1%
	IV	Broj bolesnika (%)	13 (30,9%)	19 (45,2%)	10 (23,8%)	42 (100%)
		%bol. sa HT	59,1%	48,7%	41,7%	49,4%
ukupno	Broj bolesnika (%)	22 (25,9%)	39 (45,9%)	24 (28,2%)	85 (100%)	
	% bolesnika sa HT	100%	100%	100%	100%	
χ^2 test		$p = 0,668$				

Tabela 27. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od tumorske ekspresije p63

			Odgovor na hemioterapiju			ukupno
			PD	PR	SD	
P63	p63-	Broj bolesnika (%)	9 (20,9%)	22 (51,2%)	12 (27,9%)	43 (100%)
		% bol. sa HT	40,9%	56,4%	50,0%	50,6%
	p63+	Broj bolesnika (%)	10 (30,3%)	13 (39,4%)	10 (30,3%)	33 (100%)
		% bol. sa HT	45,5%	33,3%	41,7%	38,8%
	p63+-	Broj bolesnika (%)	3 (33,3%)	4 (44,4%)	2 (22,2%)	9 (100%)
		% bol. sa HT	13,6%	10,3%	8,3%	10,6%
ukupno	Broj bolesnika (%)	22 (25,9%)	39 (45,9%)	24 (28,2%)	85 (100%)	
	% bol. sa HT	100%	100%	100%	100%	
χ^2 test		$p = 0,812$				

Tabela 28. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od tumorske ekspresije TTF-1

			Odgovor na hemioterapiju			ukupno
			PD	PR	SD	
TTF-1	TTF-1-	Broj bolesnika (%)	13 (26,5%)	21 (42,9%)	15 (30,6%)	49 (100%)
		% bol. sa HT	59,1%	53,8%	62,5%	57,6%
	TTF-1+	Broj bolesnika (%)	7 (21,2%)	17 (51,5%)	9 (27,3%)	33 (100%)
		% bol. sa HT	31,8%	43,6%	37,5%	38,8%
	TTF-1+-	Broj bolesnika (%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	3 (100%)
		% bol. sa HT	9,1%	2,6%	0,0%	3,5%
Ukupno		Broj bolesnika (%)	22 (25,9%)	39 (45,9%)	24 (28,2%)	85 (100%)
		% bol. sa HT	100%	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,463$				

Tabela 29. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od tumorske ekspresije P-gp.

			Odgovor na hemioterapiju		ukupno	
			PR+SD	PD		
P-gp	Pgp -	Broj bolesnika (%)	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16(100%)	
		% bol. sa HT	22,2%	33,3%	25,4%	
	Pgp +	Broj bolesnika (%)	19 (70,4%)	8 (29,6%)	27 (100%)	
		% bol. sa HT	42,2%	44,4%	42,9	
	Pgp 2+	Broj bolesnika (%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100%)	
		% bol. sa HT	11,1%	11,1%	11,1%	
	Pgp 3+	Broj bolesnika (%)	11(84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)	
		% bol. sa HT	24,4%	11,1%	20,6%	
	Ukupno		Broj bolesnika (%)	45 (71,4%)	18 (28,6%)	63 (100%)
			% bol. sa HT	100%	100%	100%
	χ^2 test		$p = 0,626$ ($p=0,360$)			

Tabela 30. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od ekspresije P-gp, TTF--1 i p63

		PR+SD	PD	Ukupno
Ia	Broj bolesnika	5	2	7
	% u okviru grupe	71,4%	28,6%	100,0%
	% sa ishodom	11,1%	11,1%	11,1%
Ib	Broj bolesnika	13	6	19
	% u okviru grupe	68,4%	31,6%	100,0%
	% sa ishodom	28,9%	33,3%	30,2%
Ic	Broj bolesnika	9	4	13
	% u okviru grupe	69,2%	30,8%	100,0%
	% sa ishodom	20,0%	22,2%	20,6%
Id	Broj bolesnika	7	0	7
	% u okviru grupe	100,0%	0,0%	100,0%
	% sa ishodom	15,6%	0,0%	11,1%
IIa	Broj bolesnika	1	1	2
	% u okviru grupe	50,0%	50,0%	100,0%
	% sa ishodom	2,2%	5,6%	3,2%
IIb	Broj bolesnika	2	0	2
	% u okviru grupe	100,0%	0,0%	100,0%
	% sa ishodom	4,4%	0,0%	3,2%
IIc	Broj bolesnika	5	3	8
	% u okviru grupe	62,5%	37,5%	100,0%
	% sa ishodom	11,1%	16,7%	12,7%
IId	Broj bolesnika	3	2	5
	% u okviru grupe	60,0%	40,0%	100,0%
	% sa ishodom	6,7%	11,1%	7,9%
Ukupno	Broj bolesnika	45	18	63
	% u okviru podele	71,4	28,6	100,0%
	% sa ishodom	100,0%	100,0%	100,0%
χ^2 test		$p = 0,685$		

U tabeli 30. su prikazani rezultati IHH analiza po grupama koje su formirane na osnovu prebojavanja tumorskog tkiva i njihov uticaj na inicijalni odgovor na HT

I grupa - sa ekspresijom P-gp (P-gp+; P-gp 2+ i P-gp 3+);

Ia podgrupa TTF-1 +, p63+; Ib podgrupa TTF-1 +, p63-;

Ic podgrupa TTF-1 -, p63+; Id podgrupa TTF-1 -, p63-.

II grupa – bez ekspresije PGP (PGP -)

Ila podgrupa TTF-1 +, p63 +; I Ib podgrupa TTF-1 +, p63-;

I Ic podgrupa TTF-1-, p63+; I Id podgrupa TTF-1 -, p63-.

Pokazalo se da nema statistički značajne razlike kod naših ispitanika u odnosu na inicijalni odgovor na hemioterapiju kada se porede dva primenjena hemioterapijska režima (gemcitabin/cisplatin i paklitaksel/cisplatin) što je prikazano u tabeli 31. Parcijalni odgovor na HT po protokolu GP imalo je 44,3% bolesnika, a na TP 50% bolesnika, SD u grupi koja je dobijala GP imalo je 26,2% bolesnika, a u grupi koja je dobijala TP 33,3% bolesnika. Progresiju bolesti u grupi koja je primala HT po režimu GP imalo je 29,5%, a po režimu TP 25,9% bolesnika.

Tabela 31. Odgovor na hemioterapiju u zavisnosti od terapijskog protokola

			Odgovor na hemioterapiju			ukupno
			PD	PR	SD	
HT	GP	Broj bolesnika (%)	18 (29,5%)	27 (44,3%)	16 (26,2%)	61 (100%)
		%bol. sa HT	81,8%	69,2%	66,7%	71,8%
	TP	Broj bolesnika (%)	4 (16,7%)	12 (50,0%)	8 (33,3%)	24 (100%)
		% bol. sa HT	18,2%	30,8%	33,3%	28,2%
ukupno		Broj bolesnika (%)	22 (25,9%)	39 (45,9%)	24 (28,2%)	85 (100%)
		% bol. sa HT	100%	100%	100%	100%
χ^2 test		$p = 0,466$				

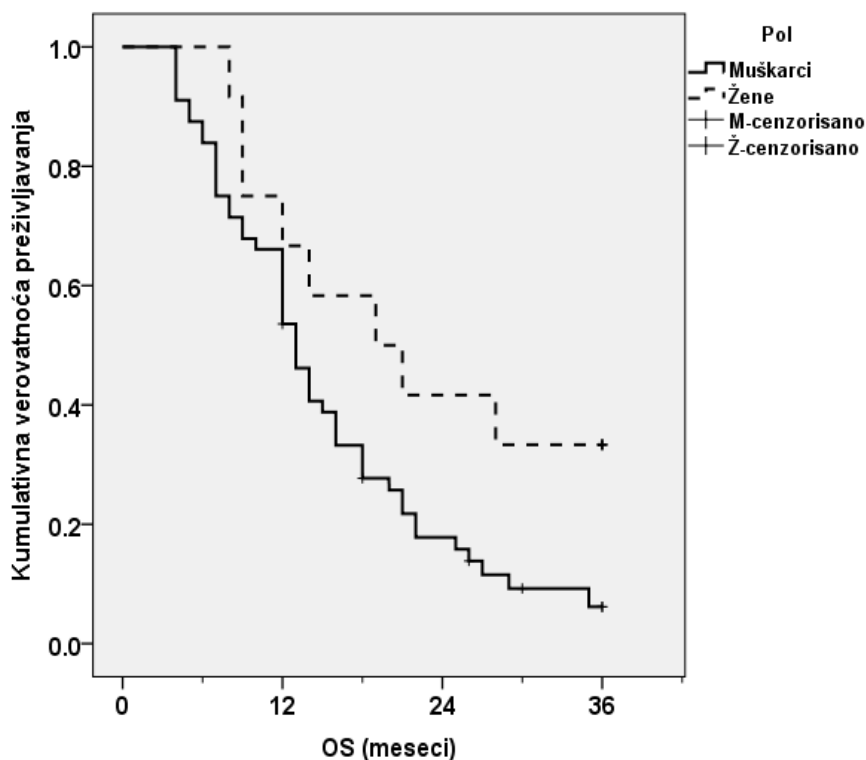
5.4. Rezultati preživljavanja bez progresije bolesti (PFS) i ukupnog preživljavanja (OS) pacijenata sa NSČKP u III i IV stadijum bolesti

Prikazani su rezultati analize uticaja karakteristika bolesnika i karakteristika tumora na preživljavanje bez dalje progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljavanje (OS). Ovi rezultati se odnose se na 68 bolesnika sa NSČKP u III i IV stadijumu bolesti, od toga 56 muškaraca, od kojih su do kraja perioda praćenja preživela šestorica (10,7%) i 12 žena, od kojih su do kraja perioda praćenja preživele četiri (33,3%). Zbog inicijalno manjeg broja bolesnika kojima je rađena IHH analiza ekspresije P-gp, za analizu PFS i OS u odnosu na P-gp ostalo je još manje bolesnika, ukupno 53. Inače je u statističkom smislu radi procene vremena preživljavanja korišćeno cenzurisanje koje se odnosi na pacijente koji su bili živi do kraja perioda praćenja te je procena zato ograničena najdužim vremenom preživljavanja. Medijana za PFS nije određena zbog nedovoljnog broja pacijenata koji su dostigli polovinu ukupnog broja u odnosu na ishod.

Tabela 32. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na polnu pripadnost

Pol	Srednja vrednost PFS u mesecima		
		$\pm SD$	95% Interval pouzdanosti
Muškarci	14,25	1,12	12,05-16,46
žene	11,42	2,52	6,48-16,36
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03
Log Rank (Mantel-Cox)		$p = 0,577$	

Analizom uticaja polne pripadnosti na PFS zaključeno je da nema statistički značajne razlike. Procenjeno srednje PFS kod muškaraca bilo je 14,25 meseci, a za žene 11,42. (videti Tabelu 32).



Kada je reč o vremenu ukupnog preživljavanja, test jednake raspodele preživljavanja u odnosu na pol bolesnika pokazao je da postoji statistički značajna razlika u korist osoba ženskog pola ($p=0,037$) (videti tabelu 33. i grafikon 10.)

Grafikon 10. Kaplan Meier-ova kriva OS u odnosu na pol bolesnika

Tabela 33. Ukupno preživljavanje u odnosu na pol bolesnika

Pol bolesnika	OS u mesecima	
	Srednja vrednost (95% Interval pouzdanosti)	Medijana (95% Interval pouzdanosti)
Muškarci (n=56)	15,25 (12,82-17,69)	13,00 (10,93-15,06)
Žene (n=12)	22,00 (15,61-28,38)	19,00 (7,11-30,88)
Ukupno (n=68)	16,49 (14,09-18,88)	13,00 (11,03-14,97)
Log-Rang (Mantel-Cox)		$p = 0,037^*$

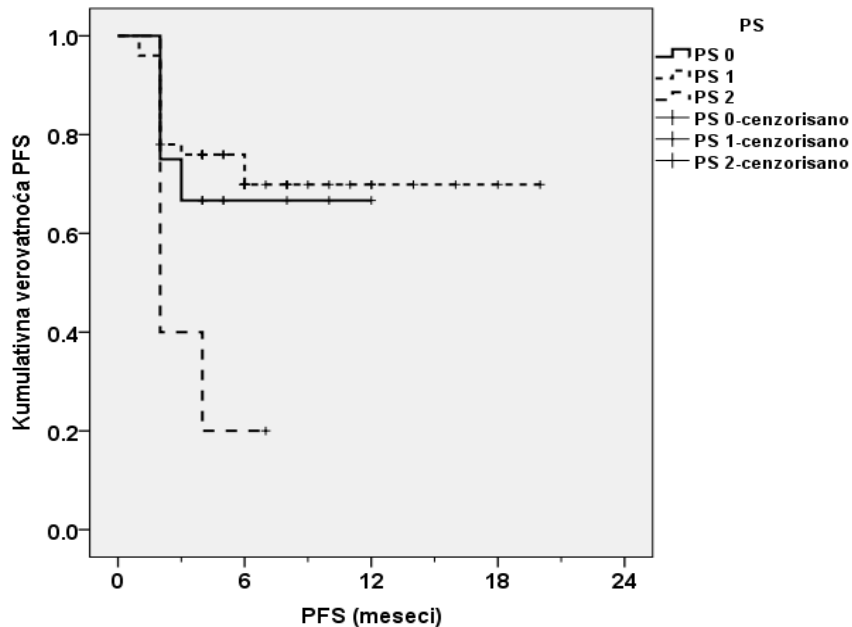
*Statistički značajna razlika

Tabela 34. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na ECOG PS

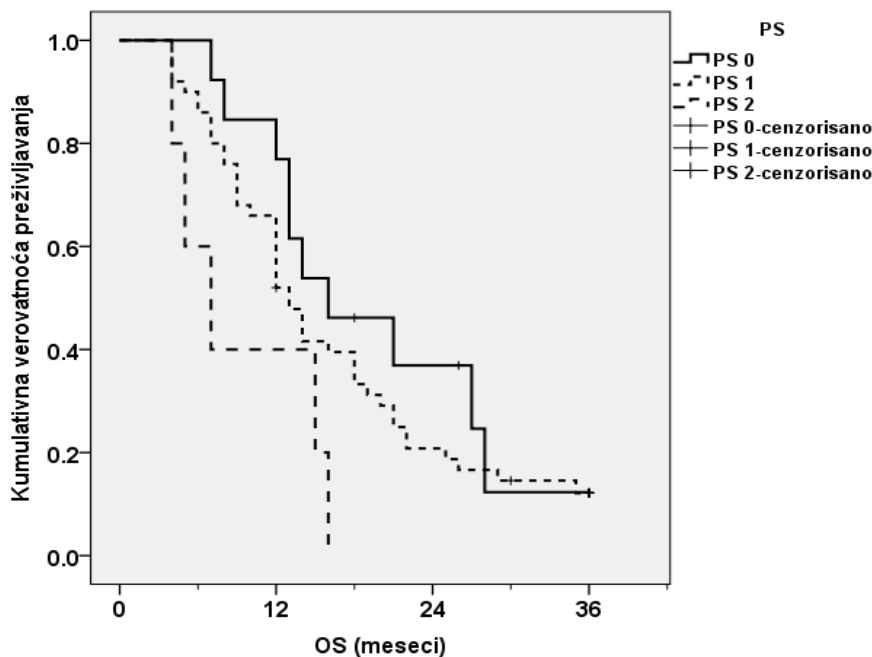
ECOG PS	Srednja vrednost PFS u mesecima			
		±SD	95% Interval pouzdanosti	
PS 0	8,75	1,34	6,15-11,35	
PS 1	14,80	1,18	12,49-17,11	
PS 2	3,40	0,88	1,68-5,12	
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03	
Log- Rang (Mantel-Cox)	PS	PS 0	PS 1	PS 2
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	PS 0		0,688	0,019*
	PS 1			
PS 2	0,086			

Poređenjem odnosa ECOG PS i PFS postoji statistički značajna razlika vremena PFS koje je kraće kod PS 2 (srednje vreme PFS 3,4 meseca) u odnosu na ECOG PS 1 (srednje vreme 14,8 meseci) ($p=0,019$) (tabela 34, grafikon 11).

*Statistički značajna razlika



Grafikon 11. Kaplan Meier-ova kriva PFS u odnosu na ECOG PS



Postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju kada je u pitanju PS 2, u odnosu na PS 0. Za pacijenti sa PS 2 skorom žive najkraće. Procenjeno srednje vreme OS iznosi 9,4 meseca ($p=0,031$) (videti grafikon 12 i tabelu 35).

Grafikon 12. Kaplan Meier-ova kriva OS u odnosu na ECOG PS

Tabela 35. Ukupno preživljavanje u odnosu na ECOG PS

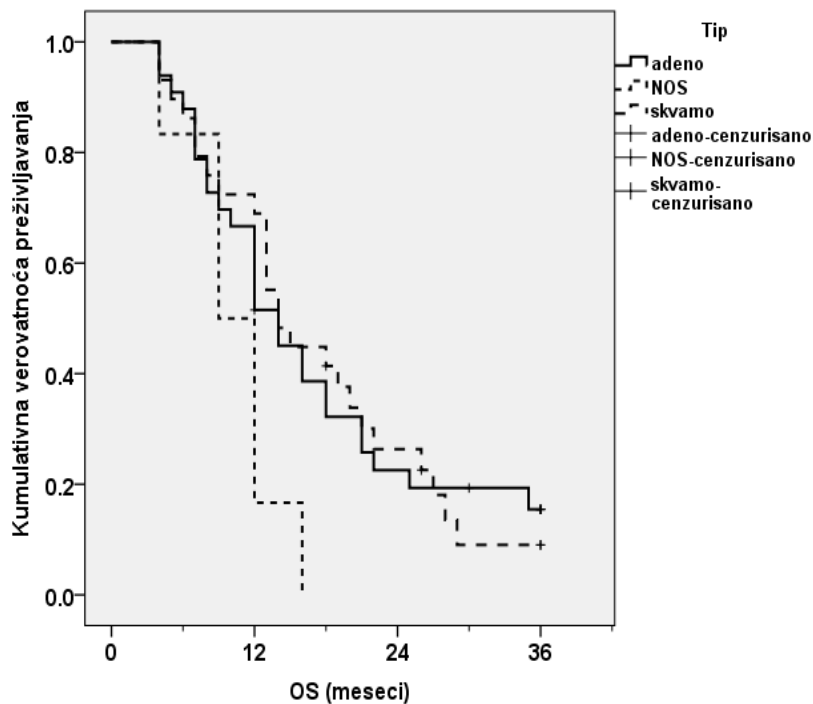
ECOG PS	OS u mesecima			
	Srednja vrednost (95% interval pouzdanosti)	Medijana (95% interval pouzdanosti)		
PS 0 (n=13)	19,52 (14,35-24,70)	16,00 (7,19-24,81)		
PS 1 (n=50)	16,35 (13,55-19,15)	13,00 (10,72-15,28)		
PS 2 (n=5)	9,40 (4,42-14,38)	7,00 (2,71-11,25)		
Ukupno (n=68)	16,49 (14,11-18,88)	13,00 (11,03-14,97)		
Log- Rang (Mantel-Cox)	PS	PS 0	PS 1	PS 2
		p	p	p
	PS 0			0,031*
	PS 1	0,355		
	PS 2		0,059	

*Statistički značajna razlika

Tabela 36. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na histološki tip karcinoma

Histološki tip karcinoma	Srednja vrednost PFS u mesecima		
		±SD	95% Interval pouzdanosti
Adeno	8,75	1,57	10,93-17,09
NOS	14,80	2,27	8,85-17,75
Skvamo	3,40	0,94	6,68-10,36
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03

Log- Rang (Mantel-Cox)	Histološki tip karcinoma	adeno	NOS	skvamo
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	adeno	0,874		0,781
	NOS			
	skvamo			
			0,724	



Grafikon 13. Kaplan Meier-ova kriva OS u odnosu na histološki tip karcinoma

Rezultati analize PFS u odnosu na histološki tip NSČKP nisu pokazali statistički značajnu razliku (tabela 36).

Primenom Log -Rang testa je utvrđeno da je vreme OS kod bolesnika sa NOS NSČKP značajno kraće u odnosu na OS

Tabela 37. Ukupno preživljavanje u odnosu na histološki tip karcinoma

Histološki tip karcinoma	OS u mesecima	
	Srednja vrednost (95% interval pouzdanosti)	Medijana (95% interval pouzdanosti)
Adeno (n=33)	16,96 (13,31-20,62)	14,00 (10,34-17,66)
NOS (n=6)	10,33 (7,11-13,56)	9,00 (4,20-13,80)
Skvamo (n=29)	17,14 (13,63-20,64)	14,00 (10,48-17,52)
Ukupno (n=68)	16,49 (14,11-18,88)	13,00 (11,03-14,97)

Log- Rang (Mantel-Cox)	Histološki tip karcinoma	adeno	NOS	skvamo
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	adeno			0,955
	NOS	0,090		
	skvamo		0,027*	

*Statistički značajna razlika

bolesnika sa skvamocelularnim karcinomom (srednje vreme OS 10,33meseci/medijana 9 meseci prema 17,14meseci/14 meseci) ($p=0,027$). Postoji tendencija kraćeg OS i u odnosu na adenokarcinome (videti tabelu 37 i grafikon 13).

Razlike između IIIa, IIIb i IV kliničkog stadijuma bolesti nisu se pokazale kao statistički značajne kada je u pitanju vreme PFS (tabela 38).

Kada je reč o OS, utvrđena je statistički značajna razliku u korist IIIb u odnosu na IV klinički stadijum bolesti ($p=0,008$). Procenjena srednja vrednost OS za IIIa stadijum bolesti iznosi 17,94 meseca/ medijana 13 meseci, za IIIb 24,66 meseci/ medijana 21 mesec, a za IV stadijum bolesti 13,81meseci/medijana 12 meseci (videti tabelu 39).

Tabela 38. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na stadijum bolesti

Stadijum bolesti	Srednja vrednost PFS u mesecima			
		±SD	95% Interval pouzdanosti	
IIIa	8,76	1,00	6,79-10,73	
IIIb	16,50	2,21	12,16-20,84	
IV	12,04	1,31	9,46-14,62	
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03	
Log- Rang (Mantel-Cox)	Stadijum bolesti	IIIa	IIIb	IV
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	IIIa	0,436	0,303	0,935
	IIIb			
IV				

Tabela 39. Ukupno preživljavanje u odnosu na stadijum bolesti

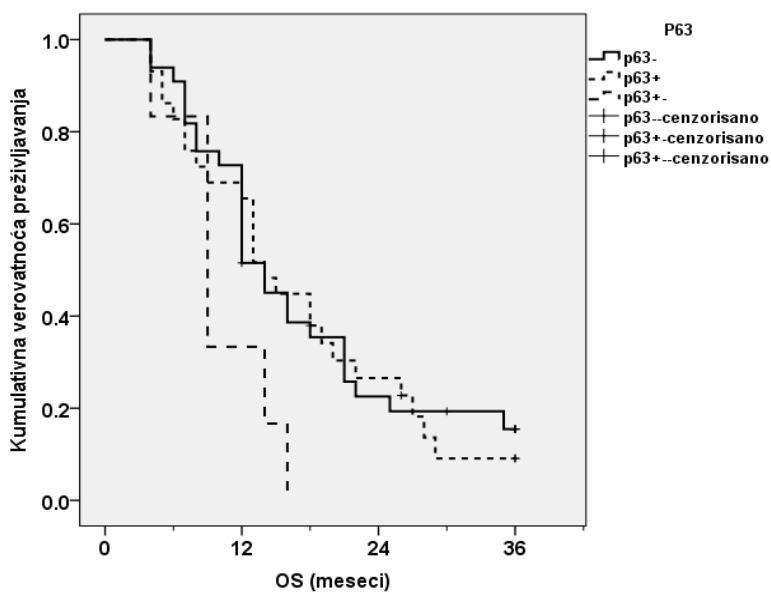
Stadijum bolesti	OS u mesecima				
	Srednja vrednost (95% interval pouzdanosti)		Medijana (95% interval pouzdanosti)		
IIIa (n=24)	17,94 (13,85-22,03)		13,00 (9,34-16,66)		
IIIb (n=8)	24,66 (16,43-32,89)		21,00		
IV (n=36)	13,81 (11,06-16,56)		12,00 (10,34-13,66)		
Ukupno (n=68)	16,49 (14,10-18,88)		13,00 (11,03-14,97)		
Log- Rang (Mantel-Cox)	Stadijum bolesti		IIIa	IIIb	IV
			<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	IIIa		0,087	0,149	0,008*
	IIIb				
IV					

*Statistički značajna razlika

Tabela 40 prikazuje odnos ekspresije p63 i PFS pri čemu nema statistički značajnih razlika.

Tabela 40. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na ekspresiju p63

P63	Srednja vrednost PFS u mesecima			
		±SD	95% Interval pouzdanosti	
P63-	15,39	1,33	12,77-18,00	
P63+	7,99	0,98	6,06-9,92	
P63+-	4,33	0,73	2,90-5,77	
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03	
Log- Rang (Mantel-Cox)	P63	P63-	P63+	P63+-
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	P63-	0,182	0,721	0,189
	P63+			
P63+-				



Postoji statistički značajna razlika u OS između onih sa slabom ekspresijom (p63+-) i grupe bolesnika bez ekspresije (p63-), što je prikazano na grafikonu 14 i u tabeli 41.

Grafikon 14. Kaplan Meier-ova kriva OS u odnosu na ekspresiju p63.

Tabela 41. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju p63

P63	OS u mesecima			
	Srednja vrednost (95% interval pouzdanosti)	Medijana (95% interval pouzdanosti)		
P63- (n=33)	17,36 (13,78-20,95)	14,00 (10,99-17,01)		
P63+ (n=29)	16,75 (13,16-20,35)	14,00 (11,36-16,64)		
P63+- (n=6)	10,17 (6,76-13,58)	9,00 (5,23-12,77)		
Ukupno (n=68)	16,49 (14,11-18,88)	13,00 (11,03-14,97)		
Log- Rang (Mantel-Cox)	P63	P63-	P63+	P63+-
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	P63- P63+	0,806		0,049*
	P63+-		0,068	

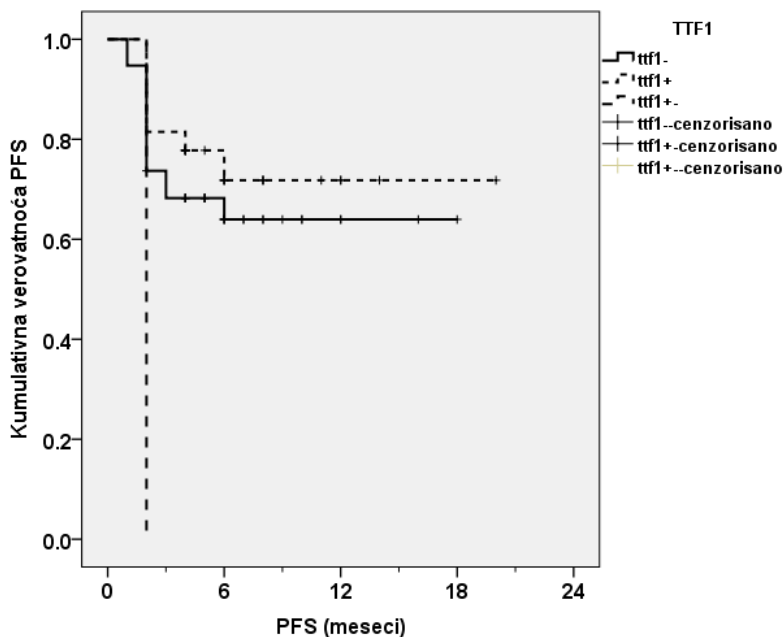
*Statistički značajna razlika

Tabela 42. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na ekspresiju TTF-1

TTF-1	Srednja vrednost PFS u mesecima			
		±SD	95% Interval pouzdanosti	
TTF1 -	12,41	1,25	9,94-14,87	
TTF1 +	15,24	1,55	12,19-18,28	
TTF1+-	2,00	0,00	2,00-2,00	
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03	
Log- Rang (Mantel-Cox)	TTF-1	TTF1-	TTF1+	TTF1+-
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	TTF1- TTF1+	0,420		0,045*
	TTF1+-		0,011*	

*Statistički značajne razlike

U tabeli 42 i na grafikonu 15 prikazani su rezultati odnosa ekspresije TTF-1 i procenjenog vremena preživljavanja bez dalje progresije bolesti, pri čemu postoji statistički značajna razlika između grupe pacijenata koji su imali slabu ekspresiju TTF-1 u odnosu na pacijente sa izra-



ženom ekspresijom TTF-1 ($p=0,011$), kao i u odnosu na one bez ekspresije ($p=0,045$).

Ukupno preživljavanje je takođe značajno niže kod pacijenata sa slabim prebojavanjem TTF-1 (OS je 7 meseci/ medijana 4 meseca) u

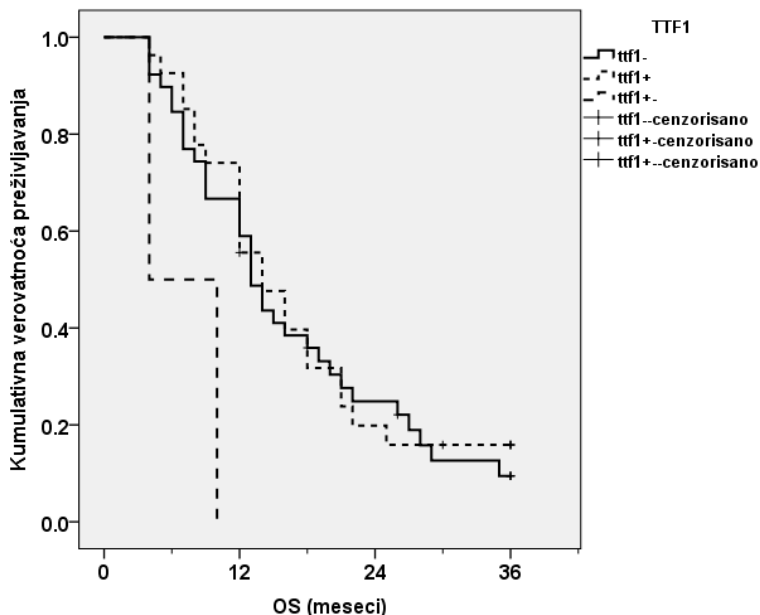
Grafikon 15. Kaplan Meier-ova kriva PFS u odnosu na ekspresiju TTF-1.

Tabela 43. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju TTF-1

TTF-1	OS u mesecima			
	Srednja vrednost (95% interval pouzdanosti)	Medijana (95% interval pouzdanosti)		
TTF-1- (n=39)	16,56 (13,37-19,74)	13,00 (10,96-15,04)		
TTF-1+ (n=27)	17,06 (13,33-20,79)	14,00 (9,21-18,79)		
TTF-1+- (n=2)	7,00 (1,12-12,88)	4,00 (mali broj ispitinika)		
Ukupno (n=68)	16,49 (14,11-18,88)	13,00 (11,03-14,97)		
Log- Rang (Mantel-Cox)	TTF-1	TTF-1-	TTF-1+	TTF-1+-
		p	p	p
	TTF-1- TTF-1+ TTF-1+-		0,750	0,012*
		0,036*		

*Statistički značajne razlike

odnosu na pacijente sa izraženim IHH prebojavanjem TTF-1 (OS 17,6 meseci/ medijana 14



meseci), kao i u odnosu na pacijente bez TTF-1 prebojavanja (OS 16,56 meseci/ medijana 13 meseci). U prvom slučaju statistička značajnost ove razlike iznosi $p=0,012$, a u drugom slučaju $p=0,0036$ (tabela 43, grafikon 16).

Grafikon 16. Kaplan Meier-ova kriva OS u odnosu na ekspresiju TTF-1.

Tabela 44. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na ekspresiju P-gp

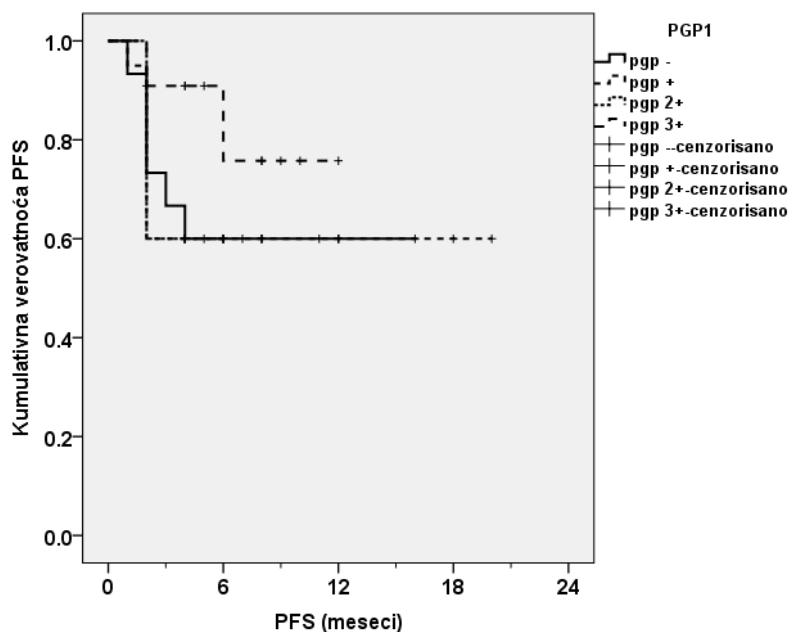
P-gp	Srednja vrednost PFS u mesecima					
		±SD	95% Interval pouzdanosti			
Pgp-	10,53	1,73	7,13-13,93			
Pgp+	12,75	1,99	8,86-16,64			
Pgp2+	4,40	0,88	2,68-6,12			
Pgp3+	10,182	1,14	7,95-12,41			
Ukupno	13,578	1,22	11,19-15,97			
Log- Rang (Mantel- Cox)	Pgp		Pgp-	Pgp+	Pgp2+	Pgp3+
			<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	Pgp-			0,984		0,238
	Pgp+		0,992		0,944	
	Pgp2+			0,218	0,265	
	Pgp3+					

U tabeli 44 (videti i grafikon 17) izneti su rezultati PFS u odnosu nivo ekspresije P-glikoproteina u tumorskom tkivu , gde nije utvrđena statistički značajna razlika među grupama. Tabela 45. prikazuje srednje vrednosti i medijane OS u zavisnosti od nivoa ekspresije P-glikoproteina. Nema statistički značajnih razlika među grupama.

Tabela 45. Srednja vrednost i medijana ukupnog preživljavanja u odnosu na P-gp

P-gp	OS u mesecima	
	Srednja vrednost (95% interval pouzdanosti)	Medijana (95% interval pouzdanosti)
P-gp - (n=14)	14,00 (10,53-17,47)	14,00 (12,83-15,17)
P-gp + (n=22)	18,63 (13,90-23,35)	14,00 (7,10-20,89)
P-gp2+ (n=5)	14,80 (7,38-22,22)	12,00 (5,60-18,44)
P-gp3+ (n=12)	21,00 (14,51-27,49)	20,00 (6,14-33,86)
Ukupno (n=53)	17,52 (14,74-20,30)	14,00 (11,40-16,60)

Log- Rang (Mantel-Cox)	P-gp	P-gp-	P-gp+	P-gp2+	P-gp3+
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
	P-gp-		0,154	0,655	0,112
	P-gp+	0,154		0,340	0,540
	P-gp 2+	0,655	0,340		0,224
	P-gp 3+	0,112	0,540	0,224	



Grafikon 17. Kaplan Meier-ova kriva PFS u odnosu na ekspresiju P-gp

Analiza rezultata preživljavanja bez progresije bolesti u odnosu na inicijalno primenjen hemioterapijski režim GP ili TP, pokazala je da nema statistički značajnih razlika između ove dve grupe bolesnika (videti tabelu 46).

Tabela 46. Preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na inicijalno primenjen HT protokol

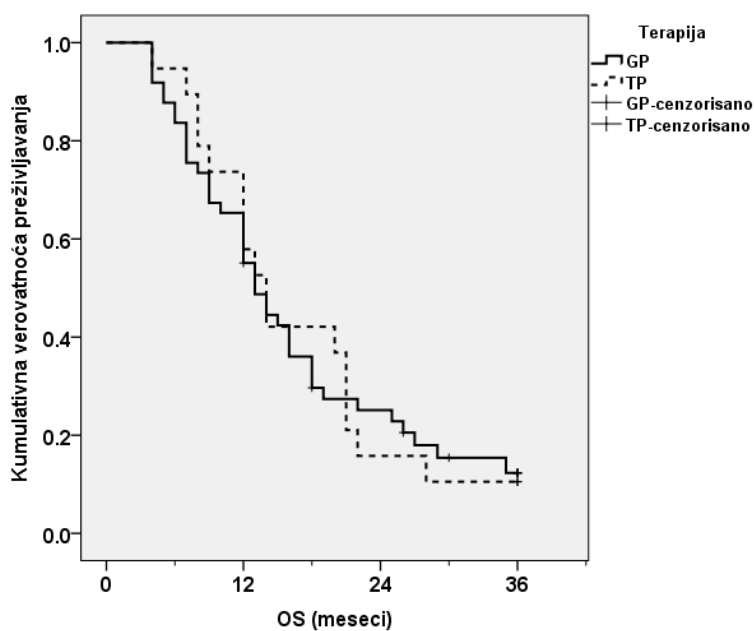
HT protokol	Srednja vrednost PFS u mesecima		
		±SD	95% Interval pouzdanosti
GP	13,31	1,26	10,85-15,77
TP	11,26	1,20	8,91-13,61
Ukupno	13,96	1,06	11,89-16,03
Log- Rank (Mantel-Cox)		$p=0,249$	

Tabela 47. Ukupno preživljavane u odnosu na inicijalno primenjen hemioterajski protokol

HT protokol	OS u mesecima	
	Srednja vrednost (95% Interval pouzdanosti)	Medijana (95% Interval pouzdanosti)
GP (n=49)	16,44 (13,50-19,39)	13,00 (10,35-15,65)
TP (n=19)	16,74 (12,70-20,77)	14,00 (11,19-16,81)
Ukupno (n=68)	16,49 (14,10-18,88)	13,00 (11,03-14,97)

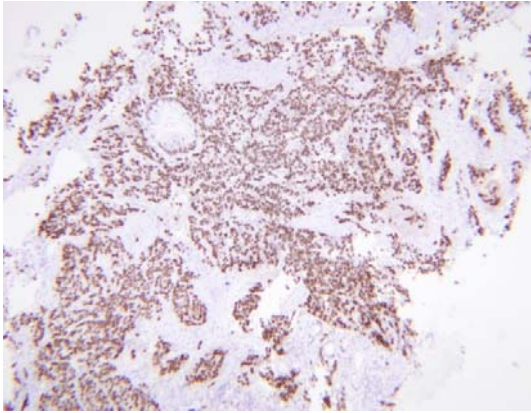
Log- Rang (Mantel-Cox)	HT protokol	GP	TP
		<i>p</i>	<i>p</i>
	GP		0,918
	TP	0,918	

Grafikon 18. Kaplan Meier-ova kriva OS u odnosu na HT protokol

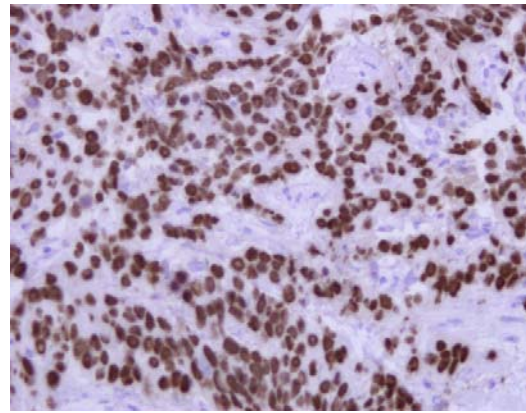


Kada je u pitanju odnos dva terapijska režima u pogledu ukupnog preživljavnja nije bilo statistički značajne razlike među njima kao što je prikazano u tabeli 47 i na grafikonu 18.

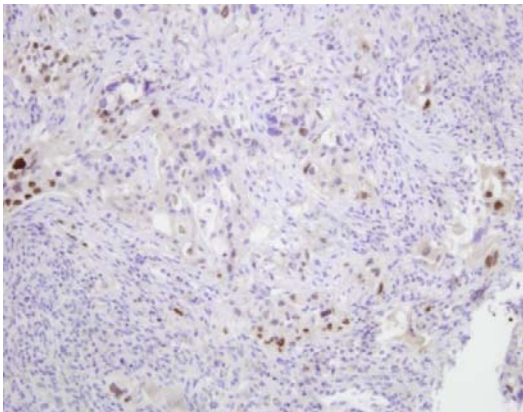
Prilog



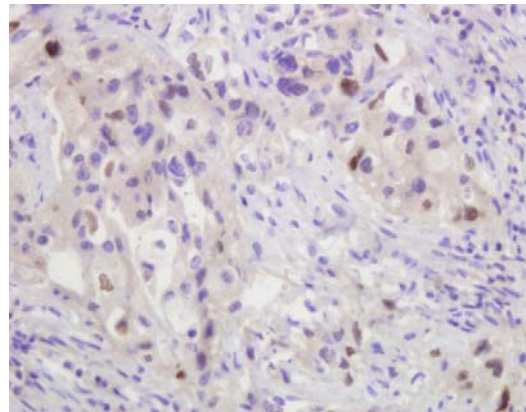
Slika 1. Skvamocelularni karcinom **p63+** (x40)



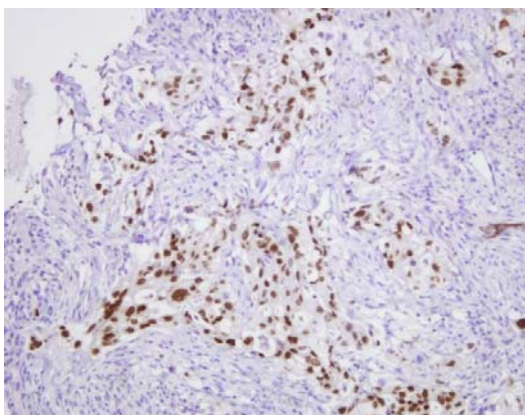
Slika 2. Skvamocelularni karcinomom **p63+** (x200)



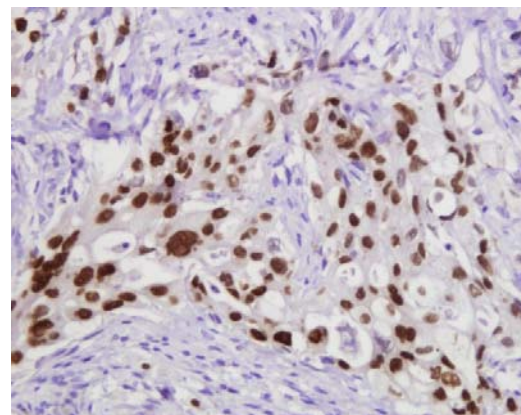
Slika 3. Adenokarcinom **p63+/-** (x100)



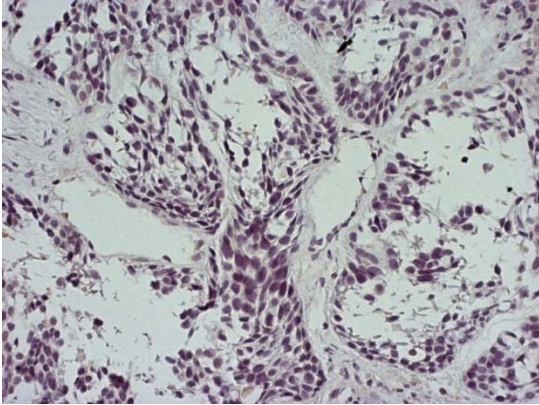
Slika 4. Adenokarcinom **p63+/-** (x200)



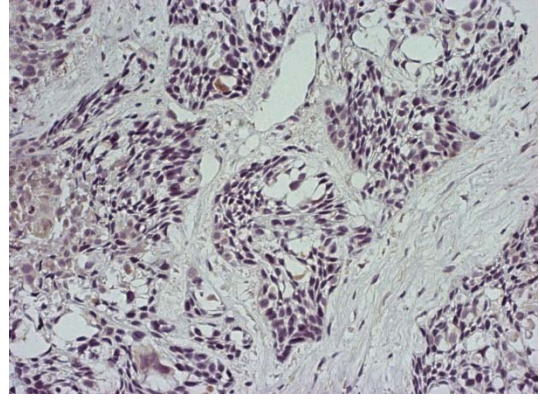
Slika 5. Adenokarcinom **TTF-1 +** (x100)



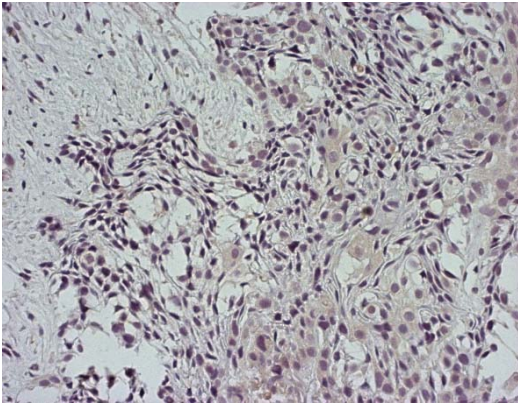
Slika 6. Adenokarcinom **TTF-1 +** (x200)



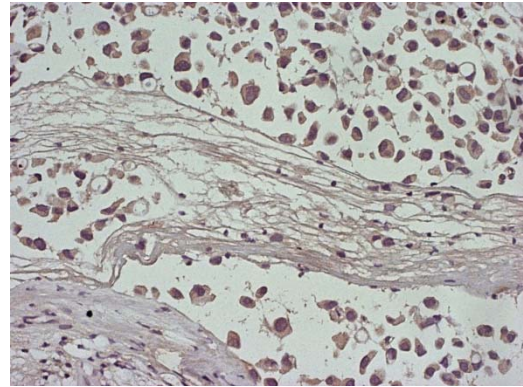
Slika 4. Adenokarcinom, **P-gp -;**(x200)



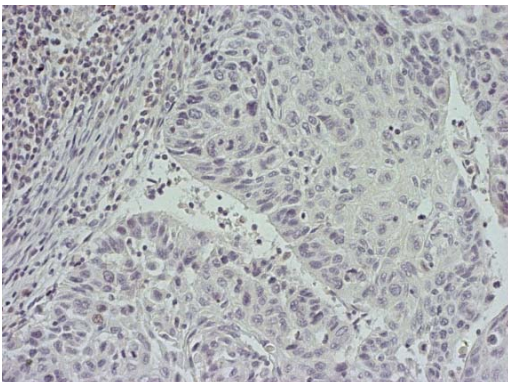
Slika 5. Adenokarcinom, **P-gp 1+;**(x200)



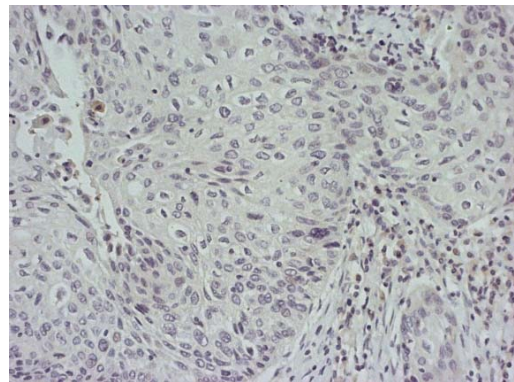
Slika 6. Adenokarcinom; **P-gp 2+;**(x200)



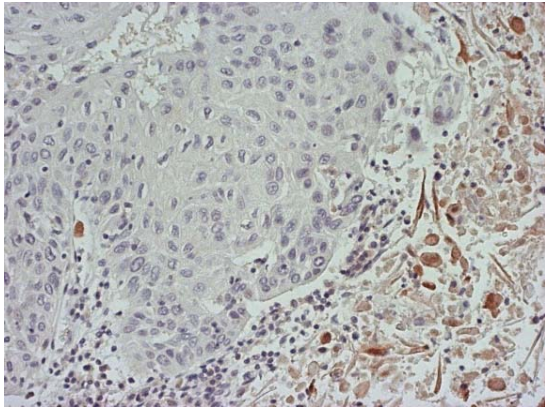
Slika 7. Adenokarcinom; **P-gp 3+;**(x200)



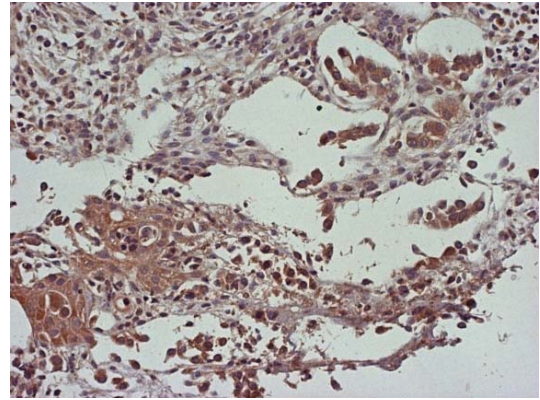
Slika 8. Skvamocel. karc. P-gp -;(x200)



Slika 9. Skvamocel. karc. P-gp 1+;(x200)



Slika 10. Skvamocelul.karcinom; P-gp 2+;
(x200)



Slika 11. Skvamocel.karcinom; P-gp 3+;
(x200)

6. DISKUSIJA

Karcinom pluća je u molekularnom, histološkom i kliničkom smislu kompleksno oboljenje. Raznovrsnost normalnih tipova ćelija duž traheobronhijalnog stabla i njihovih multipotentnih ćelija prethodnika je jedan od razloga raznolikosti ćelija tumora⁴⁸. Pored toga istraživanja pokazuju da postoje tumorske “stem-like” ćelije (cancer stem-like cells) ili kancer-inicirajuće ćelije koje karakteriše sposobnost samoobnavljanja i koje su odgovorne za opstanak i metastaziranje tumora. Ho je sa saradnicima izolovao ovakve ćelije iz šest ćelijskih linija humanih karcinoma pluća i potvrdio pozitivnu korelaciju povećane ekspresije ABC (*ATP-binding cassette* -ABC) G2 i drugih ATP-vezujućih transportera sa rezistencijom na veći broj citostatika⁸⁸. Tumorske ćelije već inicijalno pretrpe mnoštvo mutacija, a njihov dalji razvoj takođe prate brojne mutacije. Treba imati u vidu i specifičnosti genotipova, kao i etničke specifičnosti koje nose sa sobom određene predispozicije kada su karcinomi pluća u pitanju^{89,90}. U kliničkoj praksi, pored napretka ciljane molekularne terapije, standard u lečenju uznapredovalog NSČKP predstavlja primena hemioterapije u prvoj liniji¹⁹. Svi oblici antitumorske terapije ima svoja neželjena dejstva, koja ponekad mogu biti i fatalna. Sa druge strane bez obzira na primenjenu vrstu antitumorske terapije neke ćelije karcinoma mogu biti primarno rezistentne ili se prilagođavaju novonastalim uslovima, mutiraju i razvijaju sposobnost rezistencije. Rezistencija na paklitaksel ispitivana u ćelijskim kulturama javlja se u dva oblika, kao alteracija ili mutacija α - i β -tubulina ili prekomerna ekspresija P-gp-a⁷³. Nasuprot tome istraživanjima na ćelijskim kulturama utvrđena je veća senzitivnost na Gemcitabin onih ćelija koje pokazuju prekomernu ekspresiju P-gp-a⁷⁴. Otkrivanje i potvrda da određeni molekularni marker ima ulogu u odgovoru na antitumorsku terapiju i /ili prognostičku ulogu je veoma značajno. Iz svega navedenog proisteklo je ovo kliničko istraživanje značaja ekspresije P-gp, TTF-1 i p63, kao tri tumorska markera kod bolesnika sa uznapredovalim NSČKP.

6.1. *Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća*

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 85 bolesnika koji su u trenutku dijagnostikovanja imali neresektabilan IIIa, IIIb ili IV klinički stadijumu bolesti. Kada je u pitanju njihova polna pripadnost, muškaraca je bilo 69 (81,2%), a žena 16 (18,8%). To znači da je obolelih muškaraca bilo 4,3 puta više u odnosu na broj obolelih žena. Ova proporcija je u skladu sa epidemiološkom situacijom u svetu i kod nas^{10-12,72}. Prosečna starosna dob pacijenata oba pola pri otkrivanju bolesti bila je 62,9 godina (medijana 63 godine), kod muškaraca 62,52 (medijana 63 godine), a kod žena 64,56 godina (medijana 66 godina). Inače se karcinom bronha karakteriše učestalijom pojavom u starijim starosnim kategorijama, najčešće između 60-79 godina⁸. Najveći broj bolesnika 77,6% je u trenutku postavljanja dijagnoze imao ECOG PS skor 1. Adenokarcinom je dijagnostikovao kod 47,1% bolesnika, skvamocelularni karcinom kod 38,8% bolesnika, dok je neklasifikovani nemikrocelularni karcinom pluća (NOS) dijagnostikovao kod 14,4%. Procenat NOS je u našem radu sličan je procentu rezultata koje je objavio Collins. On je iz tkivnih uzoraka dobijenih endobronhijalnom ultrazvučnom aspiracionom biopsijom finom iglom (endobronchial ultrasound fine-needle aspiration biopsy) radio subklasifikaciju NSČKP imunohistohemijskim panelom kod 81 bolesnika. U 85% je postavljena dijagnoza adenokarcinoma ili skvamocelularnog karcinoma, dok je dijagnoza NOS NSČKP postavljena u 15% bolesnika⁹¹. Sa druge strane Sigel i saradnici su mišljenja da je dopušteno da svega 7% svih NSČKP iz uzoraka dobijenih bronhijalnom biopsijom i citoloških uzoraka, posle morfološkog pregleda, IHH i bojenja mucinom, ostane neklasifikovano⁹². Ipak, uprkos primeni sofisticiranih metoda analize malih tkivnih uzoraka dijagoza NOS NSČKP u praksi se javlja u oko 10 do 30% kao i u ovom radu⁹³.

Analizirani bolesnici su bili najčešće u IV kliničkom stadijumu bolesti 49,4%, zatim u IIIa 36,5%, a najmanje ih je bilo u IIIb kliničkom stadijumu bolesti 14,1%. Najviše bolesnika je imalo T2 45,9% i N2 bolest 58,8%. Bez udaljenih metastaza bilo je 50,6% bolesnika. Odluka o primeni određenog HT protokola za svakog bolesnika ponaosob doneta je konzilijarno u skladu sa preporukama „Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje karcinoma pluća”⁹⁴. Bolesnika kojima je ordinirana hemioterapija po protokolu gemcitabin/platina bilo je 71,8%, dok je 28,2% bolesnika dobilo hemioterapiju po protokolu paklitaksel/platina. Pacijenti

koji su ispitivani ispunjavali su i kriterijume kliničkih studija koje se bave procenom efekata hemioterapije⁶.

6.2. Rezultati imunohistohemijskih analiza ekspresije p63, TTF-1 i P-gp i korelacija primenjenih hemioterapijskih protokola sa kliničkim karakteristikama ispitanika i patohistološkim odlikama karcinoma

Imunohistohemijske analize ekspresije p63 i TTF-1 rađene su prilikom dijagnostike iz uzoraka tumorskih tkiva svih 85 pacijenata. Ekspresiju p63 imalo je 38,8% bolesnika, a slabu ekspresiju 10,6%. Kada je u pitanju ekspresija p63 u odnosu na patohistološki tip tumora postoji visoko značajna ekspresija kod skvamocelularnog karcinoma u odnosu na adenokarcinome i NOS NSČKP ($p < 0,001$). Od 33 bolesnika sa izraženom ekspresijom p63, 31 je imao skvamocelularni karcinom, što iznosi 93,6%, od ukupnog broja bolesnika sa ekspresijom p63. Zanimljivo je da je od ukupno 9 bolesnika sa slabom ekspresijom p63, čak 5 bolesnika imalo adenokarcinom (55,6%). Zapravo ako posmatramo odvojeno skvamocelularne karcinome praktično je 97% bilo p63 pozitivno ili slabo pozitivno, a u okviru grupe pacijenata sa adenokarcinomima pozitivnih ili slabopozitivnih p63 je bilo 17,5%. Za IHH dijagnostiku skvamocelularnog karcinoma preporučuje se kao veoma pouzdan i specifičan p63, ali se u novije vreme kao specifičniji pokazao polikonski p40^{50,95,96}. Kod čak 20% do 30% adenokarcinoma može se javiti fokalno ili slabo prebojavanje sa p63⁵⁰. Bir i saradnici su 2014. godine objavili slične rezultate IHH prebojavanja grupe NSČKP, prema kojima je 24 od 25 (96%) skvamocelularnih karcinoma bilo p63 pozitivno, a kod 6 od 20 adenokarcinoma (25%) javilo se slabo prebojavanje p63⁹⁷. Prema rezultatima Yamana i saradnika objavljenim 2015. godine p63 prebojavanje je bilo pozitivno u 87,5% skvamocelularnih i u 4,3% adenokarcinoma⁹⁸.

Ekspresija TTF-1 je detektovana IHH u tumorskom tkivu 38,8% bolesnika, slaba ekspresija u tkivu 3,5%. Kod adenokarcinoma postoji statistički visoko značajna ekspresija TTF-1 uz potpuno odsustvo ekspresije i slabe ekspresije TTF-1 kod skvamocelularnog karcinoma ($p < 0,001$). Od 33 bolesnika sa ekspresijom TTF-1, histologiju adenokarcinoma imalao je 32

bolesnika, dok je jedan imao histologiju NOS NSČKP. Ako se osvrnemo samo na grupu bolesnika koji su imali adenokarcinom ekspresija ili slaba ekspresija TTF-1 se ispoljila kod 85% bolesnika. Prema literarnim podacima nivo pozitivnosti TTF-1 varira i javlja se kod oko 84% sitonćelijskih karcinoma, 77% adenokarcinoma i 8% skvamocelularnih karcinoma⁵³. Zhao i saradnici su u svom radu objavljenom 2014.godine imali slične rezultate: TTF-1 prebojavanje se javilo u 20 od 25 adenokarcinoma (80%), a ni jedan od 16 skvamocelularnih karcinoma nije imao ekspresiju TTF-1⁹⁶. Inače je za TTF-1 je dijagnostički informativno prebojavanje jedra. Kao pozitivno prebojavanje se računa čak i samo fokalno prebojavanje u tumoru (1% do 10% tumorskih ćelija). Kod oko 10% TTF-1 pozitivnih adenokarcinoma prebojavanje je prisutno u manje od 10% neoplastičnih ćelija. Citoplazmatsko prebojavanje varira od klona TTF-1, zavisno i od dobavljača, kao i od pufera koji se koristi⁵³.

Treba naglasiti da je IHH analiza P-gp u ovoj studiji rađena naknadno, tako da zbog nedovoljno tumorskog tkiva ili izražene nekroze nije uspela ili nije mogla biti urađena kod čak 22 od ukupno 85 bolesnika, odnosno kod 25,9%. Od preostalih 63 uzorka u 74,6% bolesnika došlo je do IHH prebojavanja P-gp u tumorskim ćelijama. U grupi onih sa P-gp+ 51,9% je imalo adenokarcinom, 33,3% skvamocelularni karcinom, 14,8% NOS; u grupi sa P-gp2+ 71,4% je bilo sa adenokarcinomom, a po 14,3% sa NOS i skvamocelularnim karcinomom; u grupi sa P-gp 3+ 69,2% je bilo sa adenokarcinomom i 30,8% sa skvamocelularnim karcinomom. Kod ovakvog grupisanja pri čemu se vodi računa o procentu ekspresije P-gp nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na patohistološki tip tumora, kao ni u odnosu na stadijum bolesti. Međutim, ukoliko izvršimo grupisanje na one kod kojih nema ekspresije P-gp i one kod kojih postoji ekspresija P-gp bez obzira na procenat te ekspresije (P-gp+, P-gp 2+ i P-gp 3+), utvrđeno je da postoji statistički značajno češća ekspresija P-gp kod adenokarcinoma 87,5% (28/32) u odnosu na skvamocelularni karcinom 60,9% (14/23) ($p = 0,022$). Wei i saradnici su u svom radu kojim su obuhvatili 127 bolesnika sa NSČKP dobili IHH ekspresiju P-gp kod 44,1% bolesnika, a pri tome je ekspresija takođe bila statistički značajno češća kod adenokarcinoma 57,6% u odnosu na skvamocelularne karcinome 16,7%⁹⁹. Roy i saradnici su pri ispitivanju ekspresije P-gp u 38 bolesnika sa NSČKP dobili ekspresiju kod 71% bolesnika, što je slično našem rezultatu¹⁰⁰.

6.3. Rezultati inicijalnog odzgora na hemioterapiju i korelacija sa kliničkim karakteristikama ispitanika i patohistološkim odlikama karcinoma

Posle primene 2 ciklusa hemioterapije (HT) po protokolima gemcitabin/platina /GP) ili paklitaksel/platina (TP) učinjena je procena stanja bolesti u skladu sa RECIST kriterijumima ⁸⁷. Raspodela hemioterapijskih protokola u odnosu na patohistološki tip karcinoma, kao i u odnosu na stadijum bolesti bila je bez statistički značajne razlike.

Povoljan odgovor na hemioterapiju imala su 63 bolesnika (74,1%), a od toga parcijalni odgovor (PR) je imalo 39 bolesnika (45,9% u odnosu na ukupan broj bolesnika), stabilno stanje (SD) bolesti 24 bolesnika (28,25 do ukupnog broja), dok je 22 bolesnika (25,9% od ukupnog broja) imalo progresiju bolesti (PD).

Ispitivanjem uticaja kliničkih karakteristika ispitanika i patohistoloških odlika karcinoma na odgovor na hemioterapiju imali smo za cilj da utvrdimo da li neki od ovih karakteristika, a pre svega IHH analizirani P-gp, TTF-1 i p63, mogu imati prediktivni značaj. Prediktivni markeri služe kao svojevrsni indikator da li određeni pacijent može imati korist od određenog oblika antitumorske terapije ¹⁰¹. Pokazalo se da polna pripadnost nema značajnog uticaja na odgovor na hemioterapiju. Povoljan odgovor na hemioterapiju imalo je 75% žena i 73,9% muškaraca. Pacijenti u ovom radu imali su procenjeni ECOG PS u opsegu od 0 do 2. Utvrđen je statistički značajan uticaj PS na inicijalni odgovor na hemioterapiju. U grupi bolesnika koji su imali nepovoljan odgovor na hemioterapiju čak 80% pripadalo je grupi bolesnika kod kojih je PS 2 ($p=0,015$), a oni su činili 18,3 % od ukupnog broja bolesnika kojima je ordinirano dva ciklusa HT, međutim nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na HT protokol. Carter, Barrett, Kaye i saradnici su 2014. godine objavili sveobuhvatni pregled negenetskih prognostičkih i prediktivnih faktora koji imaju uticaj na ishod kod uznapredovalih NSČKP u kome su obrađeni rezultati 54 studije publikovane od januara 2000. godine do novembra 2010.godine. Od tog broja 10 studija se bavilo i /ili prediktivnim faktorima. Dve, od deset studija su ispitivale i potvrdile značaj PS kao prediktivnog faktora ¹⁰². Rezultati ove studije su takođe u prilog značaju PS kao prediktivnog faktora.

Nije nađena statistički značajna razlika u inicijalnom odgovoru na hemioterapiju u zavisnosti od patohistološkog tipa tumora, T i M statusa tumora, kao ni između IIIa, IIIb i IV stadijuma bolesti, ali je potvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost nepovoljnog

odgovora na HT sa N2 statusom ($p=0,050$). Od bolesnika koji su imali PD čak 81,8% je imalo N2 bolest. Ovi rezultati ukazuju na prediktivni značaj N statusa kod NSĆKP. Inače je N status prema literaturnim podacima značajan u prognostičkom smislu ¹⁰³.

Osnovno pitanje ove studije bilo je da li p63, TTF-1 i P-gp mogu imati ulogu prediktivnih markera? Da li mogu pomoći u rešavanju problema rezistencije na hemioterapiju ili razvoju novih terapijskih pristupa? Najveći broj radova koji se bave ispitivanjem uticaja P-gp na rezistenciju na određeni citosatik jesu radovi na ćelijskim linijama, zapravo radovi *in vitro*. Melguizo je sa saradnicima ispitivanjem ekspresije P-gp na ćelijskim linijama NSĆKP pratio uticaj karboplatina i paklitaksela. Rezultati tog istraživanja sugerišu da istovremena primena karboplatina i paklitaksela može pojačati ekspresiju MDR1 gena, više nego kada se ovi citostatici primenjuju pojedinačno ¹⁰⁴. Ikuta i saradnici su svojim ispitivanjima na ćelijama NSĆKP utvrdili da MDR1 nema značajnu ulogu u rezistenciji na cisplatin ¹⁰⁵. Bergman i saradnici su na osnovu istraživanja na ćelijskim linijama (pored ostalih bile su zastupljene i ćelije NSĆKP) sugerisali da prekomerna ekspresija P-gp-a najverovatnije dovodi do stresa ćelije i pojačanog metabolizma gemcitabina, te do pojačane osetljivosti ćelija ⁷⁴. Veoma je značajan rad koji su Barrera-Rodriguez i Fuentes publikovali 2015. godine. Rad se odnosi na ispitivanje osetljivosti na 8 citostatika, među kojima su i cisplatin i etopozid, na tumorskim ćelijskim linijama i na tumorskim sferoidnim kulturama, pri čemu je P-gp analiziran IHH, a rezultati tog rada pokazuju brži razvoj rezistencije kod sferoidnih kultura i različite mehanizme rezistencije u odnosu na ćelijske linije tumora, dok zaključak ukazuje na značaj međusobnog ćelijskog uticaja i važnost mikrosredine u sferoidnim kulturama tkiva čije ćelije upravo zbog toga imaju prednost u adaptaciji na nove uslove, što omogućava brži razvoj rezistentnog fenotipa ¹⁰⁶. Zanimljivi su i rezultati Yina i saradnika koji su radili meta-analizu farmakogenetike kod pacijenata sa NSĆKP lečenih HT na bazi platinskih preparata. Oni su uočili statistički značajnu razliku u vezi sa MDR1 C3435T kod azijske u odnosu na kavkasku populaciju, pri čemu MDR1 C3435T značajno korelira sa odgovorom na HT preparatima platine samo kada je u pitanju azijska populacija ⁸⁹. Vlachogeorgos je sa saradnicima pratio odgovor na HT po protokolu cisplatin, ifosfamid, vinblastin u odnosu na ekspresiju P-gp. Od ukupno 39 bolesnika 25 nije imalo ekspresiju P-gp i upravo su ti bolesnici imali značajno bolji odgovor na HT ¹⁰⁷.

Kada smo analizirali uticaj prisustva i nivoa ekspresije p63, TTF-1 i P-gp kod bolesnika sa uznapredovalim NSĆKP na inicijalni odgovor na hemioterapiju, nismo dobili statistički

značajnu razliku. Pokazalo se da nema statističke značajnosti ni kada se porede dva primenjena hemioterapijska režima (gemcitabin/cisplatin i paklitaksel/cisplatin). Parcijalni odgovor na HT po protokolu GP imalo je 44,3% bolesnika, a na TP 50% bolesnika, SD u grupi koja je dobijala GP imalo je 26,2% bolesnika, a u grupi koja je dobijala TP 33,3% bolesnika. Progresiju bolesti u grupi koja je primala HT po režimu GP imalo je 29,5%, a po režimu TP 25,9% bolesnika. Prema rezultatima velike randomizovane studije ECOG-a koju su 2002. godine publikovali Schiller, Harrington, Belani i saradnici, takođe nije bilo značajnih razlika u odgovoru na ova dva terapijska režima kada su primenjeni kod bolesnika sa uznapredovalim oblikom NSČKP⁶.

6.4. Rezultati preživljavanja bez progresije bolesti (PFS) i ukupnog preživljavanja (OS) pacijenata sa NSČKP u III i IV stadijum bolesti

Analiza uticaja karakteristika bolesnika i tumora na preživljavanje bez dalje progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljavanje (OS) odnosi se na 68 bolesnika sa NSČKP u III i IV stadijumu bolesti, od toga 56 muškaraca, od kojih su do kraja perioda praćenja preživela šestorica (10,7%) i 12 žena, od kojih su do kraja perioda praćenja preživele četiri (33,3%). Broj bolesnika od inicijalnog broja 85 sveo se na 68, jer nismo imali mogućnost daljeg praćenja 17 bolesnika koji su lečenje i kontrole nastavili u drugim zdravstvenim ustanovama. Zbog inicijalno manjeg broja bolesnika kojima je rađena IHH analiza ekspresije P-gp, za statističku analizu PFS i OS u odnosu na P-gp ostalo je ukupno 53 bolesnika.

Polna pripadnost nije imala značajan uticaj na PFS (kod muškaraca 14,3 meseca, a kod žena 11,4 meseca). Sa druge strane postoji značajna statistička razlika u korist osoba ženskog pola kada se gleda vreme ukupnog preživljavanja ($p=0,037$). Medijana preživljavanja za osobe muškog pola iznosila je 13 meseci (srednja vrednost 15,3 meseci) dok je kod žena medijana iznosila 19 meseci (srednja vrednost 22 meseca). Od 45 studija koje su ispitivale povezanost polne pripadnosti i ishoda, nađena je značajna prednost kod osoba ženskog pola i povezanost sa boljim ishodom u 17 (38%) studija¹⁰².

Poređenjem uticaja ECOG PS na PFS i OS postoji statistički značajna razlika koja, kao što je očekivano, pokazuje da najlošiju prognozu imaju pacijenti sa PS 2. PFS koje je značajno kraće kod PS 2 (srednje vreme PFS 3,4 meseca) u odnosu na PS 1 (srednje vreme 14,8 meseci) ($p=0,019$). Kada je u pitanju OS, pacijenti sa PS 2 skorom žive najkraće ($p=0,031$). Procenjeno srednje vreme OS za PS 2 iznosi 9,4 meseca (medijana 7 meseci), dok je za PS 0 19,5 meseci (medijana 16 meseci). Od 49 studija koji se su procenjivale PS kao prognostički faktor, rezultati 36 (73%) su potvrdili da postoji značajna povezanost ECOG PS i kliničkog ishoda, odnosno da je bolji PS (niži ECOG PS skor) povezan sa boljim ishodom¹⁰².

Rezultati analize ukupnog preživljavanja u odnosu na histološki tip NSČKP pokazali su da grupa pacijenata sa NOS histološkim tipom karcinoma ima najkraće vreme OS (srednja vrednost 10,3 / medijana 9 meseci), što je u odnosu na adenokarcinom kraće (srednja vrednost 17,0 / medijana 14 meseci), a statistički značajno kraće u odnosu na pacijente sa skvamocelularnim karcinomom (srednje vreme 16,5/ medijana 13 meseci) ($p=0,027$). Od 31 studije koje su procenjivale značaj histologije kao prognostičkog faktora, četiri studije 4 (12,9%) su pokazale da postoji prednost adenokarcinoma u odnosu na ostale histološke tipove NSČKP¹⁰².

Razlike između IIIa, IIIb i IV kliničkog stadijuma bolesti nisu se pokazale kao statistički značajne kada je u pitanju PFS. Nije iznenađujući rezultat da postoji statistički značajna razlika u OS u korist IIIb (24,7 meseci) u odnosu na IV (13,8 meseci) klinički stadijum bolesti ($p=0,008$). Od 38 studija koje su poredile IIIb i IV stadijum bolesti, 21 (55%) studija je pokazala da postoji značajna povezanost nižeg stadijuma sa boljim ishodom¹⁰².

Prema rezultatima ovog istraživanja nije nađen uticaj ekspresije p63 na PFS. Međutim u odnosu na OS pokazalo se da postoji statistički značajna razlika ($p=0,049$) između pacijenata čiji tumori imaju slabu ekspresiju p63 (p63+-) u odnosu na grupu bolesnika bez ekspresije (10,17meseci prema 17,36meseci). Uočena je i tendencija boljeg ishoda kod pacijenata sa izraženom ekspresijom p63 u odnosu na grupu bez ekspresije ($p=0,068$). Ma, Fan i saradnici su istraživali značaj p63 ekspresije u skvamocelularnom karcinomu pluća kod 76 bolesnika sa ranim stadijumom bolesti (I, II i IIIA-ali samo oni koji su imali T4N0), a na osnovu postoperativnog praćenja dobijeni su rezultati koji pokazuju da postoji korelacija visoke ekspresije p63 sa boljom prognozom¹⁰⁸.

Istraživanje u ovoj studiji je pokazalo da postoji značajna korelacija PFS i ekspresije TTF-1. Postoji statistički značajna razlika između grupe pacijenata koji su imali slabu ekspresiju

TTF-1 (procenjena srednja vrednost PFS je 2 meseca) u odnosu na one sa izraženom ekspresijom TTF-1 (PFS je 15,24 meseca; $p=0,011$) i u odnosu na one bez ekspresije TTF-1 (PFS je 12,41 meseci; $p=0,045$). Ukupno preživljavanje je takođe značajno niže kod pacijenata sa slabom ekspresijom TTF-1 (OS je 7 meseci; OS medijana je 4 meseca) u odnosu na pacijente sa izraženom ekspresijom TTF-1 (OS 17,6 meseci; medijana OS 14 meseci) kao i u odnosu na pacijente bez TTF-1 ekspresije (OS 16,56 meseci; medijana 13 meseci). U prvom slučaju statistička značajnost ove razlike iznosi $p=0,012$, a u drugom slučaju $p=0,0036$. Yaman je sa saradnicima proučavao ekspresiju TTF-1 i p63 i nisu našli značajan uticaj ovih markera na PFS i OS. Njihovo ispitivanje se odnosilo na 80 pacijenata kojima je učinjena operacija zbog skvamocelularnog ili adenokarcinoma pluća i potvrdilo je da su ovi markeri veoma pouzdani za dijagnostiku ova dva tipa NSČKP⁹⁸. Barlesi i saradnici su na osnovu istraživanja kod 106 bolesnika sa primarnim adenokarcinomom pluća u III ili IV stadijumu bolesti zaključili da postoji pozitivna korelacija TTF-1 prebojavanja sa preživljavanjem¹⁰⁹.

Na osnovu meta-analize 10 radova publikovanih između 1999. godine i 2005. godine (ukupan broj pacijanata 1101, po studiji od 50 do 284) Berghmans i saradnici su zaključili da pacijenti sa TTF-1 pozitivnim tumorima imaju značajno bolje preživljavanje, uz napomenu da se to pokazalo u studijama koje su rađene uglavnom kod pacijenata sa primarnim adenokarcinomom pluća u ranom ili lokalno uznapredovalom stadijumu bolesti, a da je samo jedna studija rađena i kod IV stadijuma bolesti. U pet studija nije bilo razlike u preživljavanju između onih sa TTF-1 pozitivnim i TTF-1 negativnim tumorima, a od tih pet studija tri su bile podesne za meta-analizu¹¹⁰. Elsamany i saradnici su objavili rezultate retrospektivne studije na 120 pacijanata sa uznapredovalim ne-skvamoznim NSČKP. Pokazalo se da su žene imale bolje vreme PFS i OS. Interesantno je da je OS bilo bolje kod pacijenata sa TTF-1 pozitivnim, ako se porede sa TTF-1 negativnim, ali samo kod univarijantne analize, ali ne i kod multivarijantne analize kada su uzeti u obzir drugi klinički i terapijski parametri. S toga su zaključili da TTF1 ekspresija nije prognostički marker kod uznapredovalih neskvamoznih NSČKP¹¹¹. Grønberg i saradnici su analizirali ekspresiju TTF-1 u 236 uzoraka tumorskog tkiva kod uznapredovalog NSČKP i našli značajnu prednost u OS kod pacijenata sa TTF-1 pozitivnim tumorima. Inače se radilo o pacijentima koji su lečeni po protokolu pemetreksed/karboplatin ili gemcitabin/karboplatin pri čemu je povezanost TTF-1 i OS bila slična u oba terapijska režima¹¹². Zhan i saradnici su radili meta-analizu 17 studija, koje su procenjivale prognostički značaj TTF-1 kod bolesnika sa NSČKP,

publikovanih između 1999. godine i 2012. godine (ukupno 2235 bolesnika, od 57 do 496 po studiji). Rezultati su bili kontradiktorni. Jedna od ovih 17 studija je pokazala negativan uticaj TTF-1 na preživljavanje, 4 studije nisu potvrdile postojanje veze između preživljavanja i TTF-1, dok su ostale potvrdile pozitivnu vezu između izražene ekspresije TTF-1 i preživljavanja. Ova meta-analiza je pokazala da TTF-1 ima pozitivan prognostički značaj u I stadijumu i u IIIb-IV stadijumu bolesti ¹¹³. Behrens i saradnici su na osnovu ispitivanja TTF-1 ekspresije kod 320 pacijenata od I do III stadijuma bolesti sa NSČKP zaključili da postoji značajna korelacija izraženije ekspresije TTF-1 sa boljim OS ¹¹⁴.

Kada je u reč o odnosu nivoa ekspresije P-glikoproteina u tumorskom tkivu u odnosu na PFS i OS, nema statistički značajnih razlika među grupama.

Analiza rezultata PFS i OS u odnosu na inicijalno primenjen hemioterapijski režim GP ili TP, pokazala je da nema statistički značajnih razlika između ove dve grupe bolesnika.

6.5 Ograničenja studije

Istraživanje odgovora na hemioterapiju podrazumeva pridržavanje strogim i ujednačenim kriterijumima što je svakako umanjilo mogućnost da se u okviru jednog zdravstvenog centra uključi veći broj pacijenata. Relativno mali broj pacijenata (ukupno 85 , odnosno 63 pacijenata kojima je urađena IHH analiza P-gp) jeste glavno ograničenje ove studije. Inače su to glavna ograničenja postojećih kliničkih studija gde se broj ispitanika kreće od 50 naviše, uz napomenu da nismo otkrili ni jednu kliničku studiju koja se odnosi na karcinome pluća u kojoj su istovremeno analizirani TTF-1, p63 i P-gp. Ipak ovakve studije su se pokazale značajne za meta-analize.

Drugo značajno ograničenje koje treba imati na umu jeste da su u pitanju bolesnici kod kojih se dijagnostički material svodi na male, ponekad i nereprezentativne uzorke tumorskog tkiva ili metastatski izmenjenog limfnog čvora. Jedan od eventualnih problema jeste mogućnost da mali uzorci budu histološki različiti u odnosu na ostatak celog tumora.

Imunohistohemijske analize predstavljaju veoma važnu proceduru u procesu dijagnostike karcinoma pluća, naročito kada se radi o malim dijagnostičkim uzorcima. Međutim ova procedura ima i svoje nedostatke, što zapravo predstavlja treće važno ograničenje studije. Uslovi fiksacije tkiva, nabavka komercijalnih antitela za detekciju, procedura bojenja, koje variraju od laboratorije

do laboratorije, jer najčešće nije moguće potpuno precizno reprodukovati objavljene studijske uslove. Takođe interpretacija rezultata ne može biti besprekorno objektivna, odnosno podložna je subjektivnoj proceni. Ne postoji univerzalni sistem procene i praktično intenzitet bojenja, kao i proporcija obojenih ćelija utiču na interpretaciju rezultata i takozvani „cut-off“ nivo, tj. nivo preseka⁵³.

6.6. Značaj istraživanja

Tokom proteklih par decenija postignut je značajan napredak u dijagnostici i terapiji karcinoma pluća. Međutim procenat bolesnika kojima se bolest otkrije tek u uznapredovalom stadijumu i dalje je visok, a njihovo lečenje ima skromne rezultate uprkos pomenutom neospornom napretku .

Pored pojave ciljane molekularne terapije hemioterapija je i dalje aktuelna i ima izuzetno važnu ulogu u lečenju bolesnika sa uznapredovalim NSČKP. Jedan od najvećih problema onkologije je rezistencija na citostatike. Kada je reč o P-glikoproteinu, iako spada u red najduže poznatih i najviše ispitivanih ATP vezujućih transportnih proteina plazma membrane, koji se dovode u vezu sa rezistencijom na veći broj citostatika, njegov značaj za NSČKP ostaje nedorečen u kliničkom smislu, jer je najveći broj ispitivanja rađen je na ćelijskim linijama. Rezistencija na citostatike rezultat je međusobnog dejstva više faktora, te je mala verovatnoća da će delovanje na jedan od mehanizama rezistencije dovesti do rešenja ovih problema. Utoliko pre postoji potreba za proučavanjem ovih mehanizama .

Važno je imati u vidu da kod bolesnika sa karcinomom pluća dijagnostički material čine najčešće mali bioptirani uzorci tumorskog tkiva iz kojih je potrebno što preciznije spoznati prirodu tumora radi određivanja najefikasnijih modaliteta terapije. Novi pristup patohistološkoj dijagnostici upravo zato podrazumeva pošteno, odnosno minimalno trošenje bioptiranog tkiva da bi se što više sačuvalo za potrebne molekularnih analiza. Danas se TTF-1 koristi kao najpouzdaniji marker za adenokarcinome, a za skvamoznu histologiju se preporučuje p63 ili p40. Ovi marker imaju važne uloge u signalnim putevima važnim za život kancerskih ćelija /stara lit/.

Imajući u vidu sve navedeno može se zaključiti da ova studija ima značaj u definisanju uloge prediktivne i prognostičke uloge TTF-1, p63 i P-glikoproteina. Ovo je prva klinička studija u kojoj su istovremeno analizirana ova tri markera, odakle proističe i njen značajan doprinos u multimodalnom i personalizovanom pristupu lečenja obolelih od najsmrtonosnijih i najkompleksnijih oblika karcinoma.

6.7. Buduća istraživanja

Podaci naše studije bi mogli da se iskoriste za meta-analizu, ali i kao osnova za dalja istraživanja koja bi uključila značajno veći broj bolesnika. Hemioterapija ne gubi na značaju kada je u pitanju lečenje NSČKP, ali molekularna, ciljana terapija ono što je aktuelno i o čemu se razmišlja kao o efikasnom terapijskom pristupu. Na žalost, rezistencija je zajednički problem ova dva oblika terapije, a dinamičnost mutacija u karcinomskim ćelijama otežava postizanje boljih rezultata u lečenju NSČKP. Bez obzira na to što je P-gp najduže poznat i najviše proučavan u familiji ATP vezujućih transportnih proteina njegova uloga u rezistenciji na citostatike kod NSČKP i dalje je predmet pažnje. Prema najnovijim istraživanjima postoji veza pojačane ekspresije P-gp sa mutacijama EGFR u 19 i 21 egzonu kod NSČKP⁹⁹. Takođe aktuelna istraživanja pokazuju da P-gp ima značajnu ulogu u rezistenciji na ALK- tirozin kinazne inhibitore ceritinib i krizotinib¹¹⁵. Kliničke karakteristike pacijenta uz što preciznije razotkrivanje brojnih molekularnih karakteristika karcinoma neophodne su radi odabira najefikasnijeg oblika terapije^{32,115-117}. Pri tome treba misliti i na neželjena dejstva terapije i pre svega na kvalitet života.

14. ZAKLJUČCI

1. Imunohistohemijski je detektovana ekspresija p63 kod 38,8%, a slaba ekspresija kod 10,6% bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP, koji zadovoljavaju kriterijume za primenu polihemioterapije.
2. Imunohistohemijski je detektovana ekspresija TTF-1 kod 38,8%, a slaba ekspresija kod 3,5% bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP, koji zadovoljavaju kriterijume za primenu polihemioterapije.
3. Imunohistohemijski je detektovana ekspresija P-gp kod 76,6% bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP, koji zadovoljavaju kriterijume za primenu polihemioterapije.
4. Ekspresija p63 je značajno češća kod skvamocelularnog karcinoma u odnosu na adenokarcinom i neklasifikovani nesitnoćelijski karcinom pluća ($p < 0,001$).
5. Ekspresija TTF-1 je značajno češća kod adenokarcinoma, uz potpuno odsustvo ekspresije ili slabe ekspresije TTF-1 kod skvamocelularnog karcinoma ($p < 0,001$).
6. Ekspresija P-gp statistički je značajno češća kod adenokarcinoma u odnosu na skvamocelularni patohistološki tip karcinoma ($p < 0,05$).
7. ECOG PS skor 2 na skali od 0 do 2 ima negativan prediktivni značaj za odgovor na hemioterapiju po protokolu GP i i/ili TP kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP ($p = 0,015$).

8. Nodalni status 2 ima negativan prediktivni značaj za odgovor na hemioterapiju po protokolu GP i i/ili TP kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP ($p=0,050$).
9. Nema statistički značajne razlike u inicijalnom odgovoru na HT između GP protokola i TP protokola kada su primenjeni kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu bez obzira na histološki tip NSČKP.
10. P-gp, TTF-1 i p63 nemaju značaj prediktivnih tumorskih faktora za inicijalni odgovor na hemioterapiju po protokolu GP i/ili TP kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP.
11. Postoji značajna statistička razlika u korist osoba ženskog pola u odnosu na ukupno preživljavanje kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP inicijalno lečenih HT po protokolu GP i/ili TP ($p < 0,05$).
12. ECOG PS skor 2 na skali od 0 do 2 ima negativan prognostički značaj kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu NSČKP inicijalno lečenih HT po protokolu GP i/ili TP ($p < 0,05$).
13. Pacijenti sa neklasifikovanim NSČKP imaju tendenciju lošije prognozu u odnosu na pacijente sa adenokarcinomom i lošiju prognozu u odnosu na pacijente sa skvamocelularnim karcinomom pluća ($p < 0,05$).
14. Pacijenti sa IIIB kliničkim stadijumom bolesti imaju bolju prognozu u odnosu na pacijente sa IV kliničkim stadijumom NSČKP ($p < 0,01$).
15. P-gp nema prognostički značaj kod bolesnika u III i IV stadijumu NSČKP inicijalno lečenih HT po protokolu GP ili TP.

16. Pacijenti u III i IV stadijumu NSČKP čiji tumori imaju slabu ekspresiju p63 imaju lošiju prognozu u odnosu na pacijente bez ekspresije p63 ($p < 0,01$).
17. Pacijenti u III i IV stadijumu NSČKP čiji tumori imaju slabu ekspresiju TTF-1 imaju lošiju prognozu u odnosu na pacijente sa izraženom ekspresijom i one bez ekspresije TTF-1 ($p < 0,05$).
18. P63 i TTF-1 imaju uloge prognostičkih faktora kod bolesnika u III i IV stadijumu NSČKP inicijalno lečenih HT po GP ili TP protokolu.

8. LITERATURA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer J Clin* 2015; 65(2):87-107. Dostupno na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/full>
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127: 2893-2917. Dostupno na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.25516/full>
3. Parkin M, Samet J, Tyczynski JE, Shields P, Boffetta P, Caporaso N. Lung cancer epidemiology and etiology. In: Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermlink HK, Harris CC, editors. *World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon :IARC Press; 2004. p12-15. Dostupno na: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb10/BB10.pdf>
4. Peters S, Adjei AA, Gridelli C, Reck M, Kerr K, Felip E. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2012; 23 (7): vii56–vii64.
5. Alberola V, Cortesi E, Juan O. Weekly paclitaxel in the treatment of metastatic and/or recurrent non-small cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002; 44: S31-S41.
6. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346(2): 92-8.
7. Hajdu SI. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer* 2011;117(5):1097-1102.
8. Perin B, Pozojević G, Žikić T, Antičić M, Sečen N, Jovanović S. Some epidemiological characteristics of lung cancer in Vojvodina. *Pneumon* 1998;36 (1-4): 5-10.

9. Witschi H. A Short History of Lung Cancer. *Toxicol Sci* 2001; 64 (1): 4-6.
10. Schottenfeld D, Searle JG. The etiology and epidemiology of lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 3-73.
11. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut". Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji: Izveštaj br.14. Miljuš D, Živković S, Božić Z, editors. *Registar za rak u centralnoj Srbiji*. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut"; 2014. Dostupno na <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/2012IncidencijaIMortalitetOdRaka1.pdf>
12. Vrdoljak E, Wojtukiewicz MZ, Pienkowski T, Bodoky G, Berzinec P, Finek J, Todorović V, Borojević N, Croitoru A. Cancer epidemiology in Central and South Eastern European countries. *Croat Med J* 2011; 52(4): 478-487.
13. Cummings KM, Brown A, O'Connor R. The Cigarette Controversy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(6): 1070-6.
14. Wynder E, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchogenic carcinoma. (*The Journal of the American Medical Association* 1950; 143(4)) *Bull World Health Organ* 2005; 83(2): 146-153.
15. D'Addario G, Fruh M, Reck M, Baumann P, Klepetko W, Felip E. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2010; 21(5): v116-v119.
16. Office of the Surgeon General (US); Office on Smoking and Health (US). *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (US): Centers for Disease Control and Prevention; 2004. p. 39-41. Dostupno na : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44701/>
17. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. 2011; 32(4): 605-44.

18. Pozzi A. Mouse models of lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. Lung Cancer: Principles and Practice. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins;2005. p. 178-86.
19. National Comprehensive Cancer Network. NCCN guidelines version 1.2012.Lung Cancer Screening. Dostupno na:
http://www.lungcanceralliance.org/assets/docs/news/NCCN%20Screening%20Guidelines%2010_11.pdf
20. U.S. Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2010. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>
21. Larsen JE, Minna JD. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. Clin Chest Med 2011; 32(4):703-740.
22. Zandwijk N. Aetiology and prevention of lung cancer. In: Spiro SG, ed. Lung Cancer. Eur Respir Monogr 2001; 17: 13-33.
23. Fleischhacker M, Beinert T, Possinger K. Molecular genetic characteristic of lung cancer-useful as "real" tumor markers? Lung Cancer 1999; 25:7-24.
24. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of ras oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of literature with meta-analysis. Br J Cancer 2005; 92:131-9.
25. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. J Clin Oncol 1998; 16(3):1207-17.
26. Slebos RJ, Kibbelaar Re, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med 1990; 323(9):561-5.

27. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52(9): 2665S-9S.
28. Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, et al. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(2): 668-75.
29. Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *Oncogene* 1993; 8(9):2407-12.
30. Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, et al. A prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1995; 71(5): 1003- 7.
31. Eisen T. The biology of lung cancer. In: Spiro SG, ed. *Lung Cancer*. *Eur Respir Monogr* 2001; 17:61-70.
32. Blanko R, Iwakawa R, Tang M, Kohno T, Angulo B, Pio R, et al. A Gene-Alteration Profile of Human Lung Cancer Cell Lines: *Hum Mutat* 2009; 30(8):1199-1206.
33. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*. 2008;3(7):e2637: 1-14.
34. Ambudkar SV, Kimchu-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22:7468-7485.
35. Breen L, Murphy L, Keenan J, Clynes M. Development of taxane resistance in a panel of human lung cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2008;22: 1234-41.
36. Volm M, Mattern J. Resistance mechanisms and their regulation in lung cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis* 1996; 7 (3&4): 227-44.

37. Hifumi T, Miyoshi N, Kawaguchi H, Nomura K and Yasuda N. Immunohistochemical Detection of Proteins Associated with Multidrug Resistance to Anti-Cancer Drugs in Canine and Feline Primary Pulmonary Carcinoma. *J.Vet. Med. Sci.* 2010; 72 (5): 665-668.
38. Scagliotti GV. Symptoms, signs and staging of lung cancer. In: Spiro SG, editor. *Eur Respir Mon* 2001; 17: 86-119.
39. Patel AM, Peters SG. Clinical Manifestations of Lung Cancer. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 273- 7.
40. Wozniak AJ, Gadgeel SM. Clinical Presentation of Non- Small Cell Carcinoma of the Lung. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 291-303.
41. Patel AM, Davila DG, Peters SG. Paraneoplastic Syndromes Associated With Lung Cancer. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 278-87.
42. Hollings N, Shaw P. Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur Respir J* 2002; 19 (4): 722-742.
43. Quint LE, Francis IR, Gross BH. Conventional Imaging of non-small cell lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 315-344.
44. Pastis NJ, Silvestri GA. Tissue procurement: Bronchoscopic techniques. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 358-71.
45. De Geus-Oei LF, Van der Heijden HF, Corstens FH, Oyen WJ. Predictive and prognostic value of FDG-PET in nonsmall-cell lung cancer: a systematic review. *Cancer* 2007; 110(8): 1654-64.
46. Vansteenkiste JF, Hoekstra OS, Stroobants SG, Smit EF, Postmus PE. PET in lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 345-57.

47. Boaron M, Kawamukai K, Parri SF, Alifano M, Trisolini R. Surgical procedures in mediastinal lung cancer staging. *Ann Oncol* 2006;17(2): ii22-ii23.
48. Li F, He J, Wei J, Cho WC, Liu X. Diversity of epithelial Stem Cell Types in Adult Lung. *Stem Cells International* 2015; 2015: 1-11.
49. Kerr KM. Pulmonary pre-invasive disease In: Hasleton P, Flieder D.B, eds. *Spencer's pathology of the lung*. 6th ed. New York: Cambridge University Press; 2013.p. 889-944.
50. 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; 137:668-684.
51. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermlink HK, Harris CC (eds). *World Health Organization classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press; 2004. Dostupno na: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb10/BB10.pdf>
52. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y et al. Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens -Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/ American Thoracic Society/ European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137:685-705.
53. Bishop PW. Immunohistochemistry in the diagnosis of pulmonary tumors. In: Hasleton P, Flieder D.B, editors. *Spencer's pathology of the lung*. 6th ed. New York: Cambridge University Press; 2013.p. 1015-1042.
54. Lim E, Goldstraw P. Lung cancer staging. In: Hasleton P, Flieder D.B, editors. *Spencer's pathology of the lung*. 6th ed. New York: Cambridge University Press; 2013.p. 1004-1014.
55. Lukanich JM, Sugarbaker DJ. Non-small cell lung cancer: Surgery for early stage disease. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, eds. *Lung Cancer: Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.429-37.

56. Scagliotti GV, Novello S, Torri V. Adjuvant chemotherapy in completely resected non-small cell lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, eds. Lung Cancer: Principles and Practice. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins;2005. p.438-48.
57. Rocmans PA. Surgical treatment of nonsmall cell lung cancer. In: Spiro SG, ed. Eur Respir Mon 2001; 17: 170-189.
58. Van Houte P. Radiotherapy of nonsmall and small-cell lung cancer. In: Spiro SG,ed. Eur Respir Mon 2001; 17: 190-218.
59. Bogart JA,Turrisi III AT. Radiotherapy for locally advanced lung cancer: An overview . In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, eds. Lung Cancer: Principles and Practice. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins;2005. p. 509-526.
60. Antonelli G, Priolo D, Vitale F, Ferrau F. Locally advanced non-small cell lung cancer: different strategies for different diseases. Ann Oncol 2006;17(2):ii24-ii27.
61. Hoang T, Traynor AM, Schiller JH. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. Lung Cancer: Principles and Practice. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins;2005. p.571-587.
62. Potter V, Woll PJ. Chemotherapy in nonsmall cell lung cancer. In: Spiro SG (edt). Eur Respir Mon 2001; 17:218-33.
63. Adjei AA. Pemetrexed (ALIMTA), A Novel Multitargeted Antineoplastic Agent. Clin Cancer Res 2004; 10 (12 Pt2): 4276s-4280s.
64. D'Addario G, Pintle M, Leighl NB, Feld R, Cerny T, Shepherd FA. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta analysis of the published literature. J Clin Oncol 2005; 23(13): 2926-36.
65. Le Chevalier T, Scagliotti G, Natale R, Danson S, Rosell R, Stahel R et al. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens

- in advanced non-small-cell lung cancer: a meta analysis of survival outcomes. *Lung Cancer* 2005; 47:69-80.
66. Rudd RM, Gower NH, Spiro SG, Eisen TG, Harper PG, Littler JAH, et al. Gemcitabine plus Carboplatin Versus Mitomycin, Ifosfamide, and Cisplatin in Patients With Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Randomized Study of the London Lung Cancer Group. *J Clin Oncol* 2005; 23(1):142-53.
67. Cardenal F, Lopez-Cabrerizo MP, Anton A, Alberola V, Massuti B, Carrato A et al. Randomized Phase III Study of gemcitabine-Cisplatin Versus Etoposide-Cisplatin in the Treatment of Locally Advanced or Metastatic Non –Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(1): 12-8.
68. Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, et al. Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Carboplatin Versus Vinorelbine plus Cisplatin in the Treatment of Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Southwest Oncology Group Trial. *J Clin Oncol* 2001; 19(13): 3210-8.
69. Powell SF, Dudek AZ. Tailoring treatment of nonsmall cell lung cancer by tissue type: role of pemetrexed. *Pharmgenomics Pers Med.* 2009; 2: 21–37.
70. Smith I, O'Brien M, Talbot D. Duration of chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: A randomized trial of 3 versus 6 courses of mitomycin, vinblastine, cisplatin. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1336-43.
71. Socinski MA, Schell MJ, Peterman A, Bakri K, Yates S, Gitten R, et al. Phase III Trial Comparing a Defined Duration of Therapy Versus Continuous Therapy Followed by Second-Line Therapy in Advanced-Stage IIIB/IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1335-43.
72. NCCN Guidelines. Version 4.2016. Non-Small Cell Lung Cancer. April 2016. Dostupno na: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

73. Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST and Kao A. Predicting Chemotherapy Response to Paclitaxel-Based Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with P-Glycoprotein Expression. *Respiration*. 2003;70 (1): 32-35.
74. Bergman A M, Pinedo H M, Talianidis I, Veerman G, Loves W J P, Van der Wilt C L et al. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2003; 88(12): 1963-70.
75. Lario AP, Garcia CB, Elizondo ME and Lobo C. Expression of Proteins Associated with Multidrug Resistance of Chemotherapy in Lung Cancer. *Arch Bronchoneumol*. 2007; 43(9): 479-84.
76. Anagnostov VK, Syrigos KN, Bepler G, Homer RJ and Rimm DL. Thyroid Transcription Factor 1 Is an Independent Prognostic Factor for Patients With Stage I Lung Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27 (2): 271-8.
77. Martins SJ, Takaqaki TY, Silva AG, Gallo CP, Silva FB, Capelozzi VL, et al. Prognostic relevance of TTF-1 and MMP-9 expression in advanced adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2009; 64(1):105-9.
78. Perner S, Wagner PL, Soltermann A, LaFargue C, Tischler V, Weir BA, et al. TTF1 expression in non-small cell lung carcinoma: association with TTF1 gene amplification and improved survival. *J Pathol* 2009;217:65-72.
79. Hsu DS, Acharya CR, Balakumaran BS, Riedel RF, Kim MK, Stevenson M, et al. Characterizing the developmental pathways TTF-1, NKX2-8, and PAX9 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(13): 5312-17.
80. Real FX. P53: It Has It All, But Will It Make It to The Clinic As a Marker in Bladder Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (34): 5341-4.
81. Knout EC, Grag K, Arroyo JD, Correa Y, Sarkar D, Parkin RK et al. An integrative genomic approach identifies p73 and p63 as activators of miR-200 microRNA family transcription. *Nucl Acids Res* 2012; 40 (2): 499-510.

82. Conde E, Angulo B, Redondo P, Toldos O, Garcia-Garcia E, Suarez-Gauthier A, et al. The use of p63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung. *PLoS One*.2010; 5(8): e 12209: 1-6.
83. Michand WA, Nichols AC, Mroz EA, Faquin WC, Clark JR, Begum S, et al. Bcl-2 Blocks Cisplatin-Induced Apoptosis and Predicts Poor Outcome Following Chemoradiation Treatment in Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1645-54.
84. Shepherd FA, Tsao M-S. Unraveling the Mystery of prognostic and Predictive Factors in Epidermal Growth Factor Receptor Therapy. *J Clin Oncol.* 2006; 24(7):1219-23.
85. Soresen JB, Klee M, Palshof T, Hansen HH. Performance status assessment in cancer patients. An inter-observer variability study. *Br J Cancer* 1993;67(4):773-775.
86. Manegold C. Gemcitabine (Gemzar) in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4(3):345-60.
87. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1) . *Eur J Cancer* 2009;45:228-247.
88. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY .Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(10):4827-33.
89. Yin JY, Huang Q, Zhao YC, Zhou HH, Liu ZQ. Meta-analysis on pharmacogenetics of platinum-based chemotherapy in non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *PLoS One.* 2012;7(6):e38150:1-12.
90. Obradović J, Djordjević N, Tošić N, Mrdjanović J, Stanković B, Stanić J et al. Frequencies of EGFR single nucleotide polymorphisms in non-small cell lung cancer patients and healthy individuals in the Republic of Serbia: a preliminary study. *Tumour Biol.* 2016 Feb 5. [Epub ahead of print]

91. Collins BT. Endobronchial ultrasound fine-needle aspiration biopsy of pulmonary non-small cell carcinoma with subclassification by immunohistochemistry panel. *Cancer Cytopathol.* 2013;121(3):146-54.
92. Sigel CS, Moreira AL, Travis WD, Zakowski MF, Thornton RH, Riely GJ et al. Subtyping of non-small cell lung carcinoma: a comparison of small biopsy and cytology specimens. *J Thorac Oncol.* 2011 Nov;6(11):1849-56.
93. Celik B, Khoor A, Bulut T, Nassar A. Rapid On-site Evaluation Has High Diagnostic Yield Differentiating Adenocarcinoma vs Squamous Cell Carcinoma of Non-Small Cell Lung Carcinoma, Not Otherwise Specified Subgroup. *Pathol Oncol Res.* 2015; 21(1): 167–172.
94. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostiku i lečenje karcinoma pluća. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd 2011. Dostupno na: www.zdravlje.gov.rs/showpage.php?=145
95. Ao MH, Zhang H, Sakowski L, Sharma R, Illei PB, Gabrielson E, et al. The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer *Hum Pathol* 2014 45(5):926-934.
96. Zhao W, Wang H, Peng Y, Tian B, Peng L, Zhang DC. Δ Np63, CK5/6, TTF-1 and napsin A, a reliable panel to subtype non-small cell lung cancer in biopsy specimens. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4247-53.
97. Bir F, Aksoy Altunboga A, Satiroglu Tufan NL, Kaya S, Baser S, Yaren A. Potential utility of p63 expression in differential diagnosis of non-small-cell lung carcinoma and its effect on prognosis of the disease. *Med Sci Monit.* 2014; 20: 219–226.
98. Yaman B, Nart D, Ekren PK, Çok G, Veral A. Expression of p63, TTF-1 and Maspin in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Their Effect on the Prognosis and Differential Diagnosis. *Turk Patoloji Derg.* 2015;31(3):163-74.

99. Wei H, Lu W, Li M, Zhang Q, Lu S. Concomitance of P-gp/LRP Expression with EGFR Mutations in Exons 19 and 21 in Non-Small Cell Lung Cancers. *Yonsei Med J.* 2016;57(1):50-7.
100. Roy S, Kenny E, Kennedy S, Larkin A, Ballot J, Perez De Villarreal M, et al. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 mRNA and Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(3A):1325-30.
101. Mc Shane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting Recommendations for Tumor Marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Instit* 2005;97(16):1180-1184.
102. Carter GC, Barrett AM, Kaye JA, Liepa AM, Winfree KB, John WJ. A comprehensive review of nongenetic prognostic and predictive factors influencing the heterogeneity of outcomes in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 2014; 6: 437–449.
103. Roberts JR, Pass HI. Lung cancer staging in non-small cell lung cancer including preoperative and intra-operative techniques In: Pass HI, Carbone DP, Minna JD, Johnson DH, Turrisi III AT, editors. *Lung Cancer: Principles and Practice.* 3rd ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins;2005. p. 372-386.
104. Melguizo,C, Prados J, Luque R, Ortiz R, Caba O, Alvarez PJ et al. Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):16624-35.
105. Ikuta K, Takemura K, Sasaki K, Kihara M, Nishimura M, Ueda N et al. Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(4):707-712.

106. Barrera-Rodríguez R, Fuentes JM. Multidrug resistance characterization in multicellular tumour spheroids from two human lung cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 2015; 15 (47): 1-11.
107. Vlachogeorgos GS, Manali ED, Blana E, Legaki S, Karagiannidis N, Polychronopoulos VS et al. Placental isoform glutathione S-transferase and P-glycoprotein expression in advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer Cytopath* 2008 114(6): 519-26.
108. Ma Y, Fan M, Dai L, Kang X, Liu Y, Sun Y, et al. Expression of p63 and CK5/6 in early-stage lung squamous cell carcinoma is not only an early diagnostic indicator but also correlates with a good prognosis. *Thorac Cancer.* 2015;6(3):288-295.
109. Barlési F, Pinot D, LeGoffic A, Doddoli C, Chetaille B, Torre JP et al. Positive thyroid transcription factor 1 staining strongly correlates with survival of patients with adenocarcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2005; 93: 450–452.
110. Berghmans T, Paesmans M, Mascaux C, Martin B, Meert AP, Haller A et al. Thyroid transcription factor 1—a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis. *Ann of Oncology.* 2006; 17 (11): 1673-1676.
111. Elsamany SA, Al-Fayea TM, Alzahrani AS, Abozeed WN, Darwish W, Farooq MU et al. Thyroid transcription factor-1 expression in advanced non-small cell lung cancer: impact on survival outcome. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(7):2987-91.
112. Grønberg BH, Lund-Iversen M, Strøm EH, Brustugun OT, Scott H. Associations between TS, TTF-1, FR- α , FPGS, and overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving pemetrexed plus carboplatin or gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy. *J Thorac Oncol.* 2013 Oct;8(10):1255-64.

113. Zhan P, Qian Q, Wan B, Yan TD, Yu LK. Prognostic value of TTF-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Translational Cancer Research* 2013; 2(1). Dostupno na: <http://tcr.amegroups.com/article/view/961/html>
114. Behrens C, Solis LM, Lin H, Yuan P, Tang X, Kadara H et al. EZH2 Protein Expression Associates With the Early Pathogenesis, Tumor Progression and Prognosis of Non-small Cell Lung Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(23): 6556–65.
115. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L et al. P-glyco-protein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* 2016; 3: 54–66.
116. Petrović M, Mitrović LjS, Stanković V, Jurišić V, Atkinson H. Neuroendokrine Markers-Usfull Predictors of therapeutic Responses in Non-resectable Non-small Cell Lung Cancer. *Labmedicine.* 2012;43(2):47-49.
117. Normanno N, Cree AI. Genomics driven-oncology: challenges and perspectives. *BMC Cancer.* 2015;15(141):1-3.

16. SKRAĆENICE

ABC-ATP-binding cassette

AIS- adenocarcinom in situ

AJCC-American Joint Committee on Cancer

ALK-kinaza anaplastičnog limfoma

ATP-adenozin trifosfat

ATS- American Thoracic Society

BAC- bronhioloalveolarni karcinom

CR -Compete Response

CT-kompjuterizovana tomografija

CTR- Conformal Radiation Therapy

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

EBUS -endobronchial ultrasound

ECOG -Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR-epidermal growth factor receptor

EML4 -echinoderm microtubule-associated protein like-4

ERS- European Respiratory Society

FDG -fluorodezoksiglukoza

FGF-fibroblast growth factor

GELCC-Genetic Epidemiology of Lung Cancer Consortium

GP-gemcitabin/platina

HGF-hepatocyte growth factor

HT-hemioterapija

IASLC- International Association for the Study of Lung Cancer

IHH-imunohistohemijski

LDCT-low-dose computed tomography

LPA- *Lepidic predominant adenocarcinoma*

MDR-*multi drug resistance*

MIA- minimalno invazivni adenokarcinom

MR-magnetna rezonanca

MSCT-*multislice computed tomography*

NCCN-*National Comprehensive Cancer Network*

NLST-*National Lung Screening Trial*

NOS -*Not otherwise specified*

NSCLC-*non-small cell lung cancer*

NSČKP-nesitnoćelijski karcinom pluća

OS- *Overall survival*

PD -*Progressive Disease*

PDGF *platelet-derived growth factor*-

PET-pozitronska emisijska tomografija

PFS- *Progression free survival*

P-gp -P-glikoprotein

PH-patohistološki

PR- *Partial Response*

PS-performans status

RECIST- *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

RT-radijaciona terapija

SD- *Stabile Disease*

SD-standardna devijacija

SIADH- *Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion*

STK Serin-treonin kinaza

SUV- *Standardized Uptake Value*

SWOG-Southwest Oncology Group

TBB-transbronhijalna biopsija

TBNA-*transbronchial needle aspiration*

TKI tirozin kinazni inhibitori

TNM-tumor, nodus, metastaza

TTF-tiroidni transkripcioni faktor

3DTPS -*Three-Dimensional Radiation Treatment Planning System*

TP-paklitaksel/platina

TSG- tumor supresor geni

UICC- *Union Internationale Contre le Cancer*

UTR *untranslated region*

VATS -videoasistirana torakoskopija

VEGF-*vascular endothelial growth factor*

WHO- *World Health Organization*