



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марина З. Марковић

**ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF, VCL2 И
СУРВИВИНА КОД УЗНАПРЕДОВАЛОГ
НЕСИТНОЋЕЛИЈСКОГ КАРЦИНОМА ПЛУЋА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Marina Z. Marković

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ EKSPRESIJE VEGF, BCL2 I
SURVIVINA KOD UZNAPREDOVALOG
NESITNOĆELIJSKOG KARCINOMA PLUĆA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2023.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marina Z. Marković

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF VEGF, BCL2 AND
SURVIVIN EXPRESSION IN ADVANCED NON-SMALL CELL
LUNG CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

Аутор
Име и презиме: Марина З. Марковић
Датум и место рођења: 01.08.1982.
Садашње запослење: Асистент у настави на предмету Интерна медицина, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Прогностички значај експресије <i>VEGF</i> , <i>bcl2</i> и сурвивина код узнатредовалог немикроцелуларног карцинома плућа
Број страница: 101
Број слика: 26 табела, 6 слика, 52 фигуре
Број библиографских података: 279
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област: Медицина
Ментор: Проф. др Марина Петровић , редовни професор за ужу научну област Интерна медицина, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 01.12.2016.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације:
IV-03-456/34 од 03.05.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. проф. др Милан Кнежевић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, председник 2. проф. др Слободан Милисављевић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан 3. проф. др Ивана Станковић , редовни професор Медицинског факултета у Нишу за ужу научну област Интерна медицина-пнеумофтизиологија, члан 4. проф. др Гордана Радосављевић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан 5. доц. др Слађана Павловић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1., председник 2., члан 3., члан
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Marina Z. Marković
Datum i mesto rođenja: 01.08.1982.
Sadašnje zaposlenje: Asistent u nastavi na predmetu Interna medicina, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Prognostički značaj ekspresije VEGF, bcl2 i survivina kod uznapredovalog nemikrocelularnog karcinoma pluća
Broj stranica: 101
Broj slika: 26 tabela, 6 slika, 52 figure
Broj bibliografskih podataka: 279
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast: Medicina
Mentor: Prof. dr Marina Petrović , redovni profesor za užu naučnu oblast Interna medicina, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Oцена i odbrana
Datum prijave teme: 01.12.2016.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije:
IV-03-456/34 од 03.05.2017. године
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: prof. dr Milan Knežević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Patološka anatomija, predsednik prof. dr Slobodan Milisavljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Hirurgija, član prof. dr Ivana Stanković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu za užu naučnu oblast Interna medicina-pneumoftizijologija, član prof. dr Gordana Radosavljević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član doc. dr Sladana Pavlović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: 1., predsednik 2., član 3., član
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Marina Z. Markovic
Date and place of birth: 1th of August, 1982
Current employment: Assistant at the department of Internal medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Prognostic significance of VEGF, bcl2 and survivin expression in advanced non-small cell lung cancer
No. of pages: 101
No. of images: 26 tables, 6 pictures, 52 figures
No. of bibliographic data: 279
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Assoc. Prof. Marina Petrovic, Associate Professor at the department of Internal medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 01.12.2016.
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-456/34 from 03.05.2017.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Prof. Milan Knezevic , Full Professor at the department of Pathological anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, President 2.. Prof. Slobodan Milisavljevic , Full Professor at the department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member 3. Prof. Ivana Stankovic , Full Professor at the department of Internal medicine-pneumophthisiology, Faculty of Medical Sciences, University of Niš, member 4. Assoc. Prof. Gordana Radosavljevic , Associate Professor at the department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member 5. Asst. Prof. Sladana Pavlovic , Assistant Professor at the department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1., President 2., member 3., member
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Карцином плућа је један од водећих узрока смрти у свету. Претпоставка модерног доба истраживања је да се исход пацијената са овом дијагнозом, може побољшати комбиновањем клиничких параметара са различитим биолошким маркерима.

Циљ овог истраживања је испитивање корелације експресије VEGF, Bcl2 и сурвивина у немикроцелуларном карциному плућа са патохистолошким параметрима тумора и клиничким параметрима испитиваних болесника.

У истраживање су укључени пацијенти који су имали неситноћелијски карцином плућа, а који су на основу клиничког стадијума класификовани у локално унапредовали и метастатски клинички стадијум. Поред дијагнозе, микроскопски преглед је укључивао одређивање стандардних и нестандартних особина тумора. Хистопатолошки извештај садржи податке о хистолошком типу и степену диференцијације тумора, нуклеарном градусу и присуству стромалне моноклеарне реакције. Имунохистохемијски, одређивана је ткивна експресија релевантних маркера, применом антитела (VEGF, Bcl2 и сурвивин).

У испитиваној популацији је показано је да хистолошке подгрупе неситноћелијског карцинома плућа показују разлику у VEGF и Bcl-2 експресији. Када је посматран целокупан узорак испитаника, показан је утицај VEGF експресије на преживљавање код пацијената у IV стадијуму болести. Такође, показана је повезаност VEGF експресије и примене антиангиогенезног агенса код аденокарцинома. Експресија VEGF била је у негативној корелацији са Bcl-2 код пацијената са неситноћелијским карциномом плућа. Са друге стране, сурвивин није показао статистичку значајност у односу на испитиване клиничкопатолошке карактеристике пацијената са неситноћелијским карциномом плућа.

Испитивани маркери имају значајну улогу у терапијском одговору и клиничком исходу код пацијената са неситноћелијским карциномом плућа

Кључне речи: немикроцелуларни карцином плућа, VEGF, Bcl2, сурвивин

ABSTRACT

Lung cancer is the most common cause of mortality from malignant tumors worldwide. The assumption of the modern era of research is that the outcome of patients with this diagnosis can be improved by combining clinical parameters with various biological markers.

The aim of this research was to evaluate the relationship between VEGF, Bcl2 and survivin expression, clinicopathological features and survival in patients with advanced non-small cell carcinoma.

The study included patients who had non-small cell lung carcinoma, and who were classified as locally advanced and metastatic clinical stage based on the clinical stage. In addition to diagnostics, the microscopic examination included the determination of standard and non-standard features of the tumor. The histopathological report contains data on the histological type and degree of differentiation of the tumor, the nuclear grade and the presence of a stromal mononuclear reaction. Immunohistochemically, tissue expression of relevant markers was determined using antibodies (VEGF, Bcl2 and survivin).

In the studied population, it was shown that histological groups of non-small cell carcinoma show a difference in VEGF and Bcl-2 expression. When the entire sample of subjects was observed, it showed the influence of VEGF expression on survival in patients in stage IV of the disease. Also, the association between VEGF expression and the use of an antiangiogenic agent in adenocarcinoma was shown. VEGF expression was negatively correlated with Bcl-2 in patients with non-small cell lung cancer. On the other hand, survivin did not show statistical significance in relation to the examination of clinicopathological characteristics of patients with lung cancer.

The investigated markers have a significant role in the therapeutic response and clinical outcome in patients with non-small cell lung cancer

Keywords: *non-small cell lung carcinoma (NSCLC); bcl-2; VEGF, survivin*

Садржај

1. УВОД.....	1
1.0. Карцином бронха.....	1
1.1. Епидемиологија карцинома бронха.....	1
1.2. Фактори ризика.....	2
1.3. Дијагностичке процедуре код тумора плућа	2
1.3.1. Неинвазивне дијагностичке процедуре.....	3
1.3.2. Инвазивне дијагностичке процедуре.....	4
1.4. Хистолошка класификација карцинома плућа	6
1.4.1. Имунохистохемија	11
1.5. Клиничка слика карцинома плућа	12
1.5.1. Паранеопластични синдром	13
1.5.2. Процена општег стања пацијента	14
1.7. Скрининг	23
1.8. Терапија карцинома плућа	24
1.8.1. Процена терапијског одговора – <i>RECIST</i> критеријуми	27
1.9. Туморски биомаркери.....	30
1.9.1. Фактор раста васкуларног ендотела (eng: <i>Vascular endothelial growth factor-VEGF</i>)	30
1.9.2. Ген за Б-ћелијски лимфом/хроничну лимфоцитну леукемију 2 (енг: <i>Human B-cell lymphoma/CLL2, Bcl-2</i>)	32
1.9.3. Сурвивин	35
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ.....	36
2.1. Хипотезе студије:	36
2.2. Циљеви студије:	36
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	37
3.1. Врста студије	37
3.2. Популација која се истражује	37
3.3. Узорковање	37
3.4. Варијабле које се мере у студији	38
3.5. Методе	38
3.5.1. Н&Е метод	38
3.5.2. Имунохистохемијски метод	38
3.5.3. Анализа имунохистохемијских препарата.....	39
3.6. Процена терапијског одговора.....	39
3.7. Снага студије и величина узорка	40
3.8. Статистичка анализа	40
4. РЕЗУЛТАТИ.....	41

4.1. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената	41
4.2. Клиничко-патолошке карактеристике у односу на хистолошки тип карцинома плућа	44
4.3. Анализа експресије Bcl-2	47
4.3.1. Повезаност експресије Bcl-2 са клиничко-патолошким карактеристикама	49
4.3.2. Повезаност експресије Bcl-2 са клиничко-патолошким карактеристикама у односу на хистолошки тип тумора	55
4.4. Анализа експресије Ki-67	59
4.4.1. Повезаност Ki-67 са клиничко-патолошким карактеристикама.....	59
4.4.2. Повезаност Ki-67 са клиничко-патолошким карактеристикама у односу на хистолошки тип тумора	64
4.5. Анализа експресије VEGF	68
4.5.1. Повезаност VEGF са клиничко-патолошким карактеристикама.....	70
4.5.2. Повезаност VEGF експресије са клиничко-патолошким карактеристикама у односу на хистолошки тип ћелија	76
4.6. Анализа преживљавања	80
4.6.1. Анализа преживљавања у односу на експресију VEGF	80
4.6.2. Анализа преживљавања у односу на експресију Bcl-2.....	83
4.6.3. Анализа преживљавања у односу на вредност Ki-67	84
4.6.4. Анализа утицаја клиничко-патолошких карактеристика пацијента на преживљавања до прогресије болести и укупно преживљавање	86
4.7. Корелација између испитиваних параметара	88
4.8. Анализа експресије сурвивина.....	91
5. ДИСКУСИЈА	92
5.1. VEGF	92
5.2. Сурвивин	97
5.3. Bcl-2	97
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	101
7. ЛИТЕРАТУРА	102

1. УВОД

1.0.Карцином бронха

1.1.Епидемиологија карцинома бронха

Карцином плућа је један од водећих узрока смрти услед малигних болести у свету. По подацима из 2020. године, годишње се у свету региструје око 2,2 милиона новооболелих од карцинома плућа (11,4% од укупног броја новооболелих од малигних болести) и као такав се налази на другом месту по броју оболелих, док је на првом месту по броју умрлих са 1.796.144 умрлих, што представља 18% од укупног броја умрлих од малигних болести. Најчешћи је карцином код мушке популације широм света, са највећом узрасно стандардизованом стопом инциденце у Полинезији (53/100.000), Микронезији (51.3/100.000), у централној и источној Европи (49/100.000) и источној Азији (47.2/100.000). Ниске стопе инциденце су забележене у Средњој и Западној Африци (3.4 и 2.8/100.000). Код жена се годишње региструје око 720.000 новооболелих (8.4% укупног броја), чинећи карцином плућа трећим најчешћим карциномом код жена, иза карцинома дојке (24.4%) и карцинома дебелог црева (9.5%). Највеће стопе инциденце се јављају у Северној Америци (30.7/ 100.000), северној Европи (26.8/100.000) и најнижим стопама у Африци (1.8/100.000) (1).

Ризик од развоја малигних болести расте са годинама старости, али се процењује да је око 80% особа са новодијагностикованом малигном болешћу млађе од 55 година. Карцином плућа се најчешће јавља код особа старије животне доби, процењује се да је 53% оболелих од карцинома плућа старије од 70 година, а да чак 83% има преко 65 година живота (2). Узимајући у обзир све малигнитете, карцином плућа је водећи узрок смрти код мушкараца старијих од 40 година и код жена старијих од 60 година. Према подацима из 2017. године од карцинома плућа је умрло више људи у односу на број умрлих од карцинома дојке, простате и дебелог црева заједно. Код мушкараца је карцином плућа чешћи узрок смртог исхода за 17% у односу на жене (3).

Према подацима америчког Националног Института за Рак за период 2014-2016. године, око 6.3% укупног становништва ће током свог живота оболети од карцинома плућа (4).

Када је Србија у питању, према подацима Института за јавно здравља Србије “Др Милан Јовановић-Батут” из 2020. године, годишње се региструје око 6800 новооболелих од карцинома плућа, а умре око 5000 оболелих. Код мушкараца је карцином плућа најчешћи малигни тумор, заступљен са 21.4% од укупно оболелих од малигних болести, са стандардизованом стопом инциденце од 67 на 100.000, док 29.3% свих умрлих од малигних болести чине умрли од карцинома плућа. Код жена, карцином плућа се налази на другом месту међу малигним болестима у Србији, одмах иза карцинома дојке и чини 11.3% новооболелих од свих малигних болести. Стопа инциденце износи 28.2 на 100.000 жена, а стопа морталитета 19.2, односно 17.5% свих умрлих од малигних болести (5).

Укупно петогодишње преживљавање код пацијената са неситноћелијским карциномом плућа је 26.3%. Иако и даље говоримо о прогностички лошем малигнитету, једна јапанска студија, анализирајући период 1970-2000. године је показала да стопа петогодишњег преживљавања ипак расла кроз време са 6% на 30.9% код жена и са 7.2% на 19.6% код мушкараца (6). Више од половине новооболелих (57%) се дијагностикује у одмаклом стадијуму болести.

Петогодишње преживљавање директно зависи од стадијума болести при дијагнози али и од биолошких карактеристика тумора и креће се од од 35.4% код локално узнапредовалог до 6.9% код метастатке болести (7).

1.2. Фактори ризика

Као главни фактор ризика за настанак карцинома плућа наводи се пушење цигарета, код приближно 90% мушкараца и 80% жена, иако се карцином плућа јавља код само 11% свих пушача. Поред микроскопских промена које се могу видети у хистолошком препарату, бројна истраживања су показала да респираторни епител читавог бронхијалног стабла код пушача и бивших пушача показује генетске промене у хистолошки нормалном плућном ткиву какве се могу видети и код оболелих од сквамозелуларног карцинома плућа што може послужити као предиктивни биомаркер за карцином плућа (8). Дувански дим садржи велики број карциногена, укључујући нитрозамине, бензопирене, полицикличне ароматичне угљоводонике. Пушачи имају око 20 пута већи ризик да оболе од карцинома плућа у односу на непушаче. Ризик од настанка карцинома плућа је пропорционалан дужини пушачког стажа и броју попушених цигарета. Такође, ризик за обољевање од карцинома плућа код пасивних пушача је повећан за око 25% у односу на непушаче (9).

Као могући фактори ризика за настанак карцинома плућа наводе се и придружене болести плућа (хронична опструктивна болест плућа, пнеумокониозе, силикоза, азбестоза), позитивна породична анамнеза постојања карцинома плућа, изложеност другим карциногенима као што су азбест, кварц, испарењима дизела, радон, арсен, кадмијум, берилијум.

Радон, као природни радиоактивни гас, сматра се другим најважнијим узроком карцинома плућа. Процењено је да излагање радону у концентрацији од 100Bq/m^3 повећава ризик од развоја карцинома плућа за 2–9%. Канцерогени учинак радона мултиплицира се код пушача (10).

Азбестна прашина је једна од најопаснијих канцерогених материја која удружена са пушењем, повећава ризик од настанка карцинома плућа за 19-26 пута у односу на непушаче изложене овој материји. Влакна азбеста улазе у ћелију и индукују настанак слободних радикала, на тај начин доводе до прекида ДНК и појаве 8-хидроксигуанина, узрокујући хромозомске аберације. Сматра се да је 3-4 % карцинома бронха узроковано управо изложености азбесту (11). За настанак азбестозе је потребно да прође око 10-20 година од излагања азбесту како би се испојили први симптоми болести, док је за мезотелиом плеуре минимална дужина периода до испољавања првих симптома око 10 година.

Бројне мета анализе су показале да повећан ризик од настанка карцинома плућа имају особе са *HIV*-ом или *AIDS*-ом, особе које су имале трансплантацију органа, оболели од аутоимуних болести као што су системски еритемски лупус, реуматоидни артритис.

1.3. Дијагностичке процедуре код тумора плућа

Када постоји сумња на карцином плућа неопходно је спровести одговарајуће дијагностичке процедуре које имају за циљ потврду дијагнозе, одређивање хистолошког типа тумора, прецизно одређивање стадијума болести и процену општег стања пацијента а све у циљу планирања адекватног модалитета лечења за сваког пацијента појединачно. Дијагностички поступак обухвата анамнезу и физикални

преглед, лабораторијске анализе, радиолошку дијагностику, неинвазивну и инвазивну интернистичку дијагностику, хируршку дијагностику.

1.3.1 Неинвазивне дијагностичке процедуре

Цитолошки преглед спутума је дијагностички метод избора код пацијената који нису подобни за бронхоскопију. Код централно локализованих тумора може бити позитиван налаз на малигнитет у више од 90% случајева. На оваком типу узорка се могу адекватно одредити врста тумора и урадити допунске анализе, али овакав узорак није довољан за комплетно молекуларно профилисање тумора. Цитолошки преглед спутума је коришћен и као скрининг метода код ризичних група за рано откривање карцинома бронха.

Радиографија плућа представља иницијални дијагностички поступак радиолошког прегледа грудног коша. Већи број карцинома плућа припада централном типу са локализацијом у главним, лобарним и сегментним бронхима и као такви се на стандардним снимцима не приказују директно већ знацима непотпуне или потпуне опструкције бронха. Карцином плућа периферног типа се на стандардним снимцима приказује као солитарна кружна сенка на периферији, као кружна сенка у пројекцији хилуса (карцином бронха периферног типа са централном локализацијом), *Pancoast* тумор и као бронхоалвеоларни карцином.

Компјутеризована томографија грудног коша (CT) је и даље основна радиолошка метода за постављање дијагнозе карцинома плућа која омогућава визуализацију тумора, његову локализацију и величину, процену степена туморске инвазије, диференцијацију тумора од постстенотичних ателектаза. Омогућава процену евентуалне инвазије зида грудног коша или медијастинума и дозвољава 3Д реконструкцију за боље схватање туморске морфологије. Препорука је да се при прегледу апликује интравенски контраст, а све у циљу јасније демаркације тумора и/или увећаних лимфних чворова од васкуларних структура медијастинума. Такође, препорука је да се пресеци праве на <10мм од грудног коша до надбубрежних жлезда и на 5мм у нивоу хиларне и аортопулмоналне регије у циљу боље визуализације регионалних лимфних нодуса (12). Прихваћени критеријум за процену захваћености медијастиналних лимфних чворова туморским процесом јесте дијаметар краће осе лимфног чвора који треба да је преко 10 мм на попречним пресецима. Увећани лимфни чворови не морају бити малигно измењени али и детекција нормалне димензије лимфних чворова не искључују њихову метастаску захваћеност. Установљено је да је чак преко 64% лимфних нодуса нормалних димензија метастаски измењено (13).

Магнетна резонанца грудног коша (MRI) – као дијагностичка процедура са сензитивношћу од 52-65% и специфичношћу од 48-79% није супериорнија у односу на CT преглед, па се као таква не препоручује као стандардна метода за стажирање карцинома плућа. Изузетак могу бити пацијенти алергични на контрастно средство, пацијенти са оштећеном бубрежном функцијом као и они без периферног венског приступа. MRI може бити супериорнија у односу на CT у случају утврђивања директне туморске инвазије медијастинума, зида грудног коша, вене каве и великих крвних судова, дијафрагме и кичмених пршљенова (14).

Позитрон емисиона томографија – компјутеризована томографија (PET-CT) је неинвазивна метода која се заснива на биолошкој активности неопластичних ћелија. Ћелије карцинома бронха показују повећано прихватање глукозе и вишу стопу гликолизе у односу на нормалне ћелије због чега се користи *18F fluoro-2-dezoksi-D glukoza (FDG)* као обележивач. У поређењу са стандардним CT налазом, PET-CT је супериоран у процени туморских промена у медијастинуму и евентуално присутних

метастаза. Тачност *PET-CT* скена за медијастиналне метастазе је 74%, са сензитивношћу 74%–84% и специфичношћу 73%–89%, има негативну предиктивну вредност 93% и позитивну предиктивну вредност 79% (15). Уколико је налаз *PET-CT* скена позитиван или су лимфне жлезде медијастиனுма увећане, потребна је хистолошка потврда болести. Лажно негативни резултати се јављају уколико су туморске промене мање 5–7 мм, а лажно позитивни у инфекцији и запаљенским болестима. Ова дијагностичка метода је супериорна за процену постојања екстраторакалних метастаза нарочито код оних пацијената код којих се планира хируршко лечење са куративном интенцијом. Због велике метаболичке активности глукозе у нормалном можданом ткиву *PET-CT* није значајан за детекцију метастаза у централном нервном систему (16).

1.3.2. Инвазивне дијагностичке процедуре

У инвазивне дијагностичке процедуре спадају:

1. Конвенционална видеобронхоскопија беле светлости са увећањем (енг: *white light videobronchoscopy* – WLB)
2. Аутофлуоресцентна бронхоскопија (енг: *Autofluorescence bronchoscopy* – AFB)
3. Видеобронхоскопија уског снопа светлости (енг: *Narrow Band Imaging* – NBI)
4. Линеарни и радијални ендобронхијални ултразвук (енг: *Endobronchial ultrasound* – EBUS)

и припадајуће технике узимања узорака:

- а. Бронхо-биопсија
- б. Трансbronхијална биопсија
- ц. Трансbronхијална иглена пункција
- д. Ендобронхијална четка – биопсија
- е. Криобиопсија и друге

Бронхоскопија и трансbronхијална биопсија је основна дијагностичка метода која омогућава цитолошку и хистолошку потврду карцинома плућа као и ендоскопску експлорацију трахеобронхијалног стабла. Бронхоскопија има високу сензитивност од 80% за дијагностиковање централних тумора и нарочито корисна за евалуацију удаљености тумора од карине, одређујући ресектабилност код локално унапредовалог карцинома (Т3) поузданије од *СТ* прегледа, а с друге стране искључује могућност куративне ресекције у случају постојања инфилтрације карине (17). Фиброоптичка бронхоскопија је поуздана и добро толерисана метода. Захтева минималну припрему пацијента и има могућност спровођења у амбулантним условима захваљујући примени локалне анагоседације. Међутим, у одређеним случајевима ригидна бронхоскопија има предност у односу на фибер (масивне хемоптизије, опструкција трахеје, ласер бронхоскопија, ендоскопска дилатација стеноза), те се ове две методе допуњују у свакодневној клиничкој пракси.

Трансbronхијална иглена аспирација се користи за процену медијастиналне лимфаденопатије, пре свега субкариналних лимфних нодуса. Добијање адекватних узорака овом методом је у око 90% случајева уз сензитивност од 80% за доказивање примарног тумора, док резултати добијени мета анализом показују сензитивност од 76% и специфичност од 96% у детекцији метастатски измењених лимфних нодуса (17, 18).

Аутофлуоресцентна видеобронхоскопија оптичка техника видеобронхоскопије која се се користи за детаљан преглед интраепителијалних промена бронхијалне слузнице. Основне индикације за њену примену укључују детекцију пре-малигних

лезија епитела слузнице бронха, праћење болесника након куративне ресекције сквамозног карцинома бронха, детекција синхроних тумора и ендоскопска процена екстензивности карцинома бронха. Један од недостатака ове дијагностичке процедуре је ниска специфичност у детекцији пре-малигних лезија, обзиром и да се инфламација манифестује измењеном флуоресценцијом слузнице. Sun J. и сарадници су урадили мета-анализу поредећи аутофлуоресцентну видеобронхоскопију у комбинацији са конвенционалном видеобронхоскопијом са само конвенционалном видеобронхоскопијом у детекцији пре-малигних лезија и карцинома. Сензитивност аутофлуоресцентна видеобронхоскопије у детекцији пре-малигних лезија 84,63% и детекцији карцинома 94,71%, док је сензитивност конвенционалне видеобронхоскопије уског снопа светлости у детекцији пре-малигних лезија 42,54% односно 88,53% у детекцији карцинома плућа (19).

Видеобронхоскопија уског снопа светлости је релативно нова ендоскопска процедура за евалуацију субмукозне капиларне мреже бронхијалне слузнице. Зарић и сарадници су у својој студији показали да су сензитивност, специфичности, позитивна предиктивна вредност и негативна предиктивна вредност конвенционалне видеобронхоскопије беле светлости са увећањем у детекцији пре-малигних лезија 26.5%, 63.9%, 34.4%, и 54.9%; за AFI 52%, 79.6%, 64.6%, 69.9%; за NBI 66%, 84.6%, 75.4%, 77.7%; комбинација AFI и NBI 86.1%, 86.6%, 84.6%, 88%. Комбинација AFI и NBI доприноси повећању специфичности и сензитивности детекције пре-малигних лезија и карцинома бронха (20).

Трансторакална иглена аспирација (енг: *Transthoracic needle aspiration* - TTNA) је алтернатива трансторакалној игленој аспирацији која се користи за процену код болесника са суспектно увећаним тзв. *bulky* медијастиналним лимфним чворовима, а изузетно ретко у циљу стажирања болести. Готово сви медијастинални лимфни чворови се могу узорковати овом техником и то позиције 1, 2, 4, 5 и 6 коришћењем антериорног парастерналног приступа, а позиције 4, 7, 8 и 9 коришћењем постериорног параспиналног приступа (21). Изводи се под контролом рендген апарата са Ц луком, MSCT или ултразвука. Такође, користи се за процену суспектних интерлобарних плућних метастаза, плеуралних метастаза, малигног плеуралног излива аспирационом цитологијом.

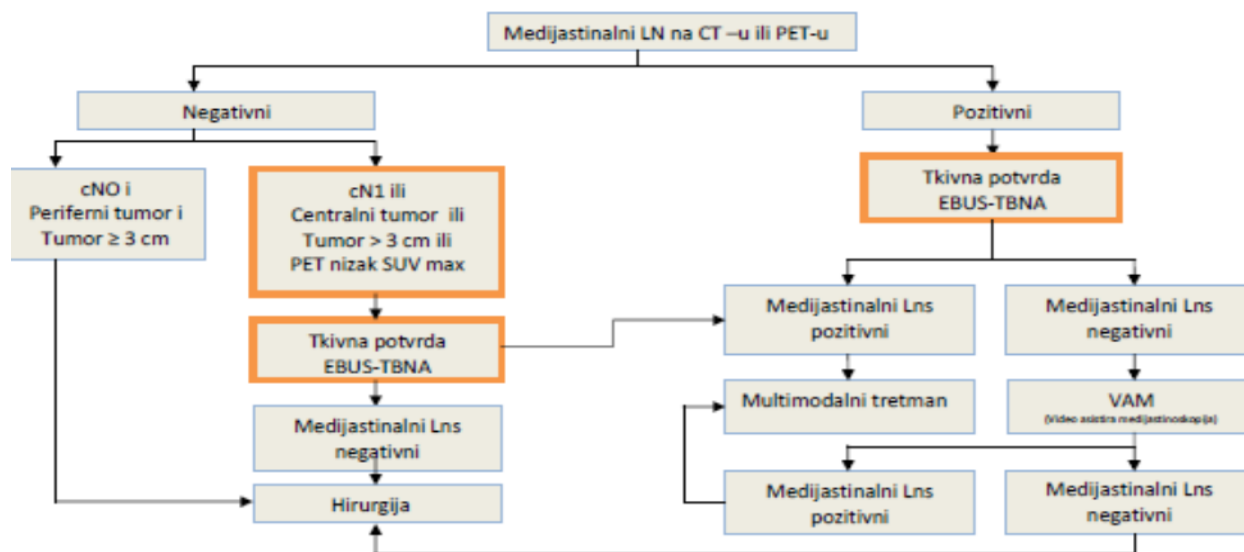
Езофагеланим ултразвуком навођена иглена аспирација (енг: *Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration* - EUS-FNA) је процедура која се у последњих 15 година користи за медијастинално стадирање неситноћелијског карцинома плућа (енг: *Non-small cell lung cancer* – NSCLC) омогућава минимално инвазивни приступ левим паратрахеалним лимфним чворовима, аортопулмоналном прозору, субкариналним и парезофагелним лимфним чворовима, ретроперитонеалним и целијачним лимфним чворовима. Резултати клиничких студија показују да је EUS у детекцији метастатски измењених лимфних нодуса супериорнији у односу на CT преглед грудног коша (84% вс. 49%), чак и у односу на PET-CT (94% вс. 73%), али је специфичност била већа код PET-CTа (83% вс. 71%) (22, 23).

EBUS-TBNA је минимално инвазивна дијагностичка процедура за процену захваћености медијастиналних лимфних чворова код карцинома бронха. Сви медијастинални лимфни чворови су доступни EBUS-TBNA осим субаорталних и парезофагелних позиција 5, 6, 8. Хиларни лимфни чворови позиције 10 и 11 су такође приступачни, осим дела лимфних чворова позиције 12. EBUS се може користити и у дијагностици интрапулмонарних лимфних чворова, плућних лезија које се налазе уз дисајне путеве, лезија у врху плућа у близини трахеје. Ова процедура омогућава и прецизно рестадирање медијастинума после неoadјувантне хемиотерапије.

Медијастиноскопија представља „златни стандард“ међу инвазивним методама за стадирање карцинома плућа и процене *N2* односно *N3* захваћености лимфних чворова (24). Медијастиноскопијом се може приступити претрахеалним лимфним чворовима (позиција 1 и 3), обострано високим и ниским паратрахеалним лимфним чворовима (позиције 2 и 4 лево и десно) и предњим субкариналним лимфним чворовима (позиција 7). Лимфни чворови медијастиноума који се не могу узорковати овом методом су позиције 5-аортопулмонални чворови, 6-парааортални чворови, 8-параезофагеални чворови и 9-лимфни чворови плућног лигамента (25).

Видео-асистирана торакоскопска хирургија (енг: *Video-assisted thoracoscopic surgery -VATS*) се, као минимално инвазивна, примењује код периферних нодуларних лезија са циљем да се учини биопсија или њихова потпуна екстирпација. Истовремено је могућа и биопсија медијастиналних лимфних чворова, најчешће локализација 5 и 6. Током интервенције је могућа и инспекција плеуралног простора и идентификација плеуралног излива и плеуралних метастаза.

Адекватно преоперативно стадирање лимфних нодуса код потенцијално ресектабилног карцинома плућа је оно што је кључ у дијагностичком и терапијском алгоритму (слика 1). Интеграција ендоскопских техника за иницијално стадирање медијастиналног нодалног статуса као и за процену терапијског одговора након индукционе терапије захтева додатна истраживања (26).



Слика 1. Дијагностички алгоритам за постављање дијагнозе и одређивање стадијума карцинома плућа

1.4. Хистолошка класификација карцинома плућа

Светска Здравствена Организација (eng: *World Health Organization* – WHO) је прву класификацију тумора плућа издала 1967. године која је подразумевала два подтипа аденокарцинома: бронхогени и бронхоалвеоларни аденокарцином (BAC) а затим је бронхогени аденокарцином подељен на два подтипа: ацинарни и папиларни. Ова класификација је ревидирана 1981. године када су представљена четири подтипа аденокарцинома: ацинарни, папиларни, BAC и солидни карцином са муцинозном формацијом. Уследила је нова хистолошка класификација тумора плућа и плеуре 1999.

године. Овом класификацијом се ВАС издвојио као посебан тип аденокарцинома са подтиповима: муцинозни, немучинозни и мешовити. ВАС је по тадашњој класификацији представљао чист тапацирајући, лепидични раст без инвазије строме, крвних судова и плеуре. Ова класификација је такође увела термин атипична аденоматозна хиперплазија (ААН) која представља преинвазивну лезију аденокарцинома плућа. ААН се састоји од локализоване, милиметарске пролиферације благе до умерене атипичне пнеумоцита који подсећају, али нису испуњавали критеријум за ВАС. Све ове класификације карцинома плућа су се базирале искључиво на светлосној микроскопији ткива тумора плућа бојеног хематоксилн-еозин техником уз евентуалну примену муцина. 2004.године је издата нова хистолошка класификација тумора плућа, плеуре, тимуса и срца у којој су направљене минималне промене у односу на претходну класификацију а односи се на померање мешовитог аденокарцинома на сам врх листе међу свим подтиповима аденокарцинома (27).

2011. године су од стране Међународне Асоцијације за Истраживања Карцинома Плућа (eng: *International Association for the Study of Lung Cancer*, IASLC), Европског Респираторног Друштва (eng: *European Respiratory Society*, ERS) и Америчког Торакалног Удружења (eng: *American Thoracic Society*, ATS) предложене битне измене у класификацији аденокарцинома плућа у односу на класификацију из 2004.године а односи се на: (1) укидање термина бронхоалвеоларни карцином (ВАС) и мешовити подтип аденокарцинома; (2) додавање Аденокарцинома *in situ* (AIS) као преинвазивне лезије придружујући је тиме ААН; (3) додавање Минимално инвазивног аденокарцинома (MIA); (4) класификација инвазивног аденокарцинома на основу преобладајућег подтипа; (5) коришћење термина лепидични за неинвазивну компоненту (раније класификован као ВАС) присутну као део инвазивног аденокарцинома; (6) укључујући термин “инвазивни муцинозни аденокарцином” за аденокарциноме раније класификоване као муцинозни ВАС, искључује туморе који испуњавају критеријуме за AIS или MIA; (7) искључити термин муцинозни цисаденокарцином и укључити га у категорију колодног аденокарцинома (28, 29).

WHO је 2015. године објавила ново издање патохистолошке класификације тумора плућа, плеуре, тимуса и срца која садржи бројне промене у односу на издање из 2004.године. Поредећи са WHO класификацијом из 2004.године, најзначајније промене у овом издању укључују:

1. употребу имунохистохемијских бојења, ради прецизније класификације и на плућним ресекатима,
2. нови акценат на генетичким студијама, посебно интеграцији молекуларних тестирања да би се омогућила персонализација стратегије лечења за оболеле од карцинома плућа,
3. нова класификација за мале биопсије и цитолошке узорке као што је предложено 2011. године од стране IASLC, ATS, ERS тј. ова класификација има другачији приступ од класификације за велике ресекате, узорке плућа
4. потпуно другачији приступ у класификацији аденокарцинома као што је предложено од 2011. године од стране IASLC / ATS / ERS;
5. ограничавање дијагнозе крупноћелијског карцинома само за ресекате, никако за ситне биопсије,
6. рекласификацију карцинома сквамозних ћелија: на типове са орожавањем, без орожавања и базалоидни подтип, с тим да сквамозни карциноми без орожавања захтевају имунохистохемијску потврду,
7. груписање неуроендокриних тумора заједно у једну категорију,

8. додавање новог ентитета, карцинома са нуклеарним преуређивањем гена тестиса (*NUT* карцином или тумор средње линије тела) у категорији остали и неклассификовани тумори,
9. промена израза склерозирајући хемангиом у склерозација пнеумоцита
10. промена назива хамартом на " хамартом плућа",
11. стварање групе тзв. *PEC* пекоматозних тумора који укључују лимфангиолеомиоматозу, бенигни и малигни пеком
12. увођење новог ентитета миктоид сарком са *EVSRI-CREB1* фузијом
13. додавање ентитета миепителиома и миепителиног карцинома који има прерасподелу на *EVSRI* гену,
14. препознавање корисности од *VVTR1-CAMTA1* фузије у дијагностици епителиоидног хемангиоендотелиома
15. додавање *Erdheim-Chester* болести са лимфопрлиферативним туморима, и
16. нова група тумора насталих од ткива ектопичног порекла обухвата интрапулмонални тимом, меланом и менингеом

Данас, постављање дијагнозе карцинома плућа захтева мултидисциплинарни приступ, па су у стварању нове *IASLC/ATS/ERS* класификације учествовали светски експерти из области пулмологије, патологије, онкологије, радиологије, молекуларне биологије и грудне хирургије. Последња хистолошка класификација тумора плућа и плеуре је објављена 2021. године у којој се посебан нагласак ставља на молекуларну патологију свих типова тумора (Табела 1) (30).

Табела 1. WHO Хистолошка класификација карцинома бронха 2021.

Epithelial tumors
<i>Papillomas</i>
Squamous cell papilloma, NOS
Squamous cell papilloma, inverted
Glandular papilloma
Mixed squamous cell and glandular Papilloma
<i>Adenomas</i>
Sclerosing pneumocytoma
Alveolar adenoma
Papillary adenoma
Bronchiolar adenoma/ciliated muconodular papillary tumora
Mucinous cystadenoma
Mucous gland adenoma
<i>Precursor glandular lesions</i>
Atypical adenomatous hyperplasia
adenocarcinoma in situ
Adenocarcinoma in situ, nonmucinous
Adenocarcinoma in situ, mucinous
<i>Adenocarcinomas</i>
Minimally invasive adenocarcinoma
Minimally invasive adenocarcinoma, nonmucinous

Minimally invasive adenocarcinoma, mucinous
<i>Invasive nonmucinous adenocarcinoma</i>
Lepidic adenocarcinoma
Acinar adenocarcinoma
Papillary adenocarcinoma
Micropapillary adenocarcinoma
Solid adenocarcinoma
<i>Invasive mucinous adenocarcinoma</i>
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma
Colloid adenocarcinoma
Fetal adenocarcinoma
Adenocarcinoma, enteric type
Adenocarcinoma
<i>Squamous precursor lesions</i>
Squamous cell carcinoma in situ
Mild squamous dysplasia
Moderate squamous dysplasia
Severe squamous dysplasia
<i>Squamous cell carcinomas</i>
Squamous cell carcinoma, NOS
Squamous cell carcinoma, keratinizing
Squamous cell carcinoma, nonkeratinizing
Basaloid squamous cell carcinoma
Lymphoepithelial carcinoma
<i>Large cell carcinomas</i>
Large cell carcinoma
<i>Adenosquamous carcinomas</i>
Adenosquamous carcinoma
<i>Sarcomatoid carcinomas</i>
Pleomorphic carcinoma
Giant cell carcinoma
Spindle cell carcinoma
Pulmonary blastoma
Carcinosarcoma
<i>Other epithelial tumors</i>
NUT carcinoma
Thoracic SMARCA4-deficient undifferentiated tumora
<i>Salivary gland-type tumors</i>
Pleomorphic adenoma

Adenoid cystic carcinoma
Epithelial-myoepithelial carcinoma
Mucoepidermoid carcinoma
Hyalinizing clear cell carcinoma
Myoepithelioma
Myoepithelial carcinoma
Lung neuroendocrine neoplasms
<i>Precursor lesion</i>
Diffuse idiopathic neuroendocrine cell Hyperplasia
<i>Neuroendocrine tumors</i>
Carcinoid tumor, NOS/neuroendocrine tumor, NOS
Typical carcinoid/neuroendocrine tumor, grade 1
Atypical carcinoid/neuroendocrine tumor, grade 2
<i>Neuroendocrine carcinomas</i>
Small cell carcinoma
Combined small cell carcinoma
Large cell neuroendocrine carcinoma
Combined large cell neuroendocrine carcinoma
Tumors of ectopic tissues
Melanoma
Meningioma
Mesenchymal tumors specific to the Lung
Pulmonary hamartoma
Chondroma
Diffuse lymphangiomatosis
Pleuropulmonary blastoma
Intimal sarcoma
Congenital peribronchial myofibroblastic tumor
Pulmonary myxoid sarcoma with EWSR1-CREB1 fusion
<i>PEComatous tumors</i>
Lymphangioliomyomatosis
PEComa, benign
PEComa, malignant
Hematolymphoid tumors
MALT lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma, NOS
Lymphomatoid granulomatosis, NOS
Lymphomatoid granulomatosis, grade 1
Lymphomatoid granulomatosis,

grade 2
Lymphomatoid granulomatosis,
grade 3
Intravascular large B-cell lymphoma
Langerhans cell histiocytosis

1.4.1. Имунохистохемија

Ћелије сквамoцелуларног карцинома преdomинантно експримирају кератин високе молекуларне тежине (34*β*E12), цитокератин 5/6, карциноембионални антиген (CEA), p63 и у новије време p40. Многе ћелије експримирају кератин ниске молекуларне тежине (35*β*H11) и ретко тироидни транскрипциони фактор 1 (TTF-1). Ћелије аденокарцинома експримирају CK7, ретко CK20. TTF-1 је у највећој мери експримиран код добро диферентованог аденокарцинома. Према новој хистолошкој класификацији из 2021.године инвазивни аденокарцином је подељен у две категорије – муцинозни и немучинозни тип. Мучинозни подтипови, инвазивни мучинозни аденокарцином (eng: *Invasive nonmucinous adenocarcinoma*, IMA) и минимално инвазивни аденокарцином (eng: *Minimally invasive adenocarcinoma*, MIA) се могу дијагностиковати код тумора сличне морфологије који су дијаметра до 3cm. IMA се хистолошки дефинише као аденокарцином који се састоји од пехарастих и колумнарних ћелија чији је имунофенотип: CK7 + TTF-1 - , CDX2 фокално, CK20 фокално, HNF4a+ а диференцијално дијагностички дилему могу правити тумори гастроинтестиналног епитела (31-34). Оно што је карактеристично за овај тип тумора су честе мутације у KRAS гену, NRG1 фузије, ERBB2 алтерације (35, 36) а са друге стране ретке мутације у EGFR гену као и TP53 мутације.

Код TTF1 позитивних тумора, негативан тиреоглобулин искључује могућност да се ради о метастази карцинома штитасте жлезде. Диференцијално дијагностичку дилему прави и мучинозни ВАС који може бити TTF1 негативан а CK7 и CK20 позитиван. Разлику између примарног карцинома плућа и метастатског карцинома колоне који је CK20 позитиван прави позитивно бојење на CDX2. Ћелије карцинома дојке показују имунореактивност за рецептор естрогена, што није случај код примарног карцинома плућа. Ћелије карцинома бубрега су високо имунореактивне на виментин , али не и на AE1/AE3 и CK7. Метастаски карцином јајника је CA125, N-кадхерин, виментин и естроген рецептор позитиван , док је CEA негативан.

У последњих неколико година се све више напушта термин NSCLC и тежи ка прецизнијој патохистолошкој верификацији, па је препорука да се тумори који су TTF1 позитивни, p63 негативни дефинишу као NSCLC - највероватније аденокарциноми; тумори који су TTF1 негативни, p63 позитивни – NSCLC, највероватније сквамoцелуларни карциноми. Када се, на основу морфолошких карактеристика и имунохистохемијским бојењем, није могуће са сигурношћу изјаснити да ли се ради о адено или сквамoцелуларном карциному, препорука је да се такав тумор означи као тумор који није другачије одређен тј. класификован (енгл: *Not otherwise specified*, NOS). Овај термин би требало користити и онда када је у истом узорку једна група ћелија позитивна на TTF1 а друга позитивна на сквамoзне маркере и врло вероватно да се ради о аденосквамoзном карциному, обзиром да би овакву дијагнозу требало поставити само на ресекционом узорку.

За потврду неуроендокрине диференцијације тумора, користе се неуроендокрини имунохистохемијски маркери – хромогранин, синаптофизин, CD56

итд. Само један позитиван маркер је довољан да би се поставила дијагноза. Око 50% неуроендокринх тумора је *TTF1* позитивно.

1.5. Клиничка слика карцинома плућа

Клинички симптоми и знаци удружени са карциномом плућа су веома различити и често су резултат регионалног и екстраторакалног ширења тумора као и развоја паранеопластичног синдрома. У моменту постављања дијагнозе, асимптоматску болест има 7–10% болесника, мање од 5% болесника са бронхогеним микроцелуларним карциномом, код 27% пацијената се јављају симптоми као последица примарног тумора, код 32% услед постојања метастаза, док се код 34% пацијената јављају неспецифични симптоми и знаци као што су анорексија, малаксалост, губитак телесне тежине који сугеришу постојање малигне болести. Када постоје симптоми болести, ради се најчешће о већ одмаклој болести.

Клинички симптоми и знаци који се јављају код пацијената оболелих од карцинома плућа се могу поделити у следеће групе:

- Симптоми услед примарног карцинома плућа, било услед централног, ендобронхијалног или периферног раста примарног тумора
- Симптоми услед регионалног ширења тумора у грудном кошу
- Симптоми услед екстраторакалног ширења тумора
- Симптоми паранеопластичног синдрома.

Симптоми услед локалног раста тумора

- Кашаљ—обично најучесталији симптом болести, присутан код 61% болесника. Промена карактера кашља или количине спутума може побудити сумњу на постојање тумора плућа. Чешће је присутан код тумора са централном локализацијом.
- Хемоптизије – представљају најчешћи разлог првог јављања лекару. Углавном су минималне, док се масивније јављају у случају захватања већег крвног суда. Свака појава хемоптизија захтева спровођење инвазивних дијагностичких процедура у циљу дефинисања етиологије.
- Диспнеја –узрокована опструкцијом великог дисајног пута, деструкцијом плућа, постојањем масивног плеуралног излива или карциноматозног лимфангитиса.
- *Wheezing* – локализовано звиждање узроковано опструкцијом дисајног пута
- Стридор - последица је компресије главног бронха или на трахеју услед раста тумора и/или метастатски увећаних медијастиналних лимфних жлезда. Некада ендолуминални раст тумора доводи до критичне централне опструкције и стридорозног дисања.
- Бол –најчешћи и нејтежи симптом малигне болести. Инвазија у ребро или кичмени пршљен изазива континуирани локализовани бол. Бол под лопатицом који се шири дуж горњег екстремитета може бити узрокован тумором плућног врха или горњег сулкуса, *Pancoast* тумор.

Симптоми услед регионалног раста тумора

- Синдром горње шупље вене (лат: *Syndroma venae cavae*, SVC) – настаје услед компресије, инвазије или тромбозе вене. У 67-82% случајева је последица карцинома плућа, док су у 5-15 % случајева узрок лимфоми, тимоми, герминативни тумори. Као бенигни узроци SVC се најчешће наводе фиброзни медијастинитис и субстернална струма. Типичне клиничке манифестације овог синдрома су оток и плетора лица и врата, едем коњунктива, ринореја,

ларингеални оток, проширене вене на врату и зиду грудног коша. Болесници се жале на главобољу, поремећај вида и свести.

- *Pancoast* тумор и Хорнеров синдром – узрокују тумори локализовани у апикопостериорним деловима плућа. Инфилтрација брахијалног плексуса као и коренова осмог цервикалног, првог и другог торакалног нерва узрокује неуралгију дуж улнарне стране руке, птозу, миозу, енофталмус и унилатералну анхидрозу лица.
- Промуклост – услед парезе или парализе *n. recurrens*-а
- Пареза или парализа *n. phrenicus*-а
- Малигни плеурални излив - јавља се у 16–20% болесника. Знак је лоше прогнозе.
- Перикардни излив и тампонада – настају директном инвазијом тумора, лимфогеном или хематогеном дисеминацијом.
- Дисфагија – услед туморске инфилтрације зида једњака

Симптоми услед екстраторакалног ширења тумора

- Интракранијалне метастазе – главобоља, мучнина и повраћање, церебрална дисфункција, хемиплегија, поремећај когнитивних функција
- Метастазе у костима – локализован бол у зависности од тога која је коштана структура захваћена остеолитичним или остеобластним метастатским процесом
- Метастазе у јетри - обично су асимптоматске, са или без поремећаја функције јетре у биохемијским анализама
- Метастазе у надбубрежним жлездама – обично су асимптоматске

1.5.1. Паранеопластични синдром

Паранеопластични синдром је група клиничких поремећаја удружених са малигном болешћу, који нису последица директних физичких ефеката примарног тумора или метастатске болести. Постоји код 10–20% болесника, пре свега код ситноћелијског карцинома, а клиничке манифестације могу бити веома различите, испољавају се у облику системских, ендокринолошких, неуролошких, кожных, хематолошких, бубрежних манифестација. Није везан за величину примарног тумора и у појединим случајевима може да претходи дијагнози болести. У оквиру паранеопластичног синдрома посебно се истичу *Trousseau*-ов и *Eaton Lambert*-ов.

Trousseau-ов синдром је стечена коагулопатија која резултира миграторним тромбофлебитисом. Позната је повезаност хиперкоагулабилних стања и тромботских манифестација са појединим карциномима, међу њима и карциномом плућа. Узроци настанка тромбоза, или субклиничких коагулопатија су бројне промене у систему коагулације и фибринолизе. Тромбозе су делимично одраз и хиперпермеабилног васкуларног система тумора, који омогућава акумулацију плазматских хемостатских фактора у релативно високим концентрацијама у строми тумора, као и продукције прокоагулантних и ткивних фактора од стране самих туморских ћелија. *Trousseau*-ов синдром или *MTP* се карактерише развојем рекурентног површинског тромбофлебитиса. Тромби се могу појавити и у артеријској и у венској циркулацији.

Eaton–Lambert-ов синдром је сличан мијастенији, а штеди очне и булбарне мишиће. Оштећење је пресинаптичко, посредовано *IgG* антителима, са смањеним ослобађањем ацетилхолина из нервних завршетака. Стање може претходити, пратити или се развити након дијагнозе карцинома. Углавном се јавља код мушкараца у грудном кошу (70% има микроцелуларни карцином плућа). Болесници наводе умор, малаксалост, болове у мишићима проксималних удова, периферне парестезије, сува уста, сметње ерекције и птозу. Дубоки тетивни рефлекси су ослабљени или угашени.

Дијагноза се потврђује растућим одговором на понављано подраживање нерава: амплитуде акционих потенцијала сложене мишићне активности повећавају се при стимулацији >10 Hz. Лечење је у првом реду усмерено на основну болест, чиме се понекад постижу добре ремисије. Гуанидин (на почетку 125 mg ПО 4×/дан, што се поступно повећава до највише 35 mg/kg) олакшава ослобађање ацетилхолина и смањује симптоме, али оштећује коштану срж и јетру. Неким болесницима помажу кортикостероиди и плазмафереза.

1.5.2. Процена општег стања пацијента

Процена општег стања пацијента је покушај да се одреди укупна животна активност и квалитет живота оболелог од малигне болести. За процену стања пацијента се најчешће користе две скале, *Karnofski Performans Skala* (KPS) i *ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performans Status* (PS). *Karnofski* скала је добила назив по др Дејвиду Карнофском (*David Karnofsky*), који је још 1948.године створио скалу процене општег стања пацијента. Пацијенту се додељује број од 0 до 100 у десетицама, при чему је 0 смрт, а 100 је стање без икаквих тегоба (37). *ECOG PS* скала, објављена од стране *Oken* и сарадника 1982. Године, данас се чешће користи, једноставнија је, користи оцену од 0 до 5, при чему је 0 стање без тегоба, као пре почетка болести, а 5 означава смрт (38). Табела 2 упоредно приказује елементе обе ове скале.

Табела 2. Процена општег стања болесника

Статус	<i>Karofsky</i>	<i>ECOG</i>	Статус
Нормалан, без тегоба, без знакова болести није потребна нега	100	0	Без тегоба. Потпуно активан, извршава све животне активности као пре болести без ограничења
Способан да обавља нормалне активности, присутни минимални симптоми и знаци болести	90	1	Има симптоме, али је комплетно активан, повремено ограничен у тешкој физичкој активности, способан за извршење лаког посла, нпр. лак посао у кући, канцеларијски посао
Нормална активност, уз напор, присутни неки симптоми и знаци болести	80		
Брине се за себе, не може обављати нормалне активности или радити активан посао	70	2	Везан за кревет мање од 50% сати дневно, способан да се брине о себи, неспособан за посао
Повремено захтева помоћ, али задовољава већину својих потреба	60		
Захтева сталну помоћ и честу медицинску бригу	50	3	Везан за кревет више од 50% сати дневно, ограничено способан да се брине о себи
Захтева посебну негу и помоћ	40		
Опште стање изразито поремећено, индиковано болничко лечење	30	4	Потпуно везан за кревет и потпуно неспособан да се брине о себи
Тешко болестан, неопходна хоспитализација и супортивна терапија	20		
Морибундан, брза прогресија према фаталном исходу	10	5	Смртни исход
Смртни исход	0		

1.6. TNM klasifikacija

TNM (Tumor, Nodus, Metastasis) класификација се користи за одређивање стадијума карцинома плућа. Заснива се на величини тумора и његовом односу са околним структурама (T0-4), захваћености лимфних чворова туморским ћелијама (N0-3) и удаљеним метастазама (M0, 1a,b). Од 1985. године Амерички комитет за карцином (*eng: American Joint Committee for Cancer-AJCC*) и Интернационално удружење против карцинома (*eng: Union Internationale Contre le Cancer-UICC*) су установили *TNM (tumor-node-metastasis)* систем за прцену проширености болести, који је брзо прихваћен широм света (39). Након тога, систем је више пута ревидиран и адаптиран, због напретка у сазнањима у овој области. Седма ревизија *TNM* класификације карцинома плућа прихваћена је у лето 2009. године, а њена примена је започела 1. јануара 2010. године (Табела 3) (40), док је 2015. године дат предлог за осму ревизију *TNM* класификације карцинома плућа која је објављена у децембру 2016.године а њена примена је започета у јануару 2017. године (Табела 4) (41).

Табела 3. *TNM* класификација 7. едиција

T – Примарни тумор	
Tis	Карцином <i>in situ</i>
T1	Тумор ≤ 3 cm окружен плућима или висцералном плеуром, и без бронхоскопске евиденције о инвазији проксимално од лобарног бронха
T1a	тумор $\leq 2,0$ cm у највећем дијаметру
T1b	тумор > 2 cm и ≤ 3 cm у највећем дијаметру
T2	Тумор $> 3,0$ cm у највећем дијаметру или тумор са било којом од следећих карактеристика: захвата главни бронх ≥ 2 cm дистално од карине захвата висцералну плеуру удружен са ателектазом или опструктивним пнеумонитисом који захватају хиларну регију али не захвата цело плуће
T2a	тумор > 3 cm и ≤ 5 cm
T2b	тумор > 5 cm и ≤ 7 cm
T3	Тумор $> 7,0$ cm у највећем дијаметру или тумор са било којом од следећих карактеристика: директно захвата: грудни зид, дијафрагму, <i>p. phrenicus</i> , медијастиналну плеуру, паријетални перикард, главни бронх на мање од 2 cm од карине без њеног захватања ателектаза или опструктивни пнеумонитис целог плућа одвојени туморски нодули у истом режњу
T4	Тумор било које величине који захвата: медијастинум, срце, велике крвне судове, трахеју, <i>p. recurrens</i> , езофагус, кичмене пршљенове, карину, или са одвојеним туморским нодулима у другом ипсилатералном режњу

N статус

N0	Без метастаза у регионалним лимфним чворовима
N1	Метастазе било у ипсилатералним перибронхијалним или хиларним лимфним чворовима, било и у једним и у другим, укључујући директно захватање
N2	Метастазе у ипсилатералним медијастиналним и/или субкариналном лимфном чвору
N3	Метастазе у контралатералним медијастиналним, контралатералним хиларним; у ипсилатералним и/или контралатералним скаленским или супраклавикуларним лимфним чворовима

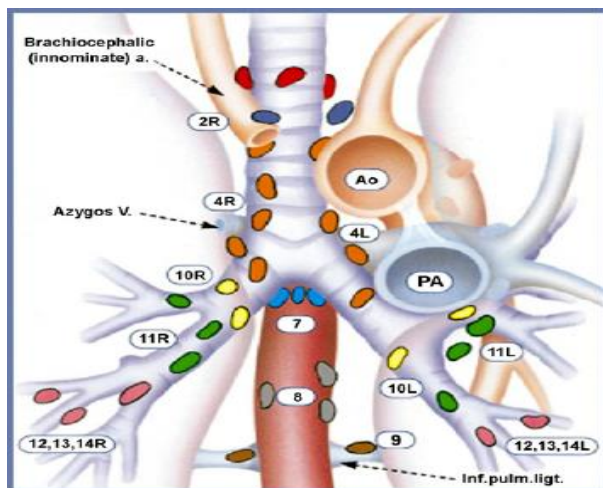
M статус

M0	Без удаљених метастаза
M1	Удаљене метастазе
M1a	Одвојени туморски нодул(и) у контралатералном режњу; тумор са плеуралним нодулима или малигни плеурални и/или перикардни излив
M1b	Удаљене метастазе

Наруке и сарадници су први класификовали иницијални систем медијастиналних лимфних чворова још 70-их година прошлог века. Након тога је уследила модификација шеме од стране *Mountain*-а и *Dresler*-а, која је прихваћена од стране Америчког удруженог комитета за карцином (AJCC) и од стране Комитета за прогностичке факторе *TNM* Интернационалне уније за карцином на заједничком састанку 1996.године. Од тада је како у клиничким студијама тако и у клиничкој пракси у употреби тзв. *Mountain Dresler* мапа лимфних чворова (слика 2.)

Од 1973.године, када је по први пут уведен систем за стадирање карцинома плућа, захваћеност лимфних чворова се сврстава у 4 категорије:

- 1.N0 – без захваћених лимфних чворова
- 2.N1 – захваћеност перибронхијалних, интерлобарних или хиларних лимфних чворова
- 3.N2 – захваћеност ипсилатералних медијастиналних лимфних чворова
- 4.N3 – захваћеност контралатералних медијастиналних лимфних чворова или супраклавикуларних лимфних чворова



Superior Mediastinal Nodes

- 1 Highest Mediastinal
- 2 Upper Paratracheal
- 3 Pre-vascular and Retrotracheal
- 4 Lower Paratracheal (including Azygos Nodes)

N_2 =single digit, ipsilateral
 N_3 =single digit, contralateral or supraclavicular

Aortic Nodes

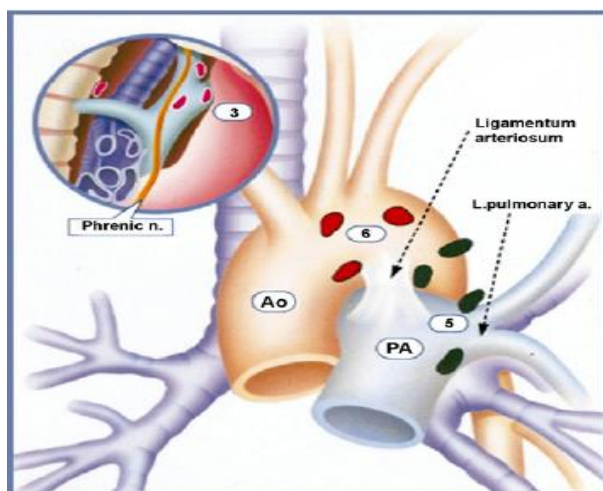
- 5 Subaortic (A-P window)
- 6 Para-aortic (ascending aorta or phrenic)

Inferior Mediastinal Nodes

- 7 Subcarinal
- 8 Paraesophageal (below carina)
- 9 Pulmonary Ligament

N_1 Nodes

- 10 Hilar
- 11 Interlobar
- 12 Lobar
- 13 Segmental
- 14 Subsegmental



Слика 2. *Mountain Dresler* мапа лимфних чворова

Табела 4. TNM класификација 8. едиција

T – Примарни тумор	
Tx	Примарни тумор се не може проценити
T0	Без доказа о постојању примарног тумора
T1	Тумор ≤ 3 cm у највећем дијаметру окружен плућима или висцералном плеуром, и без бронхоскопске евиденције о инвазији проксимално од лобарног бронха
T1a(mi)	Минимално инвазивни аденокарцином
T1a	тумор $\leq 1,0$ cm у највећем дијаметру
T1b	Тумор > 1 cm и ≤ 2 cm
T1c	Тумор > 2 cm и ≤ 3 cm
T2	Тумор $> 3,0$ cm али не већи од 5 cm у највећем дијаметру или тумор са било којом од следећих карактеристика: захвата главни бронх ≥ 2 cm дистално од карине захвата висцералну плеуру удружен са ателектазом или опструктивним пнеумонитисом који захватају хиларну регију али не захвата цело плуће
T2a	Тумор > 3 cm и ≤ 4 cm
T2b	Тумор > 4 cm и ≤ 5 cm
T3	Тумор > 5 cm али не већи од 7 cm у највећем дијаметру или тумор који директно директно захвата: грудни зид, дијафрагму, <i>p. phrenicus</i> , медијастиналну плеуру, паријетални перикард, одвојени туморски нодули у истом режњу
T4	Тумор већи од 7 cm или било које величине који захвата: медијастинум, срце, велике крвне судове, трахеју, <i>p. recurrens</i> , езофагус, кичмене пршљенове, карину, или са одвојеним туморским нодулима у другом ипсилатералном режњу

N status – нема промена у 8. *TNM* едицији

N0	Без метастаза у регионалним лимфним чворовима
N1	Метастазе било у ипсилатералним перибронхијалним или хиларним лимфним чворовима, било и у једним и у другим, укључујући директно захватање
N2	Метастазе у ипсилатералним медијастиналним и/или субкариналном лимфном чвору
N3	Метастазе у контралатералним медијастиналним, контралатералним хиларним; у ипсилатералним и/или контралатералним скаленским или супраклавикуларним лимфним чворовима

M status

M0	Без удаљених метастаза
M1	Удаљене метастазе
M1a	Одвојени туморски нодул(и) у контралатералном режњу; тумор са плеуралним нодулима или малигни плеурални и/или перикардни излив
M1b	Једна екстраторакална метастаза у једном органу
M1c	Мултипле екстраторакалне метастазе у једном или неколико органа

У 8. едицији *TNM* класификације промене се односе пре свега на Т дескриптор па је тако Т1 подељен у три подгрупе (Т1а ≤ 1 cm, Т1b > 1 cm у ≤ 2 cm, Т1c > 2 cm у ≤ 3 cm), затим Т2 (Т2а > 3 cm у ≤ 4 cm, Т2b > 4 cm у ≤ 5 cm), Т3 (> 5 cm у ≤ 7 cm) у Т4 (> 7 cm) (42). Промена стадијума болести се заснива пре свега на Т дескриптору стављајући га у у виши стадијум у 8.едицији *TNM* класификације а то се управо десло са Т3 туморима који су тако класификовани било због инвазије зида грудног коша или инфилтрације неке од структура медијастинума. Када се Т3 тумори повежу са N2 статусом, из IIIа стадијума по 7.едицији *TNM* -а се прелази у IIIб стадијум по 8. едицији *TNM* класификације, док удруженост Т3 тумора са N3 статусом нодуса преводи IIIб у IIIс стадијум по 8. едицији *TNM* класификације (Табела 5). Прогноза болести код пацијената у IIIс стадијуму је иста као код оних у IVа стадијуму болести а разлог издвајања новог IIIс стадијума је у евентуално другачијем терапијском приступу у појединим категоријама. Такође, према 8. едицији *TNM* -а тумори могу бити сврстани у другу Т категорију што резултира променом стадијума болести као што је рекласификација тумора који инфилтришу дијафрагму у Т4 туморе, па они удружени са N0 статусом лимфних нодуса преводи Пс у IIIа стадијум болести (Табела 6). Промене су направљене и у 4. стадијуму болести. M1а категорију представљају одвојени туморски нодули (и) у контралатералном режњу; тумор са плеуралним нодулима или малигни плеурални и/или перикардни излив; M1b подразумева једну екстраторакалну метастазу у једном органу. И једна и друга категорија чине IVа стадијум. Мултипле екстраторакалне метастазе у једном или неколико органа представљају M1с категорију

и IVb стадијум. Узимајући све ово у обзир изнесен је предлог стажирања болести за осму ревизију *TNM* класификације карцинома бронха (Табела 7) (43).

Табела 5. *TNM* класификација (8.едиција) –Величина тумора

Дескриптор	T7e	T8e	N0	N1	N2	N3
Величина >5-7 cm	T2b		IIa	IIb	IIIa	IIIb
		T3	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
		T3	IIb	IIIa	IIIb	IIIc

Табела 6. *TNM* класификација (8.едиција) –Величина тумора и инвазија дијафрагме

Дескриптор	T7e	T8e	N0	N1	N2	N3
Величина >7cm	T3		Iib	IIIa	IIIa	IIIb
		T4	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
		T4	IIIa	IIIa	IIIb	IIIc

Табела 7. Предлог група стадијума за осму ревизију *TNM* класификације карцинома бронха

Примарни се не проценити	тумор може	Tx	N0	M0
Стадијум 0		Tis	N0	M0
Стадијум IA1		T1a(mi)	N0	M0
		T1a	N0	M0
Стадијум IA2		T1b	N0	M0
Стадијум IA3		T1c	N0	M0
Стадијум IB		T2a	N0	M0
Стадијум IIA		T2b	N0	M0
Стадијум IIB		T1a-c	N1	M0
		T2a	N1	M0
		T2b	N1	M0
		T3	N0	M0
Стадијум IIIA		T1a-c	N2	M0
		T2a-b	N2	M0
		T3	N1	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
Стадијум IIIB		T1a-c	N3	M0
		T2a-b	N3	M0
		T3	N2	M0
		T4	N2	M0
Стадијум IIIC		T3	N3	M0
		T4	N3	M0
Стадијум Iva		Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
		Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
Стадијум Ivb		Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

*Промене у односу на 7.едицију *TNM* класификације су маркиране црвеном бојом

1.7. Скрининг

Како се преко 80% свих *NSCLC* открива у локално унапредовалом или метастатском стадијуму болести са процењеним петогодишњим преживљавањем од 1-5% намеће се велика потреба за адекватним скрининг процедурама у циљу раног откривања карцинома плућа (44). Раније примењивана стандардна радиографија грудног коша у комбинацији са *цитолошким* прегледом спутума се није показала као довољно добар метод (45). Нискодозни СТ (енг: *Low-dose CT - LDCT*) се наводи као дијагностичка процедура избора за рано откривање карцинома плућа обзиром да је у склопу скрининг процедура карцином плућа детектован у првом стадијуму болести у чак 48-85% наспрам 30-35% карцинома који су дијагностиковани стандардним клиничким прегледом (46).

Први значајни резултати скрининга су добијени у студији спроведеној у Сједињеним Америчким Државама. У ову студију је укључено преко 53000 особа старости између 55 и 74 године који су били вишегодишњи тренутни или бивши пушачи (преко 30 пакло/година или мање од 15 година од престанка пушења). Сви испитаници су подељени у две групе, једна која је подвргнута радиографијама грудног коша једном годишње током три године, и друга која је праћена *LDCT*-ом. Поредићи *LDCT* преглед и стандардну радиографију грудног коша, *LDCT* скринингом је редуковано 20% смртних случајева узрокованих карциномом плућа а смртност смањена за 6.7% (47).

Сходно оваквим резултатима, 2013.године је дата препорука да се *LDCT* користи као дијагностичка процедура избора за скрининг карцинома плућа. Један од недостатака ове скрининг методе су лажно-позитивни нодуси у плућном паренхиму који се могу детектовати код више од половине испитаника, а који би могли захтевати и можда не тако потребне додатне инвазивне дијагностичке процедуре. Из тих разлога је постојала потреба за дефинисањем критеријума који би помогли у редуковању броја лажно-позитивних нодуса а који су се заснивали пре свега на дијаметру, волумену нодуса и брзини његовог раста. Узимајући све ово у обзир предложен је начин праћења по којима би нодуси дијаметра 100-300mm³ или 5-10mm захтевали одређивање времена дуплирања волумена, па уколико би се волумен нодуса дуплирао за мање од 600 дана то би захтевало додатне дијагностичке процедуре у циљу утврђивања природе нодуса; нодуси већи од 300mm³ или 10mm су високо суспектни на малигнитет (48).

Холандска *NELSON* студија чији су резултати објављени 2018.године, пратила је више од 15000 особа под високим ризиком за развој карцинома плућа, током 10 година, и поредила групу праћену помоћу *LDCT* и групу код које није спроведен скрининг. Резултати су показали смањен број смртних исхода повезаних са карцином плућа за 26% код мушараца и за чак 39-61% код жена (49).

На основу резултата бројних клиничких истраживања дате су препоруке за преглед грудног коша *LDCT* -ом код високоризичне популације: 1) особе старости 55 до 70 година које су пушачи преко 30 пакло/година или бивши пушачи који су пушили преко 30/пакло година, а који су престали да пуше у последњих 15 година. 2) особа старости преко 50 година који су пушачи преко 20 пакло/година и са придруженим факторима ризика за карцином плућа – историја малигнитета, хронична опструктивна болест плућа, плућна фиброза, позитивна породична анамнеза за карцином плућа, излагање радону, професионална експозиција арсену, хрому, азбесту, никлу, кадмијуму, силицијуму, диму угља и чађи (47, 50, 51).

1.8. Терапија карцинома плућа

У лечењу пацијената са карциномом плућа данас се примењује концепт персонализоване медицине, а крајњи циљ овог приступа јесте да се побољша укупно преживљавање пацијената, зависно од подтипа и стадијума тумора, које је упркос достигнућима у молекуларној дефиницији болести, скринингу и терапији, још увек незадовољавајуће (52). Опција лечења пацијената зависи од клиничког стадијума болести, патохистолошког типа тумора, анатомске проширености болести и општег стања болесника. Препоруке за лечење оболелих од *NSCLC* су садржане у водичима дефинисаним од стране различитих удружења као што су Европско удружење медикалних онколога (енг: *European Society of Medical Oncology- ESMO*), Америчко удружење клиничких онколога (енг: *American Society of Clinical Oncology- ASCO*), Национална свеобухватна мрежа за малигне туморе (енг: *National Comprehensive CancerNetwork- NCCN*) и други.

Стадијум I и II

Хируршка ресекција карцинома плућа је терапијска опција за I и II стадијум болести, код пацијената код којих је могућа ресектабилност и операбилност у зависности од пратећих коморбидитета. У случају постојања контраиндикација или високог ризика за извођење хируршке ресекције или пацијент одбија предложену меру лечења, препорука је стереотактична радиохирургија (енг: *Stereotactic Radiosurgery, SRS*), или радикална зрачна терапија хипофракционисаним режимима чиме се постиже локална контрола болести у 90% (53-55).

Лобектомија представља стандардну хируршку процедуру за T1 туморе. Када посматрамо *NSCLC* подгрупе, показано је да је код сквамозелуларног карцинома плућа, лобектомија као хируршка техника супериорнија у односу на сегментектомију и клинасту ресекцију, док се код T1a аденокарцинома исти резултати постижу било да се учини лобектомија или сегментектомија (56, 57). Нема значајне разлике између отворене торакотомije и *VATS* уколико је могуће учити ресекцију тумора са чистим ресекционим маргинама (*R0* ресекција) и адекватну нодалну дисекцију иако је данас преферирана *VATS* техника (58-60).

Пацијенти код којих је учињена хируршка *R0* ресекција са T1ab N0 и T2a N0 се у даљем току само прате, док би у случају *R1* ресекције даље лечење подразумевало хируршку реинтервенцију, хемио или радиотерапију. Примена адјувантне хемиотерапије је данас стандард у Ib и II стадијуму болести као и код пацијената који спадају у групу оних са високим ризиком – слабо диферентован тумор, васкуларна инвазија, клинаста ресекција, тумор већи од 4cm, захваћеност висцералне плеуре и непознат нодални статус продужавајући преживљавање за 5-15%. Саветује се примена дублета заснованог на цисплатини, 3 до 4 циклуса уз укупну дозу цисплатине од око најмање 300mg/m². Највише доказа има за примену винорелбина у комбинацији са цисплатином, али се могу применити други хемиотерапеутици као што су гемцитабин, доцетаксел, пеметрексед (61, 62) .

Стадијум III

Главне дилеме када је у питању лечење *NSCLC* се односе на III стадијум болести, обзиром да овој групи припадају пацијенти са великим туморима а без захватања лимфних нодуса код којих лечење са куративном интенцом долази у обзир, али и пацијенти са N1 и N2 лимфонодалним статусом код којих куративни третман у највећем броју случајева није могућ. Код пацијената са дијагностикованим III стадијумом код којих се планира куративни третман би требало урадити *MR* ендокранијума у циљу адекватног стажирања болести, док код оних пацијената код

којих се планира дефинитивни третман, дијагностичку евалуацију допунити *PET CT*-ом како би се искључило постојање екстраторакалних метастаза али и утврдила евентуална захваћеност медијастиналних лимфних нодуса.

Оперативно лечење је препорука код тумора који су клинички стажирани као N2, али је биопсијом потврђено да се ради о бенижном нодусу, уз препоруку за примену адјувантне хемиотерапије (63). Посебну групу чине они пацијенти са инциденталном N2 болешћу нађеном при операцији, и поред адекватно урађеног преоперативног медијастиналог стадирања, ако је технички изводљива комплетна ресекција, препоручује се планирана операција са медијастиналном лимфаденектомијом уз примену адјувантне хемиотерапије на бази платине. Код пацијената са преоперативно утврђеном N2 болешћу препоручује се индукциона хемиотерапија на бази платине или индукциона хемио и радиотерапија, а у случају да је индукциона терапија довела до јасног одговора на нивоу медијастинума, и то само ако је могућа комплетна ресекција препорука је хируршка ресекција с тим да се избегне пнеумонектомија. Такође, о оперативном третману треба размишљати и код T4N0 тумора под условом да је R0 ресекција изводљива.

Када хирургија као куративни третман није могућа, терапијски стандард представља конкурентна хемиорадиотерапија, током које се примењује хемиотерапијски дублет на бази платине и зрачна терапија са 60-66Gy у 30 до 33 фракције са скромним резултатима петогодишњег преживљавања. Уколико конкурентна хемиорадиотерапија није изводљива из било ког разлога, код старијих пацијената, код пацијената лошијег перформанс статуса и код оних са придруженим коморбидитетима, секвенцијална хемиотерапија праћена радиотерапијом може бити алтернатива.

Измене у терапијском приступу код ове популације пацијената донели су резултати *PACIFIC* студије. Студија је укључила пацијенте стадијума III и поделила их у две групе, једна група код које је примењена дефинитивна конкурентна *HT-RT*, по комплетирању пацијенти су лечење наставили терапијом одржавања Дурвалумабом у трајању од годину дана, док је друга група пацијената по комплетирању хемио и радиотерапије само праћена. Резултати студије су показали статистички и клинички значајно продужење времена до прогресије болести (енг: *progression-free survival*, PFS), са медијаном од 16.8 месеци у групи која је примала дурвалумаб према 5.6 месеци у плацебо групи, и статистички и клинички значајно продужење укупног преживљавања, чија медијана није достигнута у групи са дурвалумабом, а износила је 28.7 месеци у плацебо групи (64, 65). На основу ових резултата ово је сада терапија избора за лечење ове групе пацијената.

Стадијум IV

У метастатском, IV стадијуму болести се дијагностикује око 40% новооболелих пацијената чије је петогодишње преживљавање до недавно било јако скромно, мање од 5%. Развој молекуларно циљаних агенаса и имунотерапије у последњих неколико година је довело до озбиљнијих помака у резултатима лечења, па тако данас без молекуларног профилисања нема ни адекватног започињања лечења ове популације пацијената. Дијагностички алгоритам за *NSCLC* за III нересектабилни и IV стадијум болести подразумева обавезно *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* и *PD-L1* тестирање. Поред ових, могуће је идентификовати и друге алтерације као таргете за нове терапијске опције: *MET Exon 14 skipping* мутација, *RET* прото-онкоген фузије, *NTRK* фузије, *KRAS G12C*. Они пацијенти са позитивном активирајућом мутацијом за коју постоји циљани агенс, лечење започињу таргет терапијом, док они пацијенти без онкогене адикције а *PD-L1* позитивни су кандидати за лечење имунотерапијом у првој линији лечења. На

крају, остаје популација пацијената која има туморе без онкогене адикције и *PD-L1* негативне туморе код које основа лечење остаје хемиотерапијски дублет на бази платине.

Мутације у *EGFR* гену се јављају код 10-15% аденокарцинома, у егзонима 18-21 *EGFR* гена, а најчешће су делеција у егзону 19 и тачкаста мутација *L858R* у егзону 21. Терапија избора у првој линији лечења код тумора који показују активирајућу мутацију *EGFR* гена је *EGFR* тирозин-киназни инхибитор (*TKI*) прве, друге или треће генерације (гефитиниб, ерлотиниб, афатиниб, осимертиниб, лазретиниб). Ефикасност *TKI* у првој линији лечења је потврђена у бројним клиничким трајаљима показујући дуже преживљавање без прогресије болести као и значајну разлику у укупној стопи одговора (енг: *Overall response rate-ORR*) у односу на хемиотерапију (66, 67).

Посебну групу представљају они тумори који испољавају мутације у егзону 20 *EGFR* гена. Ове мутације чине око 1-12% свих тумора са *EGFR* мутацијом, а најчешће се ради о инсерцијама. Ови тумори знатно мање осетљиви на дејство *EGFR* *TKI* са стопом одговора (енг: *response rate- RR*) од 0% до 25%, за разлику од *RR* код типичних *EGFR* мутација која се креће од 60% до 80%, укупно преживљавање ових пацијената је такође значајно краће, са медијаном *OS* око 16.8 месеци наспрам 32 месеца код пацијената са типичним *EGFR* мутацијама. У складу са овим налазима, препорука за прву линију лечења ове популације пацијената је платински хемиотерапијски дублет. Али, извесни помаи су направљени у оквиру друге линије лечења, увођењем два нова лека-Амивантамаб, хумано, би-специфично *IgG1* антитело које се везује за *EGF* и *MET* (енг: *mesenchymal-epithelial transformation*) рецепторе и *Mobocertinib*, мали молекул са дејством на *EGFR* и *HER2* као и туморима са *ex20ins* (68-70).

У карциному плућа *ALK* се активира хромозомским ре-аранжманом на 2p хромозому, доводећи до активације киназе и онкогене адикције код око 3-7% свих *NSCLC* (71). Кризотиниб лек прве генерације *ALK* инхибитора, испитиван најпре у другој линији лечења а касније и у првој, када је показана његова супериорност у односу на хемиотерапију, са *PFS* од 11 месеци (72). Ефикасности друге генерације *ALK* инхибитора, алектиниба (*PFS* 34 месеца) и бригатиниба (*PFS* 24 месеца), у директном поређењу са кризотинибом, даје предност овим лековима у првој линији лечења (73, 74). Лорлатиниб, као представник треће генерације *ALK* инхибитора, такође је супериоран у поређењу са кризотинибом, и представља опцију за прву линију лечења.

Током примене прве и друге генерације *EGFR* тирозин киназа инхибитора (*TKI*) и прве генерације *ALK* тирозин киназа инхибитора у једном тренутку ће доћи до прогресије болести што је условило изучавање механизма резистенције на мале молекуле у класи *TKI*. Велики проценат механизма резистенције односи се на резистенцију ћелијске мете, односно постојање ново-настале резистенционе мутације која узрокује прогресију болести. Са друге стране резистенција ван ћелијске мете подразумева укључивање заобилазних путева који се односе најчешће на нисходне сигналне путеве и заобилазе промене у доменима мембранских или трансмембранских рецептора. Познајући механизам резистенције могуће је одабрати најадекватнији тип следеће линије терапије и донекле предвидети клинички ток болести. Резистенција *EGFR* *TKI* је у 60% случајева *T790M* резистенциона мутација за коју су дизајнирани осимертиниб и лазертиниб као трећа генерација *EGFR* *TKI*. У значајном броју случајева резистенција на трећу генерацију *EGFR* *TKI* је *C797S* за коју се тренутно развијају лекови четврте генерације (75, 76).

Код прве генерације *ALK* *TKI* познат је значајан број резистенционих мутација које могу бити осетљиве на другу или трећу генерацију а клинички се *ALK* *TKI* резистенционе мутације најчешће карактеришу појавом метастаза у мозгу. Секундарне

ALK мутације се појављују у око 50% случајева резистенције на II генерацију *ALK TKI* и најчешћа је *G1202R* где се лорлатиниб показао као једини ефикасан. *MET* амплификација је регистрована код 15% оних пацијената који прогредирају на *ALK TKI* код којих би можда комбинација лорлатиниб-а И *MET* инхибитора могла да буде терапијска опција (77).

Примена инхибитора имунолошких контролних тачака (енг: *Immune check-point inhibitors, ICI*) је променила парадигму лечења пацијената са локално узнапредовалим и метастатским *NSCLC*. Тако је Пембролизумаб направио невероватне резултате у популацији пацијената са експресијом *PD-L1* >50% што је готово удвостручило укупно преживљавање пацијената са *NSCLC* у поређењу са хемиотерапијом, са преко 30% пацијената који су живи након 5 година праћења (78). Такође, на основу резултата бројних студија, комбинација хемиотерапије и *ICI* у првој линији лечења код *NSCLC* са *PD-L1* статусом < 50% даје добре резултате, па тако данас представља терапијски стандард (79-82).

Пацијенти који имају туморе без онкогене адикције и *PD-L1* негативне туморе су кандидати за примену класичне хемиотерапије базиране на платинском дублету. Како мање од 50% пацијената након прогресије добије другу линију лечења, прави избор комбинације је оно што је императив. Са појавом цитостатика треће генерације (таксани, винорелбин, гемцитабин), њихова комбинација са платинским дериватима је постала терапијски стандард, дајући предност цисплатинским у односу на карбоплатинске режиме током 4 или 6 циклуса терапије. Антиангиогенезни агенс - Бевацизумаб је моноклонско антитело против васкуларног ендотелијалног фактора раста, одобрен у комбинацији са хемиотерапијским дублетом паклитаксел-карбоплатина у првој линији лечења код пацијената са нересектабилним, локално узнапредовалим, рекурентним или метастатским несквамозним карциномом плућа (83). Његова примена се не препоручује код пацијената са патохистолошки верификованим сквамозним карциномом плућа због података о појави крварења (значајније хемоптизије, метастазама у мозгу, неконтролисана хипертензија и терапија антикоагулансима) (84).

1.8.1 Процена терапијског одговора – *RECIST* критеријуми

Основе критеријума за процену одговора на терапију код солидних тумора (енг: *Reponse Evaluation Criteria In Solid Tumors, RECIST*) су засноване на принципима мерљивости и броја лезија, као и у израчунавању збира дијаметара одабраних лезија. *WHO* је још 1981.године први пут објавила критеријуме за процену туморског одговора који су били превасходно намењени за коришћење у оквиру клиничких трајања. Средином деведесетих година прошлог века, формирана је интернационална радна група коју су чинили експерти неколико еминентних удружења (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer – EORTC, US National Cancer Institute, National Cancer Institute of Canada*) како би стандардизовала и поједноставила критеријуме за процену радиолошког одговора. Тако је 2000.године објављена прва верзија *RECIST* протокола означена као *RECIST 1.0*. (85). Најважније карактеристике *RECIST*-а укључују дефинисање минималног дијаметра мерљиве лезије, број лезија које се прате (до 10 лезија, максимум 5 лезија по органу) као и коришћење једнодимензионалног, пре него дводимензионалног, мерења за укупну процену туморског одговора. Након проспективних анализа истраживача уследила су бројна питања и недоумице везане за *RECIST 1.0*. критеријуме која су захтевала ревизију што је и учињено 2009.године, а како је основни приступ процени заснован на анатомској а не функционалној процени одговора, ревидирана верзија је означена као *RECIST 1.1*.

С обзиром да се ради о критеријумима који се односе на солидне туморе, сва упутства се односе искључиво на туморе мекоткивне грађе. На иницијално урађеном *MSCT* или *MRI* прегледу, туморске лезије и лимфни нодуси ће бити класификовани као мерљиве или као немерљиве лезије. Мерљиве туморске лезије морају бити оне чији се дијаметар може измерити у најмање једној димензији (бележи се најдужи дијаметар лезије). Лимфни нодуси који се узимају као таргет лезије су они који су патолошки измењени и мерљиви, чији је најкраћи дијаметар већи од 15 mm. На иницијалном *MSCT* или *MRI* прегледу, најкраћи дијаметар лимфног нодуса је дијаметар који се мери и који ће се проценивати током периода праћења. Када је на иницијалном *MSCT/MRI* прегледу присутно више мерљивих лезија, до највише пет укупно (максимум две по органу) туморских лезија ће бити идентификовано као таргет лезије које ће бити мерене.

Мале туморске лезије чији је најдужи дијаметар мерења <10 mm или патолошки измењени лимфни нодуси чији је најкраћи мерени дијаметар >10 mm али <15 mm су означени као немерљиве лезије. Оне укључују: лептоменингеалне метастазе, асцитес, плеурални и перикардни излив, лимфадитис (Табела 8).

Посебну пажњу треба обратити на цистичне лезије, коштане промене и лезије које су раније третиране локално радиотерапијом. *CT* и *PET-CT* су технике прегледа које се могу користити за доказивање присуства или одсуства коштаных метастаза, али се не сматрају адекватним за мерљивост коштаных лезија. Литичне или литично-бластичне лезије са мекоткивном компонентом описане на *MSCT/MRI* прегледу се могу означити као мерљиве ако се мекоткивна компонента по дефиницији *RECIST* 1.1. може сврстати у мерљиве лезије, док се само бластичне лезије сврставају у немерљиве лезије. Цистичне промене радиографски описане као “просте цисте” се не сматрају малигним лезијама, док се цистичне лезије које се презентују као цистичне метастазе могу сматрати мерљивим лезијама. Тумор у регији раније примењиване радиотерапије се не сматра мерљивом лезијом све до радиографски верификоване прогресије.

Табела 8. Мерљиве и немерљиве лезије на иницијалном *CT/MRI* прегледу

Лезија	Дијаметар	Опис
Тумор	Дужи дијаметар	>10 mm на <i>CT</i> прегледу при пресецима до 5mm >20 mm на Rtg прегледу
Мерљиве лезије	Малигно измењени лимфни нодус	Краћи дијаметар >15 mm
Немерљиве лезије	Друге лезије	Дужи и краћи дијаметар
Обухвата све мале лезије:		
1. Дужи дијаметар лезије <10 mm		
2. Лимфни нодуси чији је најкраћи мерени дијаметар >10 mm али <15 mm		
3. Лептоменингеалне метастазе, асцитес, плеурални и перикардни излив, лимфангитис		

Када се на иницијалном *CT/MRI* прегледу описује више од једне мерљиве лезије, највише пет лезија (максимално две по органу) се могу означити као таргет лезије.

Сума дијаметара (дужи дијаметар туморске лезије и краћи дијаметар лимфног нодуса који су означени као мерљиви) свих таргет лезија се узима као сума основа која ће се користити за процену одговора на примењени модалитет лечења.

Радиографски одговор таргет лезија на примењено лечење се може означити као (Табела 9):

- Комплетан одговор (енг: *Complete Response- CR*): Потпуни нестанак свих таргет лезија. Редукција краћег дијаметра лимфног нодуса на <10mm.
- Парцијални одговор (енг: *Partial Response – PR*) најмање 30% смањење суме дијаметара таргет лезија у односу на основни *CT* преглед
- Прогресија болести (енг: *Progressive Disease – PD*) најмање 20% повећање суме дијаметара таргет лезија у односу на најмање мерену суму током евалуације, узимајући у обзир и иницијални уколико је би то била најмања сума дијаметара. Повећање суме дијаметара за 20%, у апсолутним бројкама подразумева повећање од најмање 5 mm. Појава нових лезија се такође сматра прогресијом болести.
- Стабилна болест (енг: *Stable Disease –SD*) нема довољног смањења суме да би се означио *PR* нити довољног повећања за *PD*, опет поредећи са најмање мереном сумом током евалуације болести.

Радиографски одговор нон-таргет лезија на примењено лечење се може означити као:

- *CR*: Потпуни нестанак свих нон-таргет лезија. Сви лимфни нодуси морају бити непатолошки и дијаметра <10 mm.
- *NonCR/NonPD*: присуство једне и више нон-таргет лезија
- *PD*: прогресија постојећих нон-таргет лезија

Поставља се питање колико би често требало радити контролне *CT* прегледе у циљу адекватне евалуације болести. Препорука је да се праћење спроводи сваких 6-8 недеља. Пре започињања лечења се дефинишу органски системи који се прате, а то су углавном сва она места која су предилекциона за метастазирање у зависности од типа тумора. Изузетак могу бити метастатске промене на костима када се радиолошки прегледи понављају само у случају комплетног одговора праћене таргет лезије или када се сумња на прогресију промена на костима.

Табела 9. Радиолошки одговор на примењену терапију

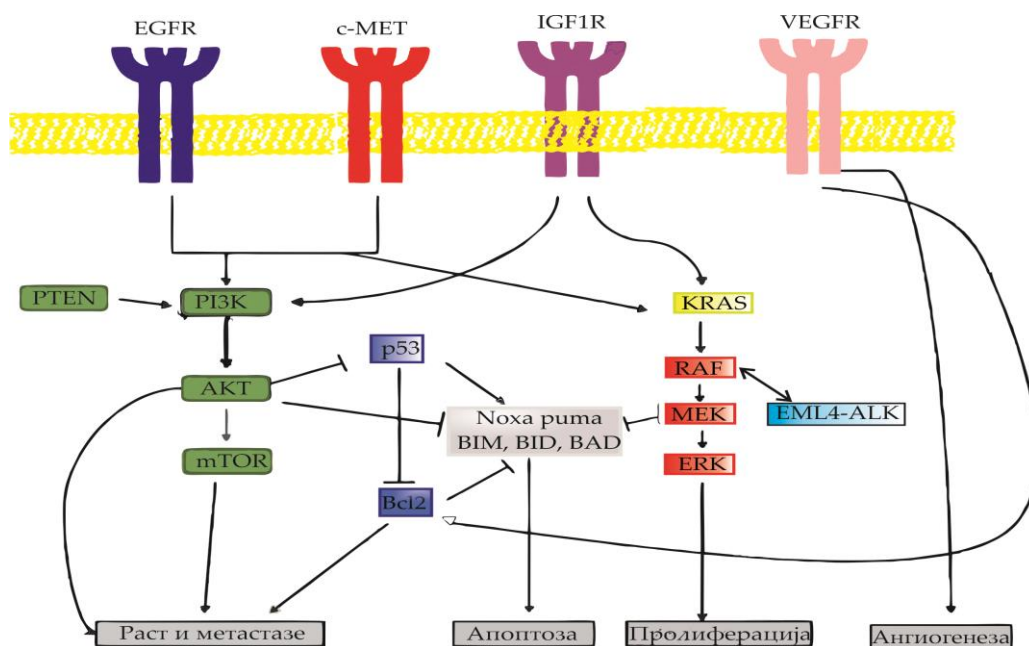
ТАРГЕТ ЛЕЗИЈЕ Промена суме дијаметара	НОН-ТАРГЕТ ЛЕЗИЈЕ	ПОЈАВА НОВИХ ЛЕЗИЈА	RECIST 1.1. Одговор
100% ↓	CR	Не	CR
100% ↓	NonCR/NonPD Или нису све евалуиране	Не	PR
≥ 30% ↓	Non-PD или нису све евалуиране	Не	PR
<30% ↓ или <20% ↑	Non-PD или нису све евалуиране	Не	SD
Нису све лезије евалуиране	Non-PD	Не	Без адекватне евалуације
≥20% ↑ и ≥5mm ↑	Било који одговор	Да или Не	PD
Било који одговор	PD	Да или Не	PD
Било који одговор	Било који одговор	Да	PD

1.9. Туморски биомаркери

1.9.1. Фактор раста васкуларног ендотела (eng: *Vascular endothelial growth factor-VEGF*)

Проналажење потенцијалних биомаркера анализом протеома представља основу за детекцију раних стадијума тумора али и за проналажење начина инхибиције канцерогенезе (86). Ангиогенеза, формирање нових крвних судова од претходно постојећих, есенцијална је за раст и развој ткива уопште. Малигна прогресија солидних тумора такође зависи од патолошке неоангиогенезе а *VEGF* је кључни медијатор овог процеса. *VEGF* је хомодимерни гликопротеин локализован на хромозому *6p21.1* и састоји се од осам егзона и седам интрона. Припада фамилији фактора раста која укључује *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и фактор раста плаценте (*PlGF*, енгл. *Placental Growth Factor*) (87).

Своје дејство остварује кроз интеракцију са два тирозин киназна рецептора *VEGFR1* и *VEGFR2* (енг: *Vascular endothelial growth factor receptor*- *VEGFR*) који су експримирани на ендотелним ћелијама крвних судова, али и на неендотелним ћелијама и ћелијама које потичу од раличитих типова тумора, укључујући и карцином плућа, учествујући тако у неоангиогенези која представља интегралан део канцерогенезе. Везујући се за рецептор, *VEGF* индукује димеризацију са последичном фосфорилацијом домена тирозин киназе и активацијом неколико сигналних протеина као што су *PI3K-Akt/mTORC2*, *Raf-MEK-MAPK* и *Src-FAK* сигнални пут, чиме се регулише пролиферација, преживљавање и миграција ћелија (88-90). Активација *MAP* киназног пута је одговорна за нео-ангиогенезу тумора плућа као предуслов његовог раста и метастазирања. Алтерација *K-ras/c-mos* онкопротеина, који су окидачи за хиперекспресију *MAPK*, у директној је корелацији са степеном ангиогенезе тумора и синтезом БЕГФ-а (91). Раст малигних тумора зависи од комплексних интеракција између тумора, имунолошког и хемостазног система. Макрофаги, фибробласти, адипоцити, тромбоцити, неутрофили, лимфоцити сарађују директно или индиректно са малигним ћелијама продукујући промоторе и/или инхибиторе ангиогенезе и фиброгенезе. У процесу компетиције проангиогених и антиангиогених фактора долази до ангиогеног окидача који за последицу има повећање продукције *VEGF*-а. Ова појачана експресија *VEGF* у туморском ткиву је последица многих фактора од којих је најзначајнији хипоксија која стабилизује и повећава експресију транскрипционог фактора *HIF-1α* (енг: *Hypoxia-inducible factor-1α*) а он стимулише транскрипцију *VEGF* који се лучи, дифундује кроз ткиво, доспева до ендотелних ћелија и везује се за специфичне рецепторе на њиховој површини (92, 93). Поред хипоксије, ниво *VEGF* експресије зависи и од фактора раста, онкогена и тумор супресор гена, па тако *c-Myc* транскрипциони фактор смањује ниво *VEGF* експресије у ћелијама карцинома плућа. Експресија епидермалног фактора раста (енг: *Epidermal growth factor* - *EGF*) је у корелацији са *VEGF* експресијом, преко активације преносиоца сигнала и активатора транскрипције – *STAT* молекули (енг: *Signal transducers and activators of transcription*) који имају важну улогу у карциногенези плућа, нарочито *STAT3* који је конститутивно активан вероватно активацијом *EGF* рецептора (94). Још један регулатор транскрипције - протеин одговора на рани фактор раста - *EGR-1* (*Early growth response-1*), припада групи тумор супресор гена чији ниво експресије расте у условима хипоксије везујући се за *VEGF* промотер и на тај начин се повећава ниво његове експресије (95). Мутација тумор супресорског гена *p53* је најранији догађај карциногенезе, присутна је код око 50% малигних болести код човека и повезује се са индукцијом ангиогенезе повећавајући експресију *VEGF*-а (96).



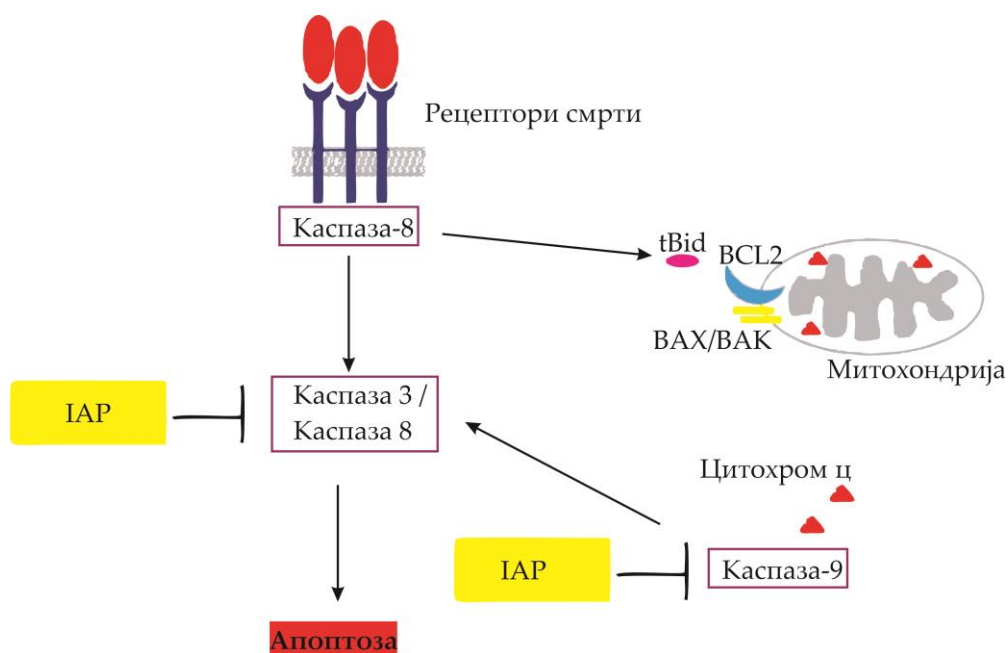
Слика 3. Молекуларни сигнални пут код карцинома плућа, адаптирано из *Abolfathi H, 2021* (86).

1.9.2. Ген за Б-ћелијски лимфом/хроничну лимфоцитну леукемију 2 (енг: *Human B-cell lymphoma/CLL2, Bcl-2*)

Апоптоза представља значајан механизам за одржавање хомеостазе организма. Овај јединствени процес праћен типичним морфолошким променама први је описао *Carl Vog* још 1842.године а назив апоптоза добија 1972.године (97). Битна карактеристика малигне трансформације - индукције и прогресије тумора, је управо блокирање апоптозе чиме се продужава живот ћелије. Индукција апоптозе се дешава кроз два главна пута- унутрашњи, који се активира ћелијским стресом као што су ДНК оштећења, недостатак хранљивих материја, оксидативни стрес и спољашњи пут, који се покреће активирањем лиганата смрти као везивањем различитих сигналних молекула за трансмембранске рецепторе смрти (*CD95/FAS/apo-1*) који припадају фамилији рцептора фактора туморске некрозе (енг: *Tumor Necrosis Factors – TNF*) или *Fas* (98). Индукција ових путева доводи до активације каспаза које се каскадно активирају протеолитичким цепањем, преносе сигнал и цепају субстрате са аспартатским киселинским остацима што последично доводи до ћелијске смрти. Неке од ових каспаза су иницијаторске (2,8,9,10,12) и оне започињу процес апоптозе, друге су ефекторске каспазе (3,6 и 7) одговорне за протеолитичку деструкцију ћелије, нарочито каспаза 3.

Губитак сталне стимулације за преживљавањем (цитокини, фактори раста, хормони) или деловање јонизујућег зрачења, цитостатици, хипоксија, вирусне инфекције, узрокују различита оштећења ДНК као што се дешава и у случају инактивације *p53* гена или изостанка репарације, што индукује апоптозу. Све ово доводи до промене интегритета унутрашње митохондријалне мембране што резултује отварањем пора митохондријалног транспорта губитком трансмембранског потенцијала митохондрија и ослобађањем про-апоптотичних протеина у цитосол (99). Проапоптотички протеини од значаја су Цитохром - Ц, *Smac/Diablo* (енгл. *Second mitochondria-derived activator of caspases*) и серин протеазе *HtrA2/Omi* (енгл. *Serine protease HTRA2, mitochondrial*). Цитохром-Ц се везује за апоптоза активирајући фактор 1 (*Apaf-1*) уз утршак енергије (енгл. *Adenosine triphosphate- ATP*) и активира

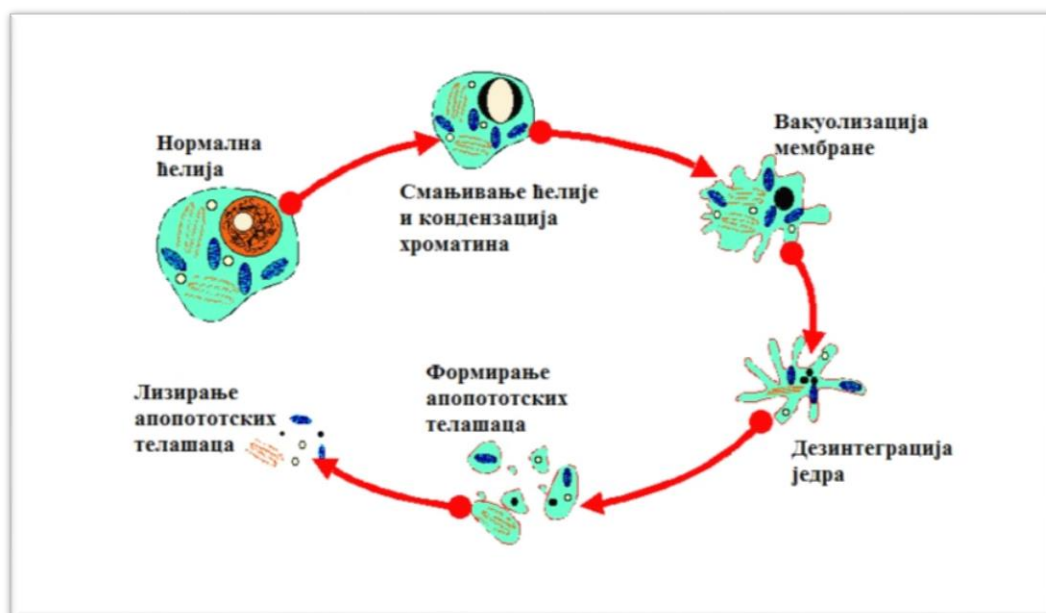
прокаспазу-9, формирајући апоптозом (100). Активна каспаза 9 активира читаву каспазну каскаду, почевши од протеолитичког цепања прокаспазе-3 и прокаспазе-7. Овако активирана каспаза-3 изазива деградацију ћелије након чега се формира апоптотско тело (101).



Слика 4. Схематски приказ сигналног апоптозног пута, адаптирано из *Vogel M*, 2014 (102).

Спољашњи сигнални пут је други начин покретања апоптозе и подразумева активацију лиганда смрти као што су *FasL/FasR*, *TNF- α /TNFR1*. Везивање лиганда смрти (*FasL*) за рецептор смрти (*FasR*) формира се комплекс *DISC* (енг. *death-inducing signaling complex*) који садржи домен *FADD* (енг. *Fas-Associated protein with Death Domain*), каспазу-8 и каспазу-10. Активирана каспаза 8 активира прокаспазу-3 и проапоптотски протеин *BID* који повезују спољашњи и унутрашњи пут апоптозе (103). Везивање лиганда *TNF* за *TNFR1* резултира везивањем протеина *TRADD* (енгл. *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) и активирањем *FADD* и *RIP* киназа (енгл. *Receptor-interacting protein kinases*) што последично доводи до активације прокаспазе 8 и следствене каскаде ефекторских каспаза (104, 105).

Све ово доводи до морфолошких промена у апоптотичној ћелији које су детектоване светлосном и електронском микроскопијом и на тај начин је омогућено диференцирање апоптозе од других облика ћелијске смрти. Најпре долази до губитка међућелијске повезаности, разарања ламина и актинских филамената са последичним смежувањем ћелије и пикнозе једра која је последица кондензације хроматина. Долази до дезинтеграције једарне мембране па једро добија облик потковице. Затим долази до инверзије ћелијске мембране и излагања фосфатидил-серина на спољашњој страни мембране. Смањује се цитоплазматски волумен, једро се фрагментира и огољава ДНК (Слика 5). На крају долази до бубрења ћелијске мембране и одвајања делова ћелије у апоптотска телашца која фагоцитишу суседне ћелије (106).



Слика 5. Морфолошке промене у апоптотичној ћелији

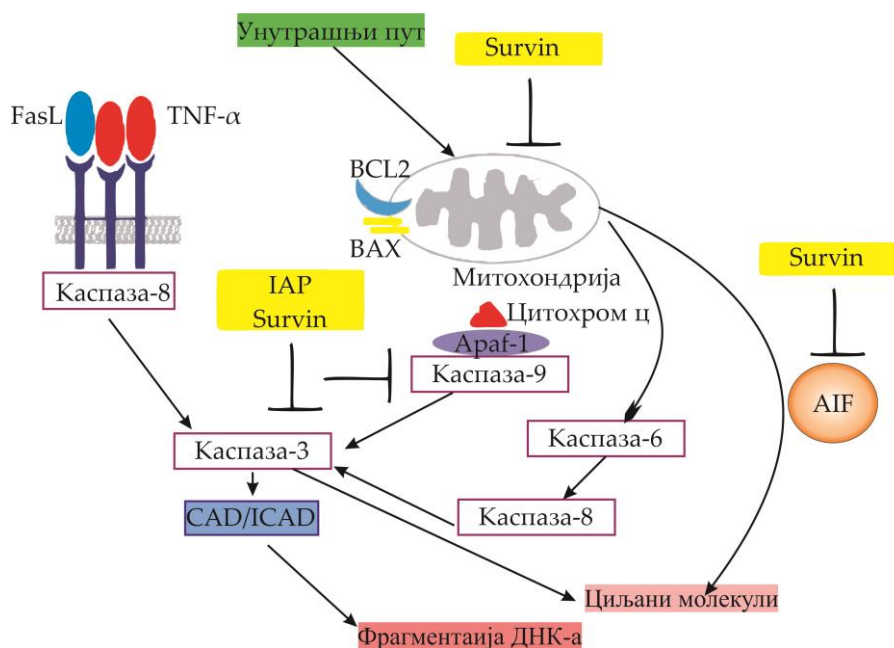
Малигна ћелија спречава апоптозу преко анти апоптотичних протеина *Bcl* фамилије гена. *Bcl-2* је први откривени онкопротеин који је интегрални мембрански протеин и игра кључну улогу у апоптози, делујући као инхибитор овог процеса. Иницијално је откривен код Б-ћелијских лимфома код којих је у 85% случајева експримиран као резултат транслокације 14. и 18. хромозома (107). Овај протеин је локализован на спољашњој мембрани митохондрије, ендоплазматском ретикулуму и једарном омотачу. Члан је фамилије гена у коју спадају још и проапоптотички гени чији се продукти могу поделити у две групе: 1. проапоптотски протеини са већим бројем домена (*Bak* и *Bax*) и 2. *BH-3* проапоптотски протеини - *Bid*, *Bad*, *Bim*, *Bmf*, *Noxa*, *Puma*, *Bnip3* и *Nix* (108). Сам међусобни однос *Bcl-2* и *Bcl-xL* према *Bax* и *Bak* детерминише да ли ће у ћелији преовладати проапоптотски или антиапоптотски сигнали (109, 110). Поремећај експресије *Bcl-2* гена повећава ниво *mRNA*, продужава живот ћелије, на тај начин доводи до акумулирања мутација и реаранжирања онкогена. Такође, *Bcl-2* протеин интеракцијом са протеинима као што је транскрипциони фактор *Twist1*, који није на директан начин укључен у метаболизам митохондрија, може да утиче на миграцију, инвазију и метастазирање (111).

Прекомерна експресија *Bcl-2* гена је уочена и код појединих солидних тумора као што су неоплазме дебелог црева (90%), гастроинтестиналног тракта (60%), карцинома простате (30%) и меланома (112, 113). У овим туморима експресија *Bcl-2* је добар прогностички индикатор, што делује као парадокс обзиром да је његова основна функција инхибиција апоптозе (114, 115). Такође, показано је да оболели од *NSCLC* са експресијом *Bcl-2* имају бољу прогнозу у односу на оне без *Bcl-2* експресије што негде није у складу са биолошком функцијом *Bcl-2* протеина. Како *Bcl-2* супримира пролиферативну активност туморских ћелија, показано је да *Bcl-2* позитивни тумори имају мању пролиферативну активност у односу на *Bcl-2* негативне туморе. Друго могуће објашњење боље прогнозе *Bcl-2* позитивних *NSCLC* је способност *Bcl-2* да инхибира ДНК репликацију и репарацију. Узимајући све ово у обзир, *Bcl-2* би могао бити један од корисних прогностичких маркера (116, 117). Са друге стране, експресија *Bcl-2* је повезана са прогресијом тумора укључујући појаву метастаза у јетри код колоректалног карцинома и лимфоваскуларну инвазију код троструко - негативног карцинома дојке (118-121). Прекомерна *Bcl-2* експресија се повезује са узнапредовалим

и слабо диферентованим туморима као и са резистенцијом на примењено лечење (122-124).

1.9.3. Сурвивин

Сурвивин, код људи кодиран геном *BIRC5*, припада фамилији протеина инхибитора апоптозе (*Inhibitor of apoptosis* - IAP), први пут је откривен 1997.године (125), високо специфичан за фетално ткиво и углавном није присутан у дефинитивно диферентованим ћелијама одраслих људи (126). Из тих разлога представља потенцијално добар таргет за лечење различитих карцинома јер би се на тај начин могла направити разлика између нормалне и трансформисане ћелије. Сурвивин је мали молекул ког чине 142 аминокиселине и један од првих пет откривених гена специфичних за тумор (127). Сурвивин ген је лоциран на хромозому 17q25 (128). Све изоформе сурвивина у себи садрже само један *N*- терминални домен *IAP* понављања (*BIR*) заједно са *C*- терминалним α -хеликсом (129). Експресија овог протеина највиша у G2-М фази ћелијског циклуса. Игра важну улогу и у канцерогенези тако што регулише митозу и ангиогенезу, инхибира апоптозу, регулише цитогенезу и прогресију ћелијског циклуса, учествује у различитим сигналим путевима као што су *p53* (130), *WNT* (131), хипоксија (132), *TGF*, *Notch* сигнални пут (133). *IAP* инхибирају апоптозу директном или индиректном инхибицијом каспаза (Слика 6). Фосфорилација сурвивина на треонину 34 је кључна за његову антиапоптотичку функцију.



Слика 6. Схематски приказ Сурвивин сигналног апоптозног пута, адаптирано из *Jaiswal et al* , 2015 (134).

Истраживања су показала да експресија сурвивина у туморским ћелијама доводи до ослобађања *VEGF* чиме је индукована ангиогенеза и на тај начин доказана позитивна корелација експресије сурвивина и *PI3K/Akt* повећане експресије β -Катенин-*Tcf/Lef* што последично доводи до секреције *VEGF* и ангиогенезе (135).

Експресија сурвивина је показана код различитих тумора, укључујући сквамозелуларни карцином једњака, хепатоцелуларни карцином, уротелијални карцином, туморе јајника, *NSCLC* и повезује се са лошом прогнозом (136-142).

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ

2.1. Хипотезе студије:

1. Експресија *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина код узнатредовалог *NSCLC* се разликује у односу на хистолошки тип;
2. Експресија *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина код узнатредовалог *NSCLC* у корелацији је са једногодишњим и двогодишњим преживљавањем.

2.2. Циљеви студије:

1. Испитати експресију *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина у исечку туморског ткива *NSCLC* добијеног бронхоскопијом
2. Анализирати корелацију експресије *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина у *NSCLC* са патохистолошких параметрима тумора (хистолошки тип, хистолошки градус, митотски индекс)
3. Анализирати однос експресије *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина у *NSCLC* са клиничким параметрима испитиваних болесника (старост, пол, *TNM* стадијум болести, локализација метастаза)
4. Испитати корелацију експресије *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина у *NSCLC* са одговором на примењене протоколе лечења
5. Утврдити стопу преживљавања испитиваних болесника након две године праћења и њену повезаност са експресијом *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина у *NSCLC*.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

У складу са циљевима истраживања спроведена је клиничко-експериментална, неинтервентна студија.

3.2. Популација која се истражује

Комплетно испитивање је било спроведено у Центру за онкологију, Служби за патолошко-анатомску дијагностику и Клиници за плућне болести Универзитета Крагујевац, у периоду од 2017. до 2020. године. протокол истраживања је одобрио Етички одбор Универзитета Крагујевац, одлуком број 01-12751/2016. Пацијенти су за своје учешће у истраживању дали писани информисани пристанак, након детаљних студијских информација. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (енгл. *Good Clinical Practice, GCP*) и Хелсиншке декларације (енгл. *The World Medical Association (WMA), Declaration of Helsinki*). Планирано је испитивање 216 болесника са патохистолошки потврђеним *NSCLC* (аденокарцином, сквамозелуларни карцином, аденосквамозни карцином), који према *TNM* класификацији припада нересектабилном (IIIa, IIIb и IV стадијуму).

Сви испитаници су били груписани у две групе:

1. Група А: IIIa + IIIb стадијум – пацијенти који су били лечени комбинованом хемио и зрачном терапијом, односно биолошком терапијом;
2. Група Б: IV стадијум- који су били лечени хемиотерапијом +/- палијативном радиотерапијом, односно биолошком терапијом.

Процена ефекта терапије се спроводила након свака два циклуса лечења.

3.3. Узорковање

У истраживање су били укључени сви пацијенти са дијагнозом узнапредовалог *NSCLC*. Праћени су током двогодишњег периода од дана постављене дијагнозе болести.

Критеријуми за укључивање:

1. опште стање пацијента према скали од 0 до 5 Источне кооперативне онколошке групе (енг: *Eastern Cooperative Oncology Group - ECOG*);
2. узнапредовали *NSCLC* (нересектабилни IIIa, IIIb и IV клинички стадијум) према међународној *TNM* класификацији;
3. одлука Онколошког конзилијума за плућа да се лечење болесника започне применом биолошке, хемиотерапије или комбинацијом хемио и радиотерапије;

Критеријуми за искључивање:

1. постојање малигнитета других локализација;
2. хистолошки доказан микроцелуларни карцином плућа;
3. ресектабилан *NSCLC* (I, II и ресектабилни IIIa клинички стадијум према међународној *TNM* класификацији);
4. опште стање пацијента према *ECOG* скали 3-4;
5. одлука Онколошког конзилијума за плућа да се у лечење болесника примени симптоматска терапија или само палијативна зрачна терапија због коморбидитета који искључују примену хемиотерапије;

3.4. Варијабле које се мерење у студији

Независне варијабле

1. Социо-демографске карактеристике испитаника: пол, старост, придружене болести, социо-економски статус;
2. Клинички биохемијски параметри: комплетна крвна слика, гликемија, уреа, креатинин, АСТ, АЛТ, АЛП, ГГТ, директни и индиректни билирубин, електролити (*Na*, *K*, *Ca*) у Централној лабораторији КЦ Крагујевац;
3. Стандардна постеро-антериорна и профилна радиографија плућа и срца;
4. Електрокардиограм (ЕКГ) урађен на 12 каналном ЕКГ апарату;
5. Ехотомографија абдомена;
6. Компјутеризована томографија грудног коша и горњег абдомена, а по потреби и други расположиви дијагностички поступци у циљу адекватног одређивања стадијума болести (позитронска емисиона томографија, сцинтиграфија костију, компјутеризована томографија или магнетна резонанца централног нервног система, плеурална пункција, пункција перикарда итд.)

Зависне варијабле

1. Бронхоскопија;
2. Патохистолошка анализа тумора: хистолошки тип, величина, хистолошки градус, митотски индекс, патолошки *TNM* стадијум;
2. Експресија *VEGF*, *bcl-2* и сурвивина - испитивана имунохистохемијском анализом, а одређивана семиквантитативном методом. Имунохистохемијска анализа ће се радити у Центру за патологију УКЦ Крагујевац;
3. Процена одговора на спроведено лечење према *RECIST* критеријумима;

3.5. Методе

У овом истраживању су коришћени узорци ткива добијени бронхоскопијом и *VATS* хирургијом. Као метод су коришћени стандардни, хистоморфолошки *H&E* метод и имунохистохемија. Из Историја болести су преузети лични и демографски подаци пацијената (пол, старост, занимање, навике, коморбидитети, породична анамнеза и тд.), резултати радиолошке дијагностике, подаци о примењеним протоколима лечења, као и резултати *EGFR* анализе добијени *PCR* методом у локалним референтним лабораторијама.

3.5.1. *H&E* метод

На рутински, *H&E* обојеним препаратима узорака тумора, микроскопском анализом су одређивани класични параметри *NSCLC*: хистолошки тип, хистолошки и нуклеарни градус, митотски индекс, степен некрозе и стромалне-моноклеарне реакције.

3.5.2. Имунохистохемијски метод

Пресеци ткива дебљине 3 микрона, претходно фиксираног 24 сата у 10% неутралном, пуферизованом формалину и укалупљеног у парафинске блокове су монтирани на високо адхерентне плочице, депарафинисани и рехидратисани. Након ослобађања епитопа и блокирања ендogene пероксидазе, препарати ткива су инкубирани са примарним мишјим моноклонским антителима *VEGF* (клон ВГ1; разблажење 1:100) и *Bcl-2* (клон 100/D5, разблажење 1:50), након испирања и са секундарним антителом, на

собној температури према препорукама произвођача (*ThermoFisher Scientific, USA*). Реакција је визуализована 3,3-диаминобензидин-тетрахлоридом (*DAB*), контрастирање Мајеровим хематоксилином, а финално монтирање и препокривање плочица *Canada* балсамом. Квалитет имунохистохемијске реакције је праћен истовременим тестирањем унутрашњих и спољашњих, негативних и позитивних ткивних контрола. Припремљени имунохистохемијски препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Axioskop 40, Carl Zeiss, Germany*), а репрезентативна поља сликана дигиталном камером (*AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Germany*). Сва имунохистохемијска бојења су изведена уз спољашњу контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола према пропозицијама *NordiQC (Nordic Immunohistochemical Quality Control)*

3.5.3. Анализа имунохистохемијских препарата

Имунохистохемијску анализу су изводила независно два истраживача, без упознавања са клиничким подацима испитиване популације. Код препарата са различито добијеним вредностима, коначан резултат је потигнут консензусом.

Цитоплазматска експресија *VEGF* је одређивана семиквантитативним методом, као производ процента позитивних туморских ћелија и интензитета реакције, према препорукама Клеина и сарадника (143). Процентуална експресија тј. број *VEGF* позитивних на 100 избројаних туморских ћелија је сврставана у 4 категорије: 0 - одсуство имунореактивности, 1 <30%, 2- 31--60% и 3 >61% имунореактивности, док је интензитет бојења градиран као: 0- одсуство бојења, 1- слабо; 2 – средње и 3- јако бојење. Множењем ових вредности *VEGF* експресија у свим узорцима *NSCLC* је скорована од 1 до 9. Дефинисана је гранична вредност (*cut off*) на основу које су тумори подељени на оне са ниском и високом *VEGF* експресијом (144).

Експресија *Bcl-2* је одређивана као проценат позитивних туморских ћелија, не узимајући у обзир интензитет реакције. Као позитивни *NSCLC* тумори дефинисани се они у којима $\geq 10\%$ ћелија експримира *Bcl-2* маркер (145).

Пролиферациони индекс тумора је одређиван као број једара која експримирају *Ki-67* на 100 избројаних туморских ћелија тј. изражаван је процентом. На основу добијених вредности, сви *NSCLC* су сврставани у две групе, оне са ниским пролиферативним индексом, код којих је *Ki-67* био мањи од 30% и групу *NSCLC* са високим *Ki-67* индексом (већим од 30%).

3.6. Процена терапијског одговора

Иницијални одговор на спроведено лечење процењиваће се након другог и након четвртог циклуса хемиотерапије, на основу радиографски детектованих туморских лезија, компјутеризоване томографије грудног коша, контролног ендоскопског налаза, ехосонографског прегледа абдомена и других промена (ширина жлезде мерљива у две димензије и др.).

1. CR: потпуно ишчезавање клинички мерљиве болести за период од најмање 4 недеље.
2. PR: смањење мерљивих лезија за најмање 30% у највећем дијаметру и без појаве нових за 4 недеље.
3. PD: прогресија постојећих промена за 20% у мерљивој величини, појава нових или поновна појава раније ишчезлих промена.
4. SD: је одређена када не постоје јасни критеријуми да се болест одреди као комплетан или парцијални одговор, односно прогресија болести.

3.7. Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је помоћу *G*Power 3.1.5 (FranzFaul, UniversitätKiel, Germany)* програма, за $\alpha = 0,05$ и снагу студије = 0,8 за χ^2 тест. Задовољавајућа величина узорка у студији, по задатим критеријумима била би $n=216$.

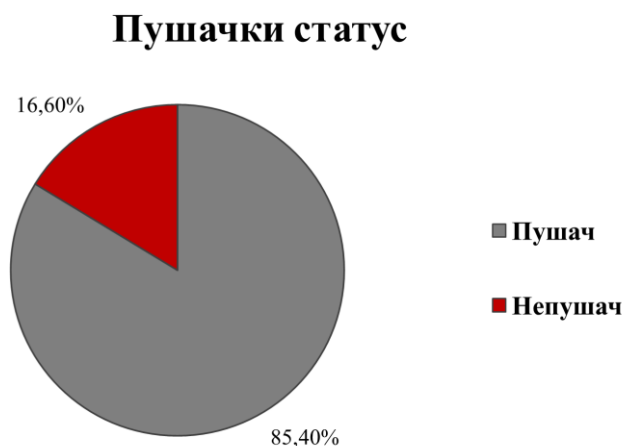
3.8. Статистичка анализа

Комплетна статистичка анализа података урађена је у статистичком програму *SPASS* верзија 20 (*IBM SPSS Statistici 22, Armonk, NY, USA*). Све атрибутивне варијабле су представљене у облику учесталости и фреквенци појединих категорија, а статистичка значајност између категорија је тестирана Хи-квадрат тестом, односно *Fisher*-овим тестом тачне вероватноће. Све континуиране варијабле су представљене у облику медијане и интерквartilног ранга. Нормалност расподеле је тестирана *Kolmogorov-Smirnov* тестом. Пошто варијабле нису пратиле нормалну расподелу, за утврђивање разлике у континуираним варијаблама између две групе коришћен је *Man-Whitney* тест, а када је утврђивана разлика између више од две групе коришћен је *Kruskal-Wallis*-ов тест. Корелација између варијабли испитивана је помоћу *Spearman*-ове корелације. Преживљавање болесника је приказано помоћу *Kaplan Meier*-ових кривих, док се поређење између група спроводило помоћу лог ранк теста. Утицај потенцијалних фактора ризика на преживљавање испитиван је униваријантном и мултиваријантном *Cox* регресионом анализом исказаном као *HR* са 95% интервалом поверења. Све анализе су процењене на нивоу статистичке значајности од $p \leq 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

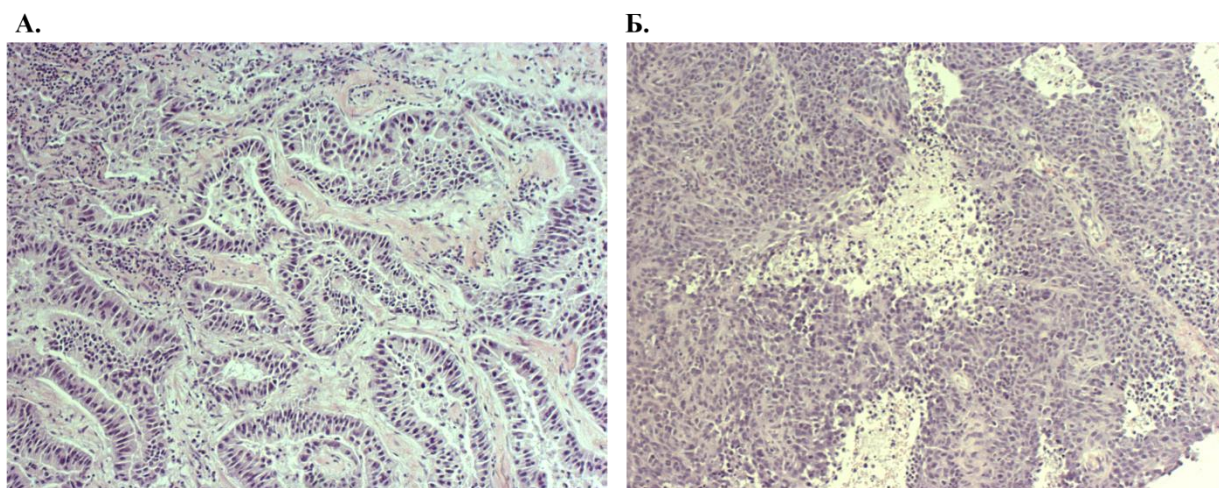
4.1. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената

Ово истраживање обухватило је укупно 216 пацијената са узнапредовалим и метастатским неситноћелијским карциномом плућа (*NSCLC*), при чему је 151 (69,9%) пацијент био мушког, а њих 65 (31,1%) женског пола. Просечна старост пацијената била је 64 године при чему је најмлађи пацијент имао 36 а најстарији 80 година. Највећи проценат пацијената, односно њих 176 (81,5%) долазило је из града, док је 40 (18,5%) пацијената долазило са села. Укупно 176 (85,4%) пацијената су били пушачи, док је 30 (16,6%) пацијената спадало у групу непушача (Фигура 1).



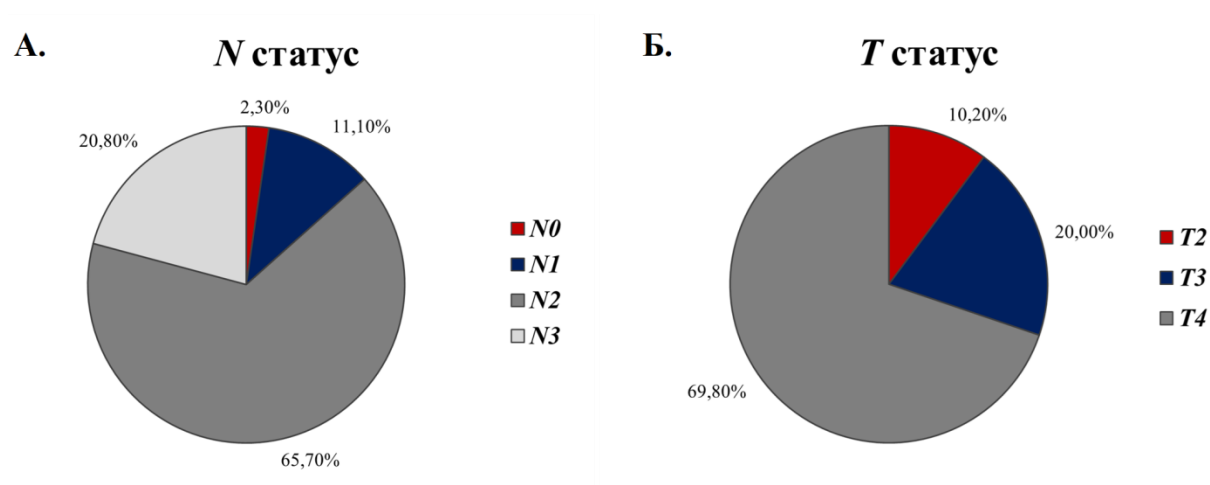
Фигура 1. Учесталост *NSCLC* према пушачком статусу. Сви пацијенти су у односу на пушачки статус подељени на пушаче (n=176) и непушаче (n=30).

У односу на тип ћелија, 135 (62,5%) је имало аденокарцином док је сквамозни карцином био заступљен код 81 (37,5%) пацијента. Хистолошки, аденокарциноми се презентују псеудогландуларном грађом, а тумори сквамозне диференцијације показују солидну грађу са цитоплазматском еозинофилијом (Фигура 2).



Фигура 2. Микроморфолошки приказ А. Аденокарцинома и Б. Сквамозног карцинома плућа (хематоксилин&еозин бојење, оригинално увећање x200)

У односу на нодални статус, највећи број пацијената, односно њих 142 (65,7%) је спадао у групу *N2*, док је у погледу *T* статуса највећи број пацијената, њих 150 (69,8%), имао параметре по којима су сврстани у *T4* категорију (Фигура 3).



Фигура 3. Учесталост NSCLC према *N* и *T* статусу. А. Према *N* статусу NSCLC пацијенти су подељени на *N0* (n=5), *N1* (n=24), *N2* (n=142) и *N3* (n=45). Б. Према *T* статусу NSCLC пацијенти су подељени на *T2* (n=22), *T3* (n=43) и *T4* (n=150).

Што се тиче хистолошког градуса, 172 (83,5%) пацијента су имала висок хистолошки градус. У односу на стадијум болести, 145 (67,1%) пацијената је било у IV стадијуму болести, док је 71 (32,9%) било у нересектабилном, III стадијуму болести. Остале клиничко-патолошке карактеристике NSCLC пацијената приказане су у Табели 10.

Табела 10. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената

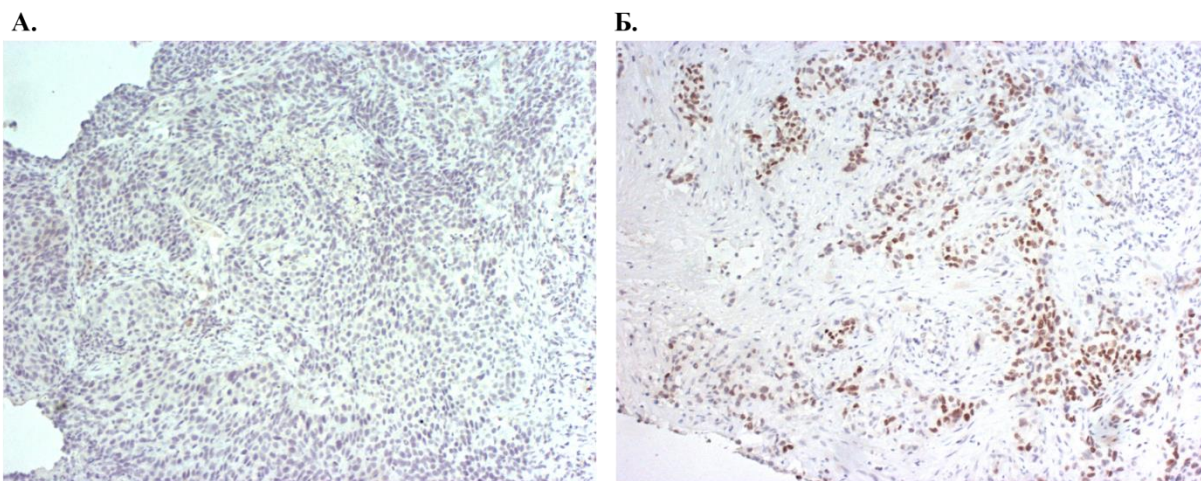
КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	БРОЈ СЛУЧАЈЕВА	ПРОЦЕНТУАЛНА ЗАСТУПЉЕНОСТ
Хистолошки градус		
Низак	34	16,5%
Висок	172	83,5%
Стадијум болести		
III	71	32,9%
IV	145	67,1%
Стромална моноклеарна реакција		
Слаба реакција	36	28,8%
Умерена реакција	33	26,4%
Јака реакција	56	44,8%
Коморбидитети на плућима		
Нема коморбидитета	143	71,9%
Има коморбидитета	56	28,1%
Коморбидитети ван плућа		
Нема коморбидитета	13	7,0%
Један коморбидитет	89	47,6%
Два коморбидитета	13	7,0%
Три коморбидитета	72	38,5%
Најбољи одговор		
SD	99	56,6%
PR	76	43,4%

У Табели 11 приказана је учесталост *NSCLC* пацијената са аденокарциномом у односу на експресију фактора тироидне транскрипције 1 (*TTF1*) и рецептор епидермалног раста (*EGFR*).

Табела 11. Учесталост пацијената у односу на *TTF1* и *EGFR*

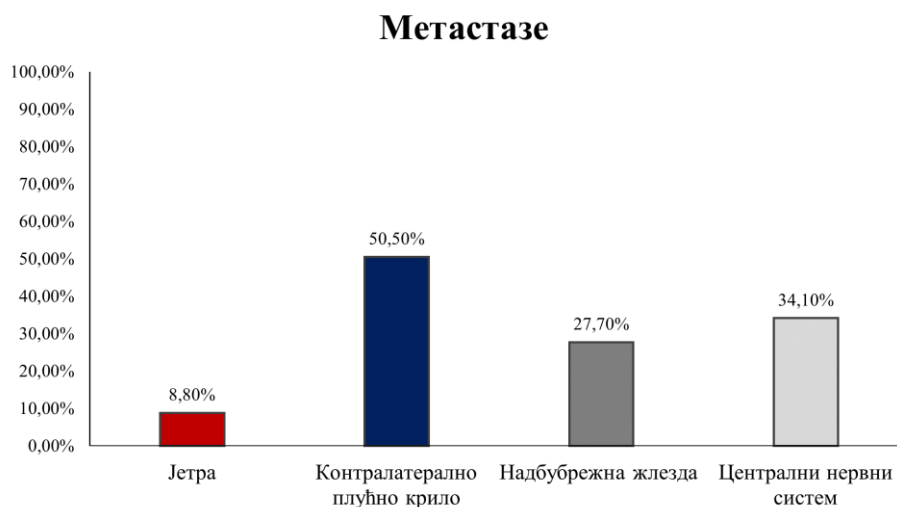
	БРОЈ СЛУЧАЈЕВА	ПРОЦЕНТУАЛНА ЗАСТУПЉЕНОСТ
<i>TTF1</i>		
Негативно	11	11,3%
Позитивно	86	88,7%
<i>EGFR</i>		
Дивљи тип	88	86,3%
Мутације	14	13,7%

TTF1 је, уз *p40*, саставни део имунохистохемијског дијагностичког панела за доказивање жлездане диференцијације *NSCLC* (Фигура 4).



Фигура 4. Хистоморфолошки приказ А. *TTF1* негативног сквамозног карцинома и Б. *TTF1* позитивног аденокарцинома (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x200)

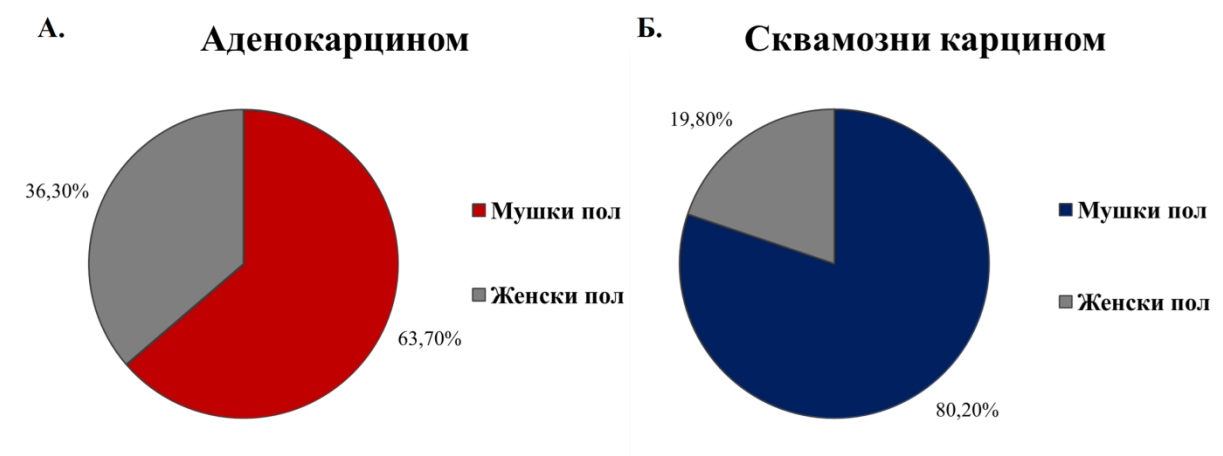
Метастазе у контралатералном плућном крилу су биле присутне код највећег броја пацијената односно код њих 50,5%, док је учесталост *NSCLC* пацијената у односу на то да ли имају метастазе у јетри, надбубрежној жлезди или централном нервном систему приказана на Фигури 5.



Фигура 5. Учесталост метастаза код *NSCLC* пацијената. Од укупног броја пацијената (n=216) заступљеност метастаза у јетри (n=18), у контралатералном плућном крилу (n=103), на надбубрежној жлезди (n=56) и централном нервном систему (n=58) је приказана као проценат пацијената који су имали метастазе на одговарајућем органу.

4.2. Клиничко-патолошке карактеристике у односу на хистолошки тип карцинома плућа

Када су посматране групе *NSCLC* пацијената у односу на хистолошки тип карцинома плућа, није показана статистички значајна разлика између сквамозног и аденокарцинома у погледу старости, при чему је просечна старост код сквамозног карцинома била $63,25 \pm 7,779$, а код аденокарцинома $62,19 \pm 8,864$ ($p=0,316$). Статистички значајна разлика је постојала у односу на пол код ових пацијената ($p=0,016$) (Фигура 6)



Фигура 6. Учесталост пола према хистолошком типу карцинома плућа. А. Заступљеност мушког ($n=86$) и женског ($n=49$) пола код аденокарцинома ($n=135$) приказана је као проценат. **Б.** Заступљеност мушког ($n=65$) и женског пола ($n=16$) код сквамозног карцинома ($n=67$) приказана је као проценат.

Аденокарцином и сквамозни карцином плућа су се разликовали у заступљености пушачког статуса ($p=0,005$), T статуса ($p=0,030$), N статуса ($p=0,002$), као и коморбидитета у оквиру ($p=0,000$) и ван плућа ($p=0,016$). Хистолошки градус ($p=0,835$), стадијум болести ($p=0,079$), стромална моноклеарна реакција ($p=0,064$) и најбољи одговор пацијената ($p=0,585$) се нису значајно разликовали код пацијената са аденокарциномом и сквамозним карциномом (Табела 12).

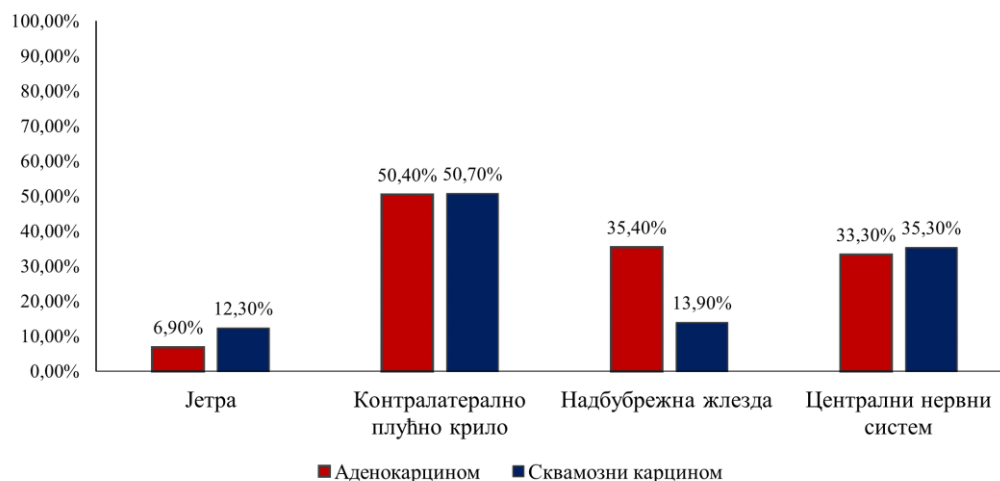
Табела 12. Повезаност хистолошког типа карцинома плућа и клиничко-патолошких карактеристика

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	АДЕНОКАРЦИНОМ број (%)	СКВАМОЗНИ КАРЦИНОМ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
Пушачки статус			
Пушач	74 (94,9%)	102 (79,7%)	7,802/0,005
Непушач	4 (5,1%)	26 (20,3%)	
Хистолошки градус			
Низак	12 (15,2%)	22 (17,3%)	0,043/0,835
Висок	67 (84,8%)	105 (82,7%)	
<i>T</i> статус			
<i>T</i> 2	5 (6,2%)	17 (12,7%)	7,023/0,030
<i>T</i> 3	23 (28,4%)	20 (14,9%)	
<i>T</i> 4	53 (65,4%)	97 (72,4%)	
<i>N</i> статус			
<i>N</i> 0	4 (4,9%)	1 (0,7%)	14,012/0,002
<i>N</i> 1	14 (17,3%)	10 (7,4%)	
<i>N</i> 2	54 (66,7%)	88 (65,2%)	
<i>N</i> 3	9 (11,1%)	36 (26,7%)	
Стадијум болести			
III	33 (40,7%)	38 (28,1%)	3,090/0,079
IV	48 (59,3%)	97 (71,9%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	13 (28,9%)	23 (28,7%)	5,512/0,064
Умерена реакција	17 (37,8%)	16 (20,0%)	
Јака реакција	15 (33,3%)	41 (51,2%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	43 (56,6%)	100 (81,3%)	13,001/0,000
Има коморбидитета	33 (43,4%)	23 (18,7%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	9 (13,0%)	4 (3,4%)	10,215/0,016
Један коморбидитет	29 (42,0%)	60 (50,8%)	
Два коморбидитета	8 (11,6%)	5 (4,2%)	
Три коморбидитета	23 (33,3%)	49 (41,5%)	
Најбољи одговор			
SD	39 (60,0%)	60 (54,5%)	0,298/0,585
PR	26 (40,0%)	50 (45,5%)	

Метастазе у јетри ($p=0,289$), контралатералном плућном крилу ($p=0,967$) и централном нервном систему ($p=0,921$) су биле у подједнакој мери заступљене код пацијената са аденокарциномом и сквамозним карциномом. Статистички значајна

разлика је постојала у учесталости присуства метастазе у надбубрежној жлезди, при чему су пацијенти са аденокарциномом значајно чешће имали присутну метастазу у надбубрежној жлезди у односу на пацијенте са сквамозним карциномом ($p=0,002$) (Фигура 7).

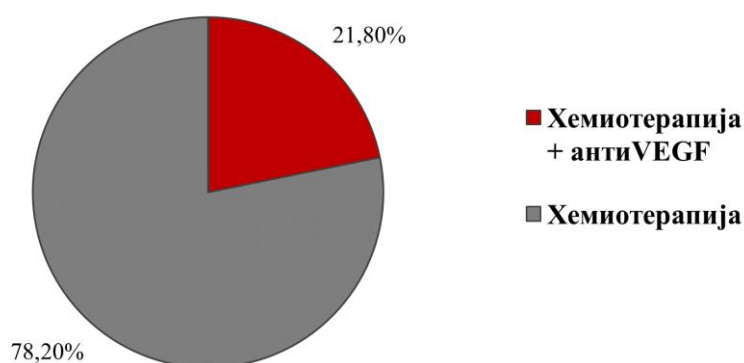
Метастазе у односу на тип карцинома



Фигура 7. Учесталост метастаза код NSCLC пацијената. Заступљеност метастаза у јетри ($n=9$), контралатералном плућном крилу ($n=37$), надбубрежној жлезди ($n=10$) и централном нервном систему ($n=24$) код сквамозног карцинома приказана је као проценат. Заступљеност метастаза у јетри ($n=9$), контралатералном плућном крилу ($n=66$), надбубрежној жлезди ($n=46$) и централном нервном систему ($n=34$) код аденокарцинома приказана је као проценат.

Учесталост NSCLC пацијената са аденокарциномом, код којих је укључена и антиVEGF терапија заједно са хемиотерапијом је приказана на Фигури 8.

Аденокарцином

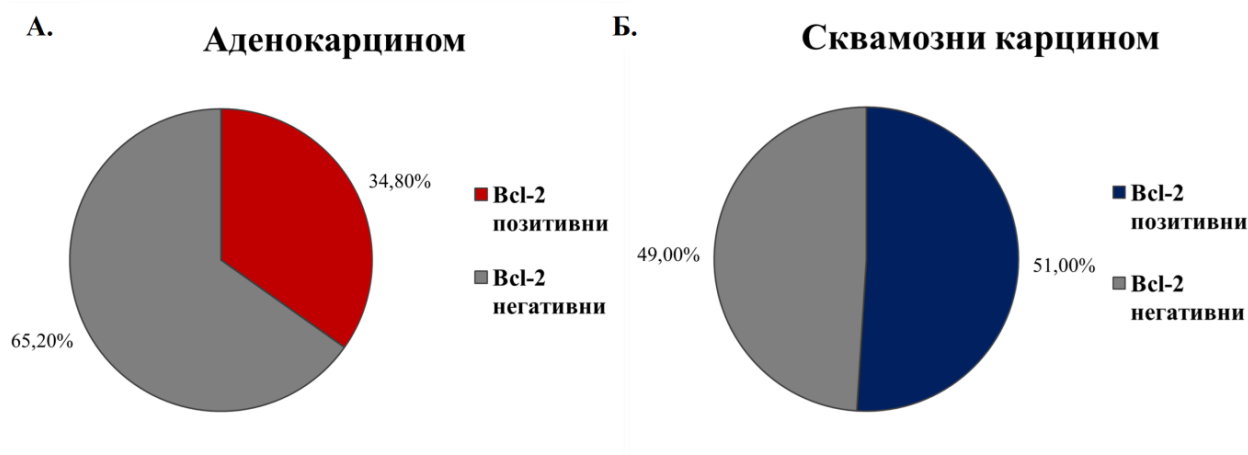


Фигура 8. Учесталост примене антиVEGF терапије код пацијената са аденокарциномом. Заступљеност примене антиVEGF терапије поред хемиотерапије ($n=47$) приказана је као проценат.

4.3. Анализа експресије Bcl-2

Просечна вредност експресије Bcl-2 износила је $18,40 \pm 25,783$ при чему је минимална експресија износила 0% а максимална 90%. Bcl-2 имунореактивност

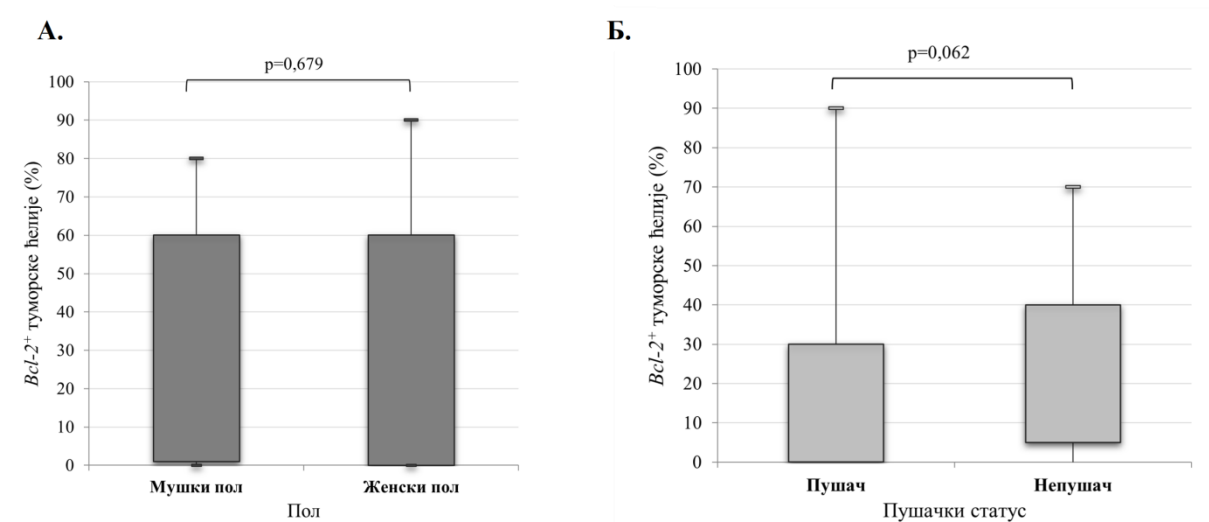
показало је 41,4% (69) *NSCLC*. Када су посматрани пацијенти у односу на хистолошки тип карцинома плућа, имунореактивност за *Bcl-2* је приказана на Фигури 9. Када су пацијенти посматрани у односу на стадијум болести, проценат имунореактивности за *Bcl-2* је код стадијума III износила 44,2%, док је код стадијума IV она била 40,7%.



Фигура 9. Учесталост позитивне имунореактивност за *Bcl-2* према хистолошком типу тумора. А. Заступљеност *Bcl-2* позитивних (n=35) код аденокарцинома (n=98) приказана је као проценат. Б. Заступљеност *Bcl-2* позитивних (n=34) код сквамозног карцинома (n=67) приказана је као проценат.

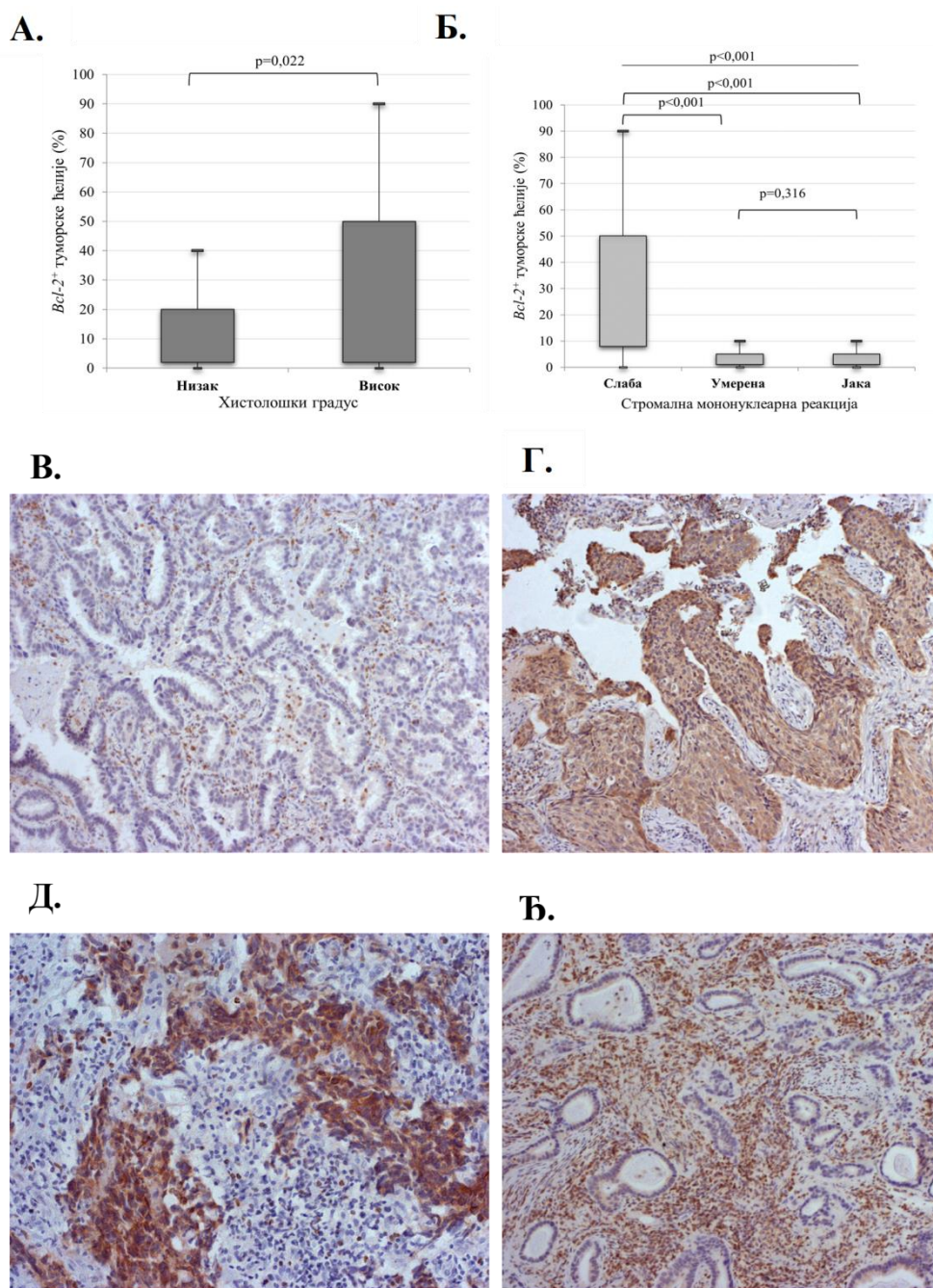
4.3.1. Повезаност експресије *Bcl-2* са клиничко-патолошким карактеристикама

Није показана статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на пол *NSCLC* пацијената ($p=0,679$) (Фигура 10А). Такође, статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* није постојала у односу на пушачки статус пацијента ($p=0,062$) (Фигура 10Б).



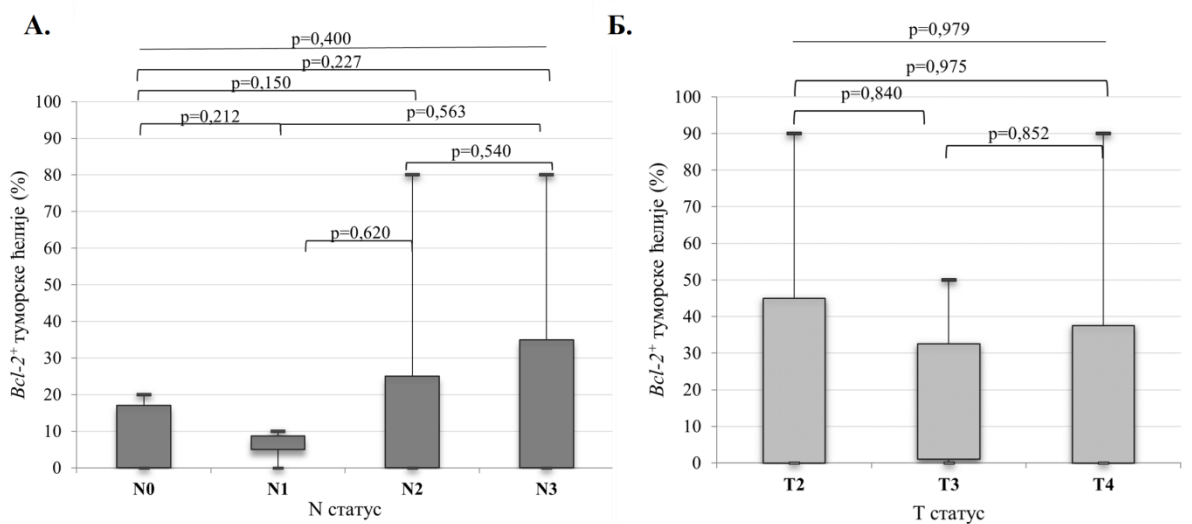
Фигура 10. Експресија *Bcl-2* у односу на пол и пушачки статус. А. Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на пол ($p=0,679$). **Б.** Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на пушачки статус ($p=0,062$).

Постојала је статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на хистолошки градус (Фигура 11А), при чему су пацијенти са вишим градусом (Фигура 11Д) имали веће вредности експресије *Bcl-2* у односу на добро диферентоване *NSCLC* хистолошког градуса I (Фигура 11В). Такође, пацијенти који су имали слабу стромалну моноклеарну реакцију, имали су статистички значајно веће вредности експресије *Bcl-2* у односу на оне са умереном или јаком стромалном моноклеарном реакцијом (Фигура 11Б, 11Г и 11Ђ).



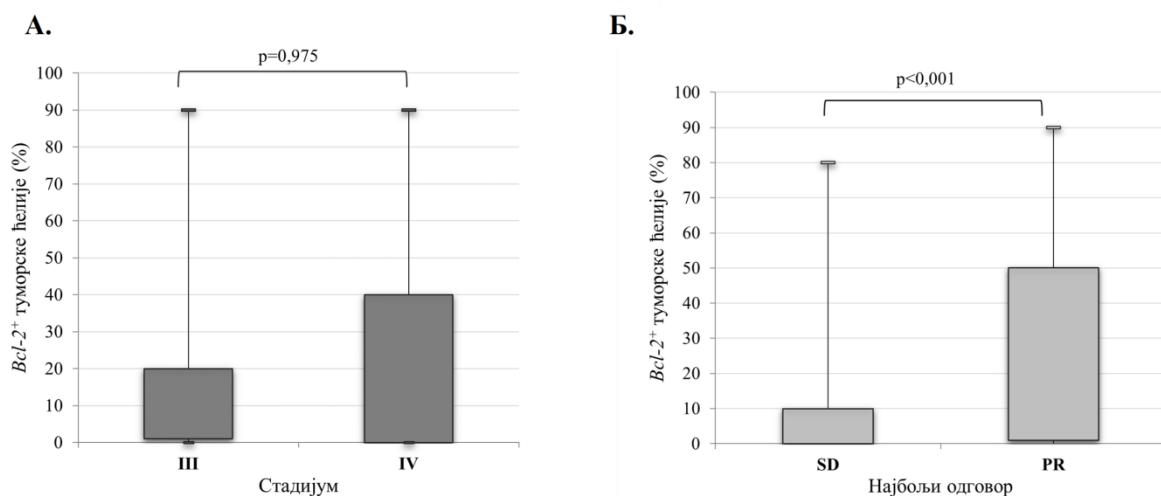
Фигура 11. Експресија *Bcl-2* у односу на хистолошки градус и стромалну мононуклеарну реакцију **А.** Постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на хистолошки градус ($p=0,022$) **Б.** Постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на стромалну мононуклеарну реакцију ($p<0,001$). Значајна разлика је уочена између група слаба и умерена ($p<0,001$), као и између група слаба и јака стромална мононуклеарна реакција ($p<0,001$). **Микроскопска слика експресије *Bcl-2* у В. добро и Д. слабо диферентованом NSCLC** (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x200). **Хистоморфолошки приказ експресије *Bcl-2* у NSCLC са Г. слабом и Ћ. израженом стромалном-мононуклеарном реакцијом** (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x200).

Није постојала статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на *N* ($p=0,400$) и *T* статус ($p=0,979$) код NSCLC пацијената (Фигура 12).



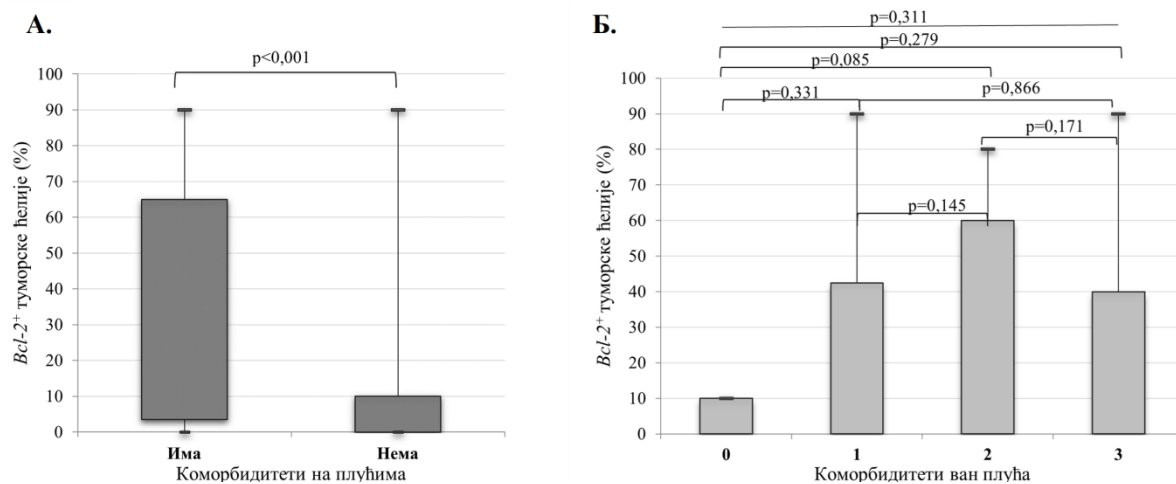
Фигура 12. Експресија *Bcl-2* у односу на *N* и *T* статус А. Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на *N* статус ($p=0,400$) Б. Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на *T* статус ($p=0,979$).

Није постојала статистички значајна разлика када је посматрана експресија *Bcl-2* у односу на стадијум болести NSCLC пацијената (Фигура 13А) ($p=0,975$). Статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* је постојала у зависности од најбољег одговора NSCLC пацијената (Фигура 13Б).



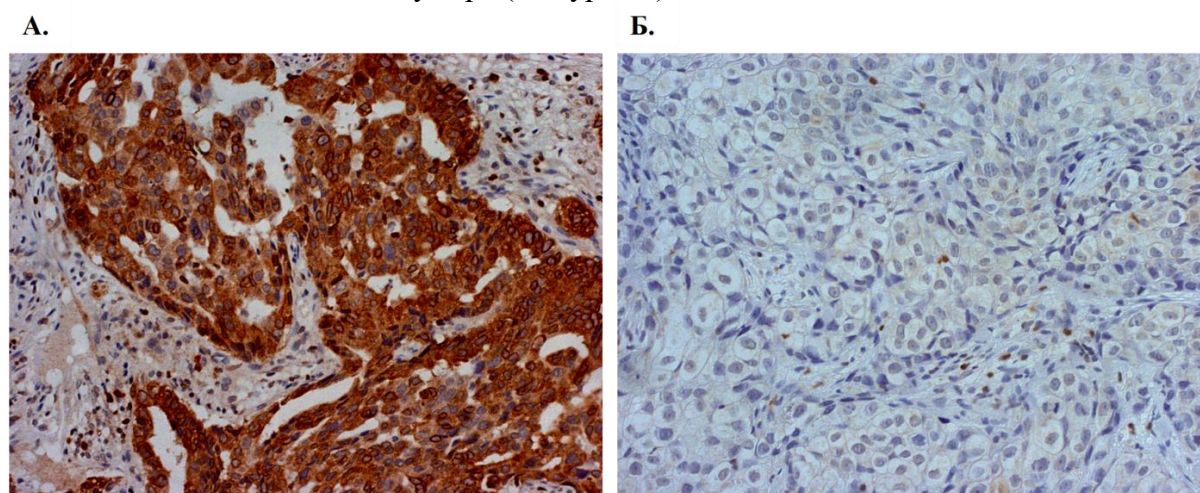
Фигура 13. Експресија *Bcl-2* у односу на стадијум болести и најбољи одговор пацијената. А. Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на стадијум болести ($p=0,975$). Б. Постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на најбољи одговор ($p<0,001$).

Виши ниво експресије *Bcl-2* је био заступљен код пацијената који су имали коморбидитете на плућима ($p<0,001$) (Фигура 14А). Значајна разлика није постојала када су посматрани пацијенти у односу на присуство коморбидитета ван плућа (Фигура 14Б) ($p=0,311$).



Фигура 14. Експресија *Bcl-2* у односу на присуство коморбидитета на плућима и ван плућа. А. Постоји статистички значајана разлика у експресији *Bcl-2* у односу на присуство коморбидитета на плућима ($p < 0,001$). **Б.** Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на коморбидитете ван плућа ($p = 0,311$).

На основу *cut off* (граничне) вредности од 10%, сви *NSCLC* су груписани на *Bcl-2* позитивне и *Bcl-2* негативне туморе (Фигура 15).



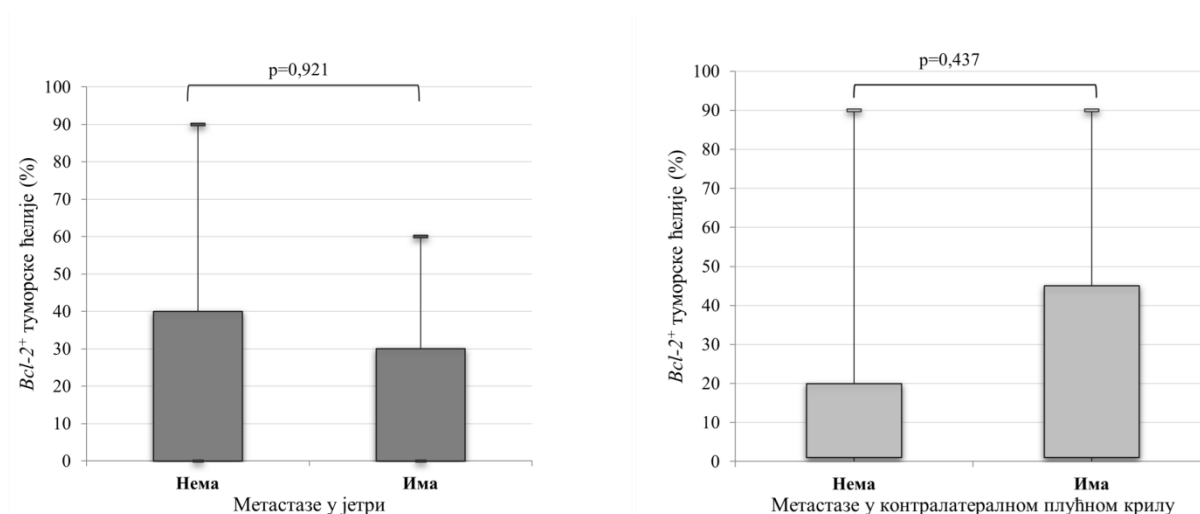
Фигура 15. Микроморфолошки приказ *Bcl-2* А. позитивног и Б. негативног *NSCLC* (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x400).

У Табели 13 приказана је повезаност експресије *Bcl-2* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика када су пацијенти на основу експресије *Bcl-2* подељени на *Bcl-2* позитивне и негативне.

Табела 13. Повезаност између експресије *Bcl-2* са клиничко-патолошким карактеристикама

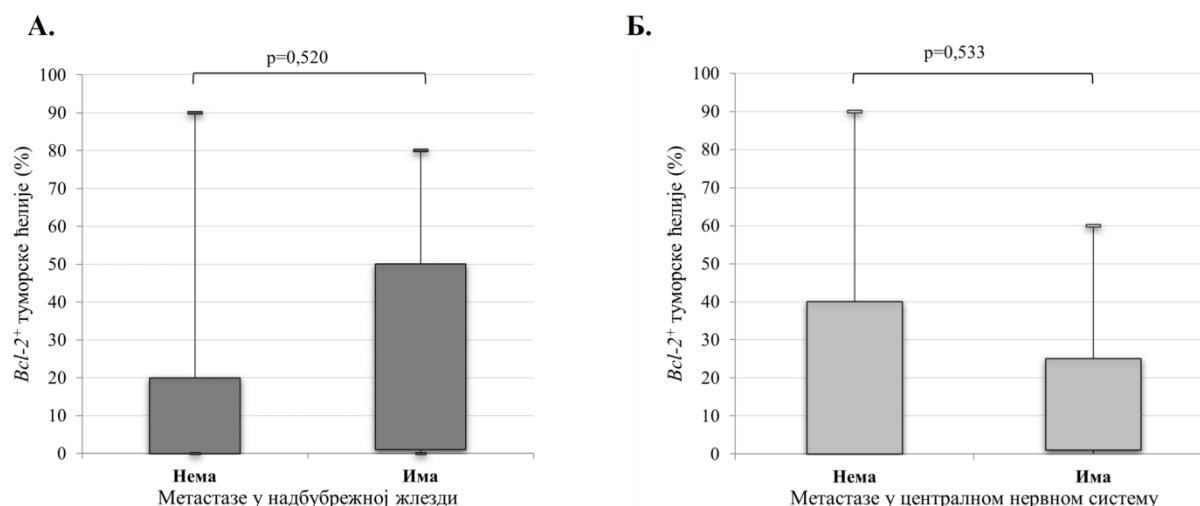
КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	<i>Bcl-2</i> НЕГАТИВНИ број (%)	<i>Bcl-2</i> ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
Пол			
Мушки	67 (69,8%)	49 (71,0%)	0,029/0,865
Женски	29 (30,2%)	20 (29,0%)	
Пушачки статус			
Пушач	86 (90,5%)	47 (78,3%)	3,544/0,060
Непушач	9 (9,5%)	13 (21,7%)	
Хистолошки тип			
Сквамозни карцином	33 (34,4%)	34 (49,3%)	3,104/0,078
Аденокарцином	63 (65,6%)	35 (50,7%)	
Хистолошки градус			
Низак	19 (19,8%)	7 (10,6%)	1,815/0,049
Висок	77 (80,2%)	59 (89,4%)	
<i>T</i> статус			
<i>T2</i>	12 (12,6%)	7 (10,1%)	0,433/0,805
<i>T3</i>	15 (15,8%)	13 (18,8%)	
<i>T4</i>	68 (71,6%)	49 (71,0%)	
<i>N</i> статус			
<i>N0</i>	3 (3,1%)	1 (1,4%)	2,731/0,458
<i>N1</i>	9 (9,4%)	3 (4,3%)	
<i>N2</i>	59 (61,5%)	50 (72,5%)	
<i>N3</i>	25 (26,0%)	15 (21,7%)	
Стадијум болести			
III	29 (30,2%)	23 (33,3%)	0,066/0,798
IV	67 (69,8%)	46 (66,7%)	
Стромална моноклеарна реакција			
Слаба реакција	9 (10,5%)	27 (69,2%)	45,256/0,000
Умерена реакција	28 (32,6%)	5 (12,8%)	
Јака реакција	49 (57,0%)	7 (17,9%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	74 (83,1%)	35 (56,5%)	11,674/0,000
Има коморбидитета	15 (16,9%)	27 (43,5%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	7 (8,0%)	3 (5,4%)	1,475/0,704
Један коморбидитет	41 (47,1%)	26 (46,4%)	
Два коморбидитета	5 (5,7%)	6 (10,7%)	
Три коморбидитета	34 (39,1%)	21 (37,5%)	
Најбољи одговор			
SD	46 (64,8%)	24 (40,7%)	6,599/0,010
PR	25 (35,2%)	35 (59,3%)	

Није показана статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у зависности од присуства метастаза у јетри ($p=0,921$), као и у контралатералном плућном крилу ($p=0,437$) (Фигура 16).



Фигура 16. Експресија *Bcl-2* у односу на присуство метастаза у јетри и контралатералном плућном крилу. А. Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на присуство метастаза у јетри ($p=0,921$). **Б.** Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на присуство метастаза у контралатералном плућном крилу ($p=0,437$).

Такође, није постојала статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у зависности од присуства метастаза у надбубрежној жлезди ($p=0,520$) и у централном нервном систему ($p=0,533$) (Фигура 17).



Фигура 17. Експресија *Bcl-2* у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди и централном нервном систему. А. Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди ($p=0,520$). **Б.** Не постоји статистички значајна разлика у експресији *Bcl-2* у односу на присуство метастаза у централном нервном систему ($p=0,533$).

4.3.2. Повезаност експресије *Bcl-2* са клиничко-патолошким карактеристикама у односу на хистолошки тип тумора

Када је испитивана повезаност експресије *Bcl-2* са клиничко-патолошким карактеристика само код пацијената са аденокарциномом, исти клиничко-патолошки параметри су показали статистички значајну повезаност као када су посматрани сви *NSCLC* пацијенти, при чему је додатна повезаност показана када је посматрано присуство коморбидитета ван плућа. Значајна разлика у односу на хистолошки градус је код пацијената са аденокарциномом изостала (Табела 14).

Табела 14. Повезаност експресије *Bcl-2* са клиничко-патолошким карактеристикама код пацијената са аденокарциномом

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	<i>Bcl-2</i> НЕГАТИВНИ број (%)	<i>Bcl-2</i> ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
Пол			
Мушки	38 (60,3%)	25 (71,4%)	0,774/0,389
Женски	25 (39,7%)	10 (28,6%)	
Пушачки статус			
Пушач	56 (85,5%)	19 (65,4%)	3,636/0,029
Непушач	9 (14,5%)	10 (34,5%)	
Хистолошки градус			
Низак	10 (15,9%)	4 (12,5%)	0,017/0,895
Висок	53 (84,1%)	28 (87,5%)	
<i>T</i> статус			
<i>T2</i>	8 (12,9%)	6 (17,1%)	2,525/0,280
<i>T3</i>	5 (8,1%)	6 (17,1%)	
<i>T4</i>	49 (79,0%)	23 (65,7%)	
<i>N</i> статус			
<i>N1</i>	4 (6,3%)	0 (0,0%)	3,203/0,160
<i>N2</i>	37 (28,7%)	26 (74,3%)	
<i>N3</i>	22 (34,9%)	9 (25,7%)	
Стадијум болести			
III	20 (31,7%)	11 (31,4%)	0,001/0,974
IV	43 (68,3%)	24 (68,6%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	6 (10,5%)	17 (74,0%)	31,348/0,000
Умерена реакција	13 (22,8%)	3 (13,0%)	
Јака реакција	38 (66,7%)	3 (13,0%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	49 (87,5%)	22 (68,8%)	4,593/0,032
Има коморбидитета	7 (12,5%)	10 (31,3%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	4 (6,9%)	0 (0,0%)	8,828/0,023
Један коморбидитет	22 (37,9%)	19 (73,1%)	
Два коморбидитета	4 (6,9%)	0 (0,0%)	
Три коморбидитета	28 (48,3%)	7 (26,9%)	
Најбољи одговор			
SD	31 (67,4%)	7 (24,1%)	13,131/0,000
PR	15 (32,6%)	22 (75,9%)	

Статистички значајна повезаност експресије *Bcl-2* и фактора тироидне транскрипције 1 (*TTF1*), као и рецептора епидермалног раста (*EGFR*) код *NSCLC* пацијената са аденокарциномом није показана. Такође, статистички значајна разлика у

експресији *Bcl-2* није показана у односу на то да ли су пацијенти као прву линије терапије уз хемиотерапију користили антиVEGF терапију или не (Табела 15).

Табела 15. Повезаност експресије *Bcl-2* и *TTF1* и *EGFR* код пацијената са аденокарциномом

	<i>Bcl-2</i> НЕГАТИВНИ број (%)	<i>Bcl-2</i> ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
<i>TTF1</i>			
Негативно	2 (3,8%)	3 (15,0%)	2,454/0,127
Позитивно	50 (96,2%)	17 (85,0%)	
<i>EGFR</i>			
Дивљи тип	47 (92,2%)	20 (76,9%)	3,333/0,079
Мутације	4 (7,8%)	6 (23,1%)	
Прва линија терапије			
Хемиотерапија	48 (76,2%)	20 (57,1%)	2,999/0,083
Хемиотерапија+антиVEGF	15 (23,8%)	15 (42,9%)	

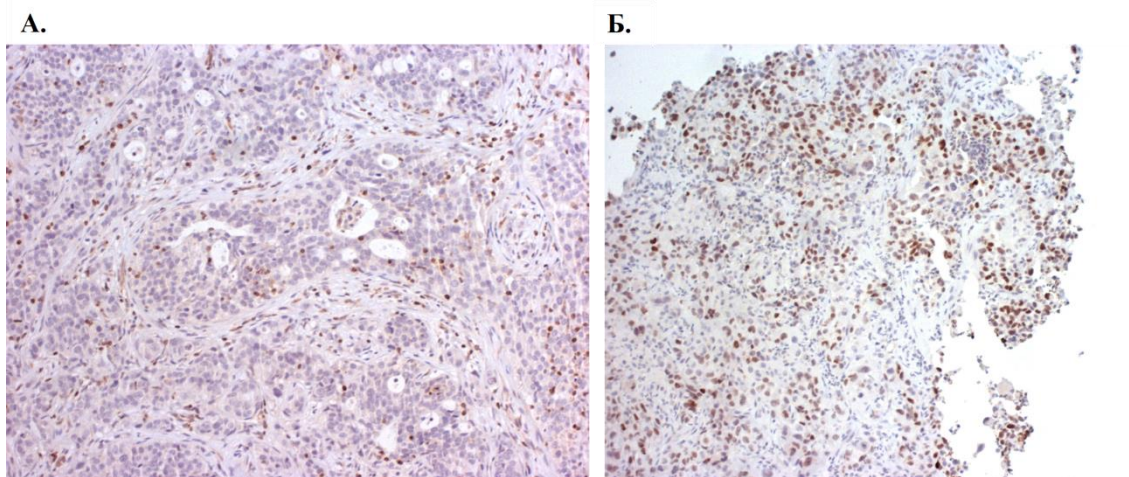
Хистолошки градус, стромална моноклеарна реакција и коморбидитети на плућима су се разликовали код *Bcl-2* позитивних и негативних пацијената у групи пацијената са сквамозним карциномом, што је такође показано када су посматрани сви *NSCLC* пацијенти. Насупрот томе, значајна разлика у најбољем одговору је код пацијената са сквамозним карциномом изостала, док је показана значајна повезаност у присуству коморбидитета ван плућа (Табела 16).

Табела 16. Повезаност *Bcl-2* са клиничко-патолошким карактеристикама код пацијената са сквамозним карциномом

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	<i>Bcl-2</i> НЕГАТИВНИ број (%)	<i>Bcl-2</i> ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
Пол			
Мушки	29 (87,9%)	24 (70,6%)	2,073/0,150
Женски	4 (12,1%)	10 (29,4%)	
Пушачки статус			
Пушач	33 (100,0%)	28 (90,3%)	1,535/0,215
Непушач	0 (0,0%)	3 (9,7%)	
Хистолошки градус			
Низак	9 (27,3%)	3 (8,8%)	3,877/0,049
Висок	24 (72,7%)	31 (91,2%)	
<i>T</i> статус			
<i>T2</i>	4 (12,1%)	1 (2,9%)	3,241/0,190
<i>T3</i>	10 (30,3%)	7 (20,6%)	
<i>T4</i>	19 (57,6%)	26 (76,5%)	
<i>N</i> статус			
<i>N0</i>	3 (9,1%)	1 (2,9%)	2,484/0,498
<i>N1</i>	5 (15,2%)	3 (8,8%)	
<i>N2</i>	22 (66,7%)	24 (70,6%)	
<i>N3</i>	3 (9,1%)	6 (17,6%)	
Стадијум болести			
III	9 (27,3%)	12 (35,3%)	0,197/0,657
IV	24 (72,7%)	22 (64,7%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	3 (10,3%)	10 (62,5%)	13,797/0,001
Умерена реакција	15 (51,7%)	2 (12,5%)	
Јака реакција	11 (37,9%)	4 (25,0%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	25 (75,8%)	13 (43,3%)	6,902/0,009
Има коморбидитета	8 (24,2%)	17 (65,7%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	3 (10,3%)	3 (10,0%)	12,162/0,004
Један коморбидитет	19 (65,5%)	7 (23,3%)	
Два коморбидитета	1 (3,4%)	6 (20,0%)	
Три коморбидитета	6 (20,7%)	14 (46,7%)	
Најбољи одговор			
SD	15 (60,0%)	17 (56,7%)	0,062/0,803
PR	10 (40,0%)	13 (43,3%)	

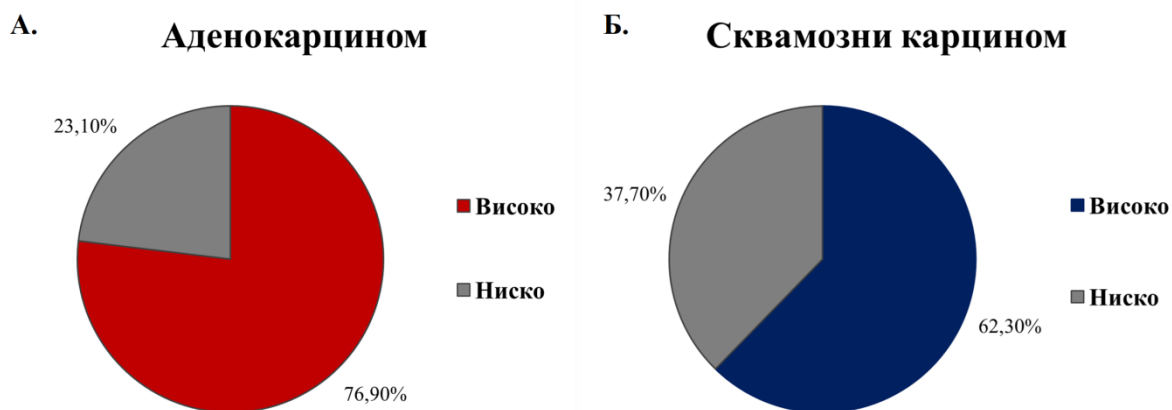
4.4. Анализа експресије Ki-67

Високе вредности пролиферативног индекса Ki-67 су биле заступљене код 71,1% (108) NSCLC, док су ниске вредности пролиферативног индекса Ki-67 биле заступљене код 28,9% (44) NSCLC пацијената (Фигура 18).



Фигура 18. Хистоморфолошки приказ NSCLC са А. ниским и Б. високим пролиферативним капацитетом (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x200)

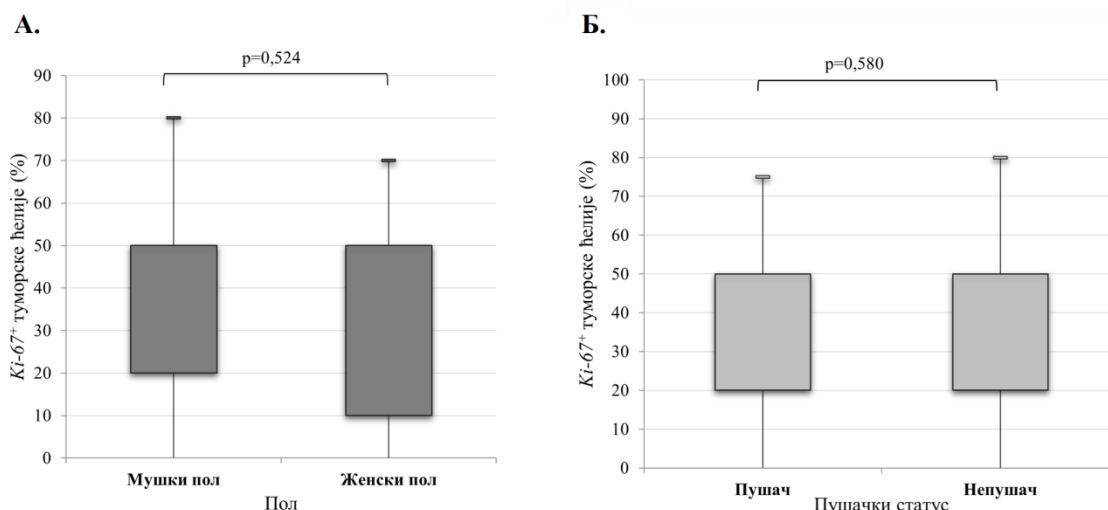
У просеку, вредност експресије Ki-67 је износила $38,48 \pm 17,986$. При том, најмања забележена вредност овог индекса је износила 10% а максимална 80%. У односу на хистолошки тип ћелија високе вредности пролиферативног индекса Ki-67 су биле заступљеније код аденокарцинома 76,9% (70) у односу на сквамозни карцином 62,3% (38) (Фигура 19).



Фигура 19. Учесталост високе вредности пролиферативног индекса Ki-67 према хистолошком типу ћелија. А. Учесталост високе вредности пролиферативног индекса Ki-67 (n=70) код аденокарцинома (n=91) приказана је као проценат. Б. Учесталост високе вредности пролиферативног индекса Ki-67 (n=38) код сквамозног карцинома (n=61) приказана је као проценат.

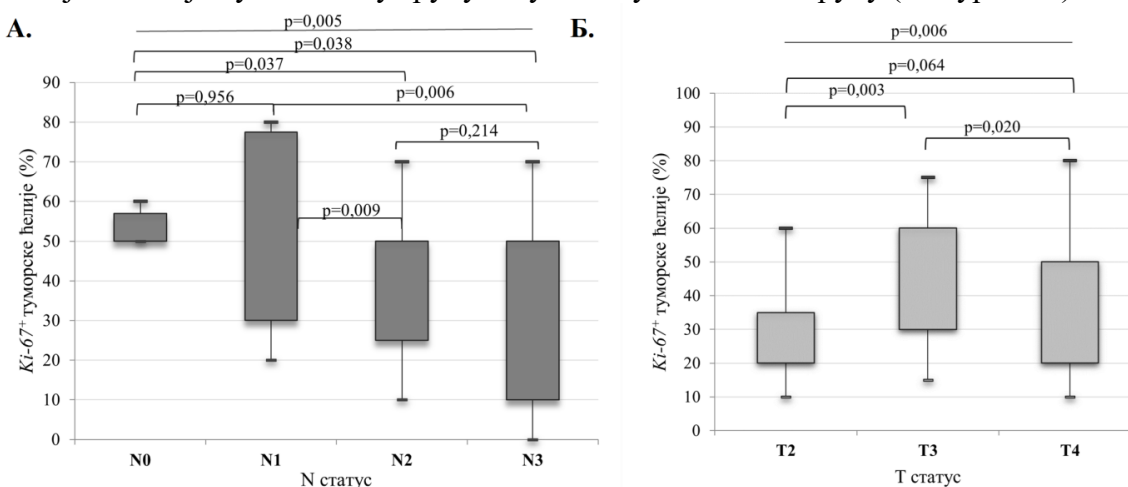
4.4.1. Повезаност Ki-67 са клиничко-патолошким карактеристикама

Не постоји статистички значајна разлика у вредности пролиферативног индекса Ki-67 у зависности од пола ($p=0,524$) (Фигура 20А) и пушачког статуса NSCLC пацијената ($p=0,580$) (Фигура 20Б).



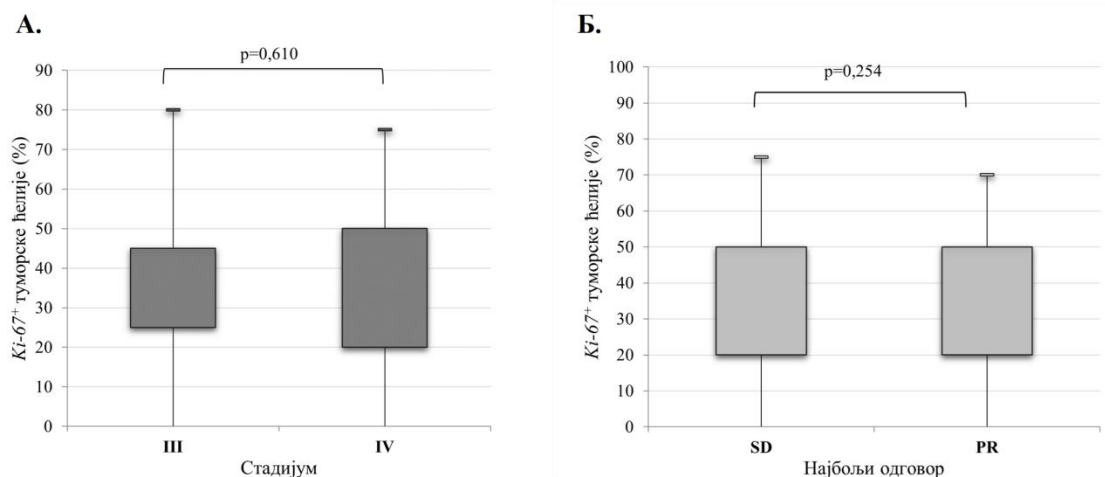
Фигура 20. Вредност $Ki-67$ у односу на пол и пушачки статус. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредности $Ki-67$ у односу на пол ($p=0,524$). Б. Не постоји статистички значајна разлика у вредности $Ki-67$ у односу пушачки статус ($p=0,580$).

Што се тиче N статуса, значајно већи ниво вредности пролиферативног индекса $Ki-67$ је био у групи $N0$ и $N1$ у односу на групе $N2$ и $N3$ (Фигура 21А). Статистички значајно већи ниво вредности пролиферативног индекса $Ki-67$ је показан код $NSCLC$ пацијената који су спадали у групу $T2$ у односу на $T1$ и $T3$ групу (Фигура 21Б).



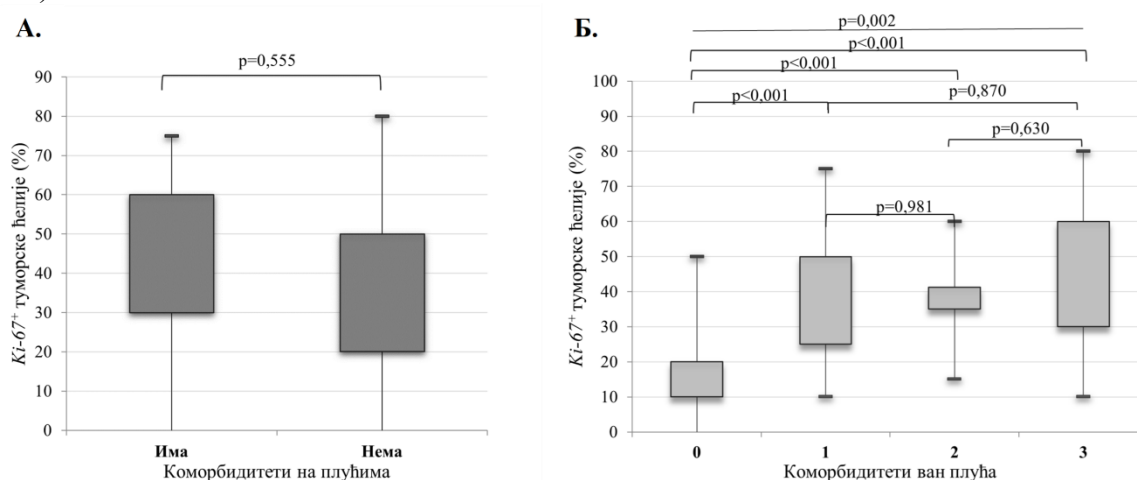
Фигура 21. Вредност $Ki-67$ у односу на N и T статус А. Постоји статистички значајна разлика у вредности $Ki-67$ у односу на N статус ($p<0,05$). Значајна разлика је уочена између група $N0$ и $N2$ ($p=0,037$), $N0$ и $N3$ ($p=0,038$), $N1$ и $N2$ ($p=0,009$) и група $N1$ и $N3$ ($p=0,006$). Б. Постоји статистички значајна разлика у вредности $Ki-67$ у односу на T статус ($p<0,05$). Значајна разлика је уочена између група $T2$ и $T3$ ($p=0,003$) и група $T3$ и $T4$ ($p=0,020$)

Значајна статистичка разлика није показана ни када је посматрана вредност пролиферативног индекса $Ki-67$ у односу на стадијум болести ($p=0,610$) (Фигура 22А) код $NSCLC$ пацијената, као ни у зависности од најбољег одговора ових пацијената ($p=0,254$) (Фигура 22Б).



Фигура 22. Вредност Ki-67 у односу на стадијум болести и најбољи одговор пацијената. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредности Ki-67 у односу на стадијум болести ($p=0,610$). Б. Не постоји статистички значајна разлика у вредности Ki-67 у односу на најбољи одговор ($p=0,254$).

Вредност пролиферативног индекса Ki-67 није се значајно разликовала код пацијената који су имали и оних који нису имали коморбидитете на плућима ($p=0,555$) (Фигура 23А). Статистички значајно мања вредност овог индекса уочена је код пацијената који нису имали ниједан коморбидитет ван плућа у односу на оне пацијенте који су имали један ($p<0,001$), два ($p<0,001$) или три коморбидитета ($p<0,001$) (Фигура 23Б).



Фигура 23. Вредност Ki-67 у односу на присуство коморбидитета на плућима и ван плућа. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредности Ki-67 у односу на присуство коморбидитета на плућима ($p=0,555$). Б. Постоји статистички значајна разлика у вредности Ki-67 у односу на коморбидитете ван плућа ($p=0,002$). Значајна разлика је уочена између групе без коморбидитета и пацијената са једним ($p<0,001$), два ($p<0,001$) или три коморбидитета ($p<0,001$).

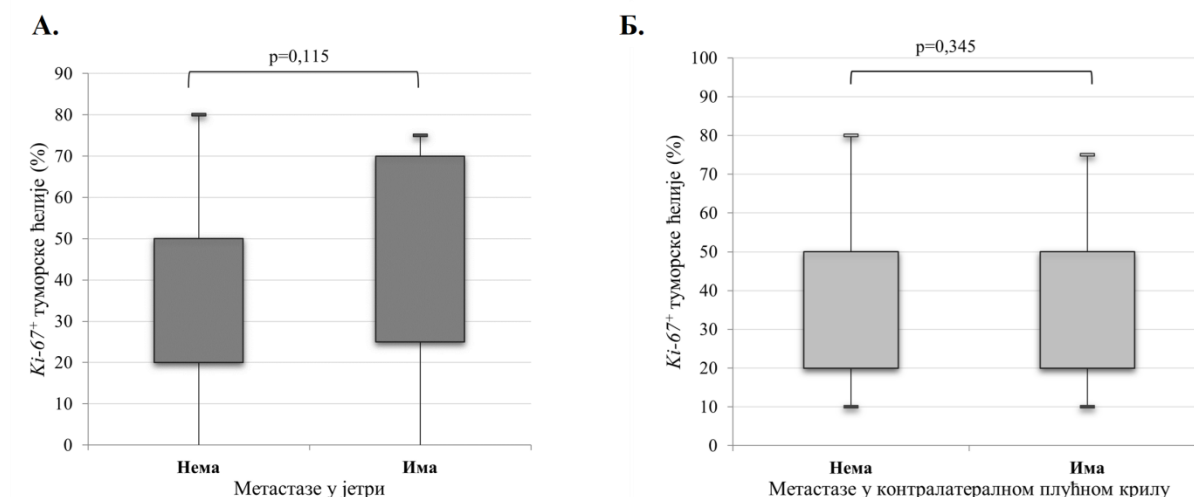
Повезаност вредности Ki-67 и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика када су пацијенти подељени на групе у односу на ниво вредности Ki-67 приказана је у Табели 17.

Табела 17. Повезаност између вредности *Ki-67* са клиничко-патолошким карактеристикама

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	Ki-67 НИЗАК ИНДЕКС број (%)	Ki-67 ВИСОК ИНДЕКС број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
Пол			
Мушки	30 (68,2%)	75 (69,4%)	0,023/0,879
Женски	14 (31,8%)	33 (30,6%)	
Пушачки статус			
Пушач	37 (84,1%)	89 (88,1%)	0,155/0,694
Непушач	7 (15,9%)	12 (11,9%)	
Хистолошки тип			
Сквамозни карцином	23 (52,3%)	38 (35,2%)	3,799/0,048
Аденокарцином	21 (47,7%)	70 (64,8%)	
Хистолошки градус			
Низак	9 (20,5%)	16 (15,4%)	0,263/0,608
Висок	35 (79,5%)	88 (84,6%)	
T статус			
T2	9 (20,5%)	11 (10,3%)	6,127/0,044
T3	3 (6,8%)	22 (20,6%)	
T4	32 (72,7%)	74 (69,2%)	
N статус			
N0	0 (0,0%)	4 (3,7%)	8,593/0,042
N1	1 (2,3%)	12 (11,1%)	
N2	26 (59,1%)	66 (61,1%)	
N3	17 (38,6%)	26 (24,1%)	
Стадијум болести			
III	13 (29,5%)	36 (33,3%)	0,069/0,793
IV	31 (70,5%)	72 (66,7%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	9 (36,0%)	21 (25,0%)	1,688/0,430
Умерена реакција	4 (16,0%)	22 (26,2%)	
Јака реакција	12 (48,0%)	41 (48,8%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	28 (75,7%)	72 (71,3%)	0,088/0,767
Има коморбидитета	9 (24,3%)	29 (28,7%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	9 (24,3%)	1 (1,0%)	24,135/0,000
Један коморбидитет	17 (45,9%)	47 (48,0%)	
Два коморбидитета	0 (0,0%)	9 (9,2%)	
Три коморбидитета	11 (29,7%)	41 (41,8%)	
Најбољи одговор			

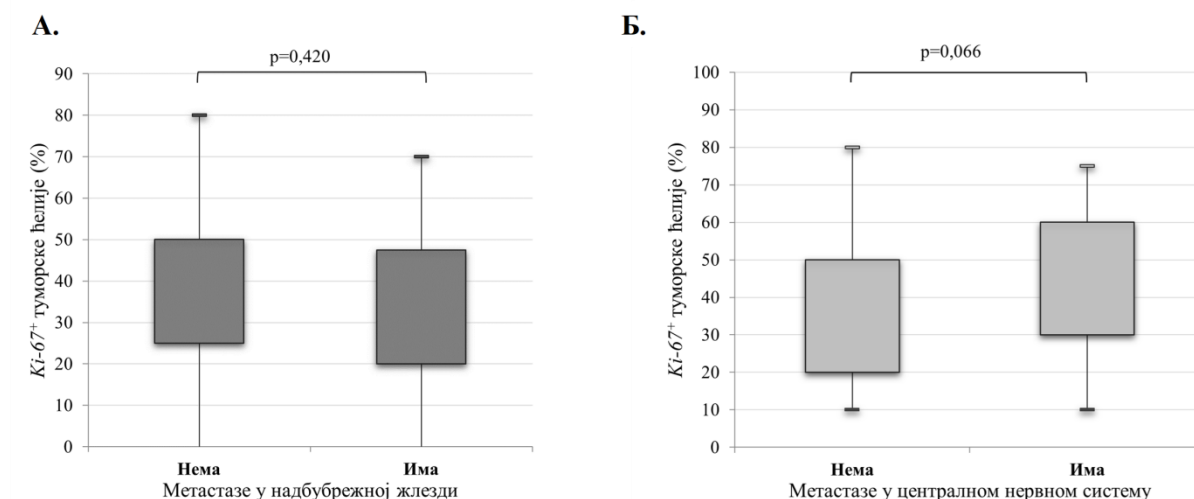
SD	18 (41,9%)	47 (57,3%)	2,116/0,146
PR	25 (58,1%)	35 (42,7%)	

Статистички значајна разлика у вредности пролиферативног индекса *Ki-67* у зависности од присуства метастаза у јетри ($p=0,115$) (Фигура 24А) и у контралатералном плућном крилу ($p=0,345$) (Фигура 24Б) није показана.



Фигура 24. Вредност *Ki-67* у односу на присуство метастаза у јетри и у контралатералном плућном крилу. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредности *Ki-67* у односу на присуство метастаза у јетри ($p=0,115$). Б. Не постоји статистички значајна разлика у вредности *Ki-67* у односу присуство метастаза у контралатералном плућном крилу ($p=0,345$).

Када су посматрани пацијенти у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди ($p=0,520$) и у централном нервном систему ($p=0,533$) (Фигура 25) није постојала статистички значајна разлика у вредности пролиферативног индекса *Ki-67*.



Фигура 25. Вредност *Ki-67* у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди и централном нервном систему. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредности *Ki-67* у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди ($p=0,420$). Б. Не постоји статистички значајна разлика у вредности *Ki-67* у односу на присуство метастаза у централном нервном систему ($p=0,066$).

4.4.2. Повезаност *Ki-67* са клиничко-патолошким карактеристикама у односу на хистолошки тип тумора

Испитивана је повезаност пролиферативног индекса *Ki-67* са клиничко-патолошким карактеристикама само код пацијената са аденокарциномом. Клиничко-патолошке карактеристике које су биле значајно повезане са вредношћу *Ki-67* код аденокарцинома су хистолошки градус и стадијум болести, што није био случај када су посматрани сви *NSCLC* пацијенти (Табела 18).

Табела 18. Повезаност вредности *Ki-67* са клиничко-патолошким карактеристикама код пацијената са аденокарциномом

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	Ki-67 НИСКО број (%)	Ki-67 ВИСОКО број (%)	Хи-квадрат тест/p
Пол			
Мушки	14 (66,7%)	41 (58,6%)	0,169/0,681
Женски	7 (33,3%)	29 (41,4%)	
Пушачки статус			
Пушач	14 (66,7%)	57 (86,4%)	2,910/0,088
Непушач	7 (33,3%)	9 (13,6%)	
Хистолошки градус			
Низак	0 (0,0%)	13 (19,4%)	7,770/0,033
Висок	21 (100,0%)	54 (80,6%)	
T статус			
T2	6 (28,6%)	10 (14,5%)	2,839/0,239
T3	1 (4,8%)	10 (14,5%)	
T4	14 (66,7%)	49 (71,0%)	
N статус			
N1	0 (0,0%)	4 (5,7%)	0,928/0,689
N2	12 (57,1%)	41 (58,6%)	
N3	9 (42,9%)	25 (35,7%)	
Стадијум болести			
III	2 (9,5%)	25 (35,7%)	6,210/0,028
IV	19 (90,5%)	45 (64,3%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	2 (25,0%)	18 (29,0%)	1,816/0,406
Умерена реакција	0 (0,0%)	12 (19,4%)	
Јака реакција	6 (75,0%)	32 (51,6%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	10 (66,7%)	57 (86,4%)	2,082/0,149
Има коморбидитета	5 (33,3%)	9 (13,6%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	3 (17,6%)	1 (1,6%)	6,151/0,085
Један коморбидитет	8 (47,1%)	33 (51,5%)	
Два коморбидитета	0 (0,0%)	4 (6,3%)	
Три коморбидитета	6 (35,3%)	26 (40,6%)	
Најбољи одговор			
SD	7 (33,3%)	27 (55,1%)	1,985/0,159
PR	14 (66,7%)	22 (44,9%)	

Значајна повезаност вредности *Ki-67* и фактора тироидне транскрипције 1 (*TTF1*) није показана, док је значајна повезаност вредности *Ki-67* постојала када су посматрани пацијенти са аденокарциномом у односу на рецептор епидермалног раста (*EGFR*). Статистички значајна разлика у вредности *Ki-67* није показана у односу на то

да ли су пацијенти као прву линије терапије уз хемиотерапију користили антиVEGF (Табела 19).

Табела 19. Повезаност вредности *Ki-67* и *TTF1* и *EGFR* код пацијената са аденокарциномом

	<i>Ki-67</i> НИСКО број (%)	<i>Ki-67</i> ВИСОКО број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
<i>TTF1</i>			
Негативно	0 (0,0%)	5 (8,3%)	1,896/0,582
Позитивно	12 (100,0%)	55 (91,7%)	
<i>EGFR</i>			
Дивљи тип	17 (85,0%)	49 (100,0%)	7,772/0,022
Мутације	3 (15,0%)	0 (0,0%)	
Прва линија терапије			
Хемиотерапија	12 (57,1%)	47 (67,1%)	0,338/0,561
Хемиотерапија+антиVEGF	9 (42,9%)	23 (32,9%)	

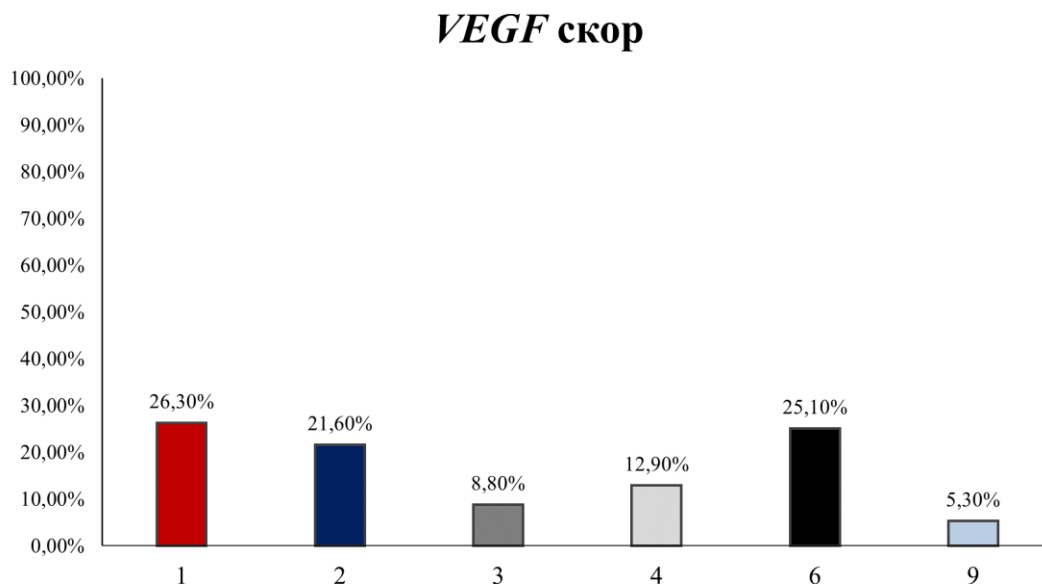
Као и када су посматрани сви *NSCLC* пацијенти, тако и код пацијената са сквамозним карциномом, *T* статус, *N* статус и присуство коморбидитета на плућима су биле клиничко-патолошке карактеристике значајно повезане са вредностима *Ki-67*. Додатна повезаност је уочена између вредности *Ki-67* и хистолошког градуса као и коморбидитета на плућима када су посматрани само пацијенти са присутним сквамозним карциномом (Табела 20).

Табела 20. Повезаност вредности *Ki-67* са клиничко-патолошким карактеристикама код пацијената са сквамозним карциномом

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	Ki-67 НИСКО број (%)	Ki-67 ВИСОКО број (%)	Хи-квадрат тест/p
Пол			
Мушки	16 (69,6%)	34 (89,5%)	3,842/0,084
Женски	7 (30,4%)	4 (10,5%)	
Пушачки статус			
Пушач	23 (100,0%)	32 (91,4%)	3,137/0,270
Непушач	0 (0,0%)	3 (8,6%)	
Хистолошки градус			
Низак	9 (39,1%)	3 (8,1%)	8,435/0,005
Висок	14 (60,9%)	34 (91,9%)	
T статус			
T2	3 (13,0%)	1 (2,6%)	5,812/0,041
T3	2 (8,7%)	12 (31,6%)	
T4	18 (78,3%)	25 (65,8%)	
N статус			
N0	0 (0,0%)	4 (10,5%)	14,165/0,001
N1	1 (4,3%)	8 (21,1%)	
N2	14 (60,9%)	25 (65,8%)	
N3	8 (34,8%)	1 (2,6%)	
Стадијум болести			
III	11 (47,8%)	11 (28,9%)	2,194/0,173
IV	12 (52,2%)	27 (71,1%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	7 (41,2%)	3 (13,6%)	4,026/0,140
Умерена реакција	4 (23,5%)	10 (45,5%)	
Јака реакција	6 (35,3%)	9 (40,9%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	18 (81,8%)	15 (42,9%)	8,926/0,006
Има коморбидитета	4 (18,2%)	20 (57,1%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	6 (30,0%)	0 (0,0%)	13,593/0,002
Један коморбидитет	9 (45,0%)	14 (41,2%)	
Два коморбидитета	0 (0,0%)	5 (14,7%)	
Три коморбидитета	5 (25,0%)	15 (44,1%)	
Најбољи одговор			
SD	11 (50,0%)	20 (60,6%)	0,603/0,580
PR	11 (50,0%)	13 (39,4%)	

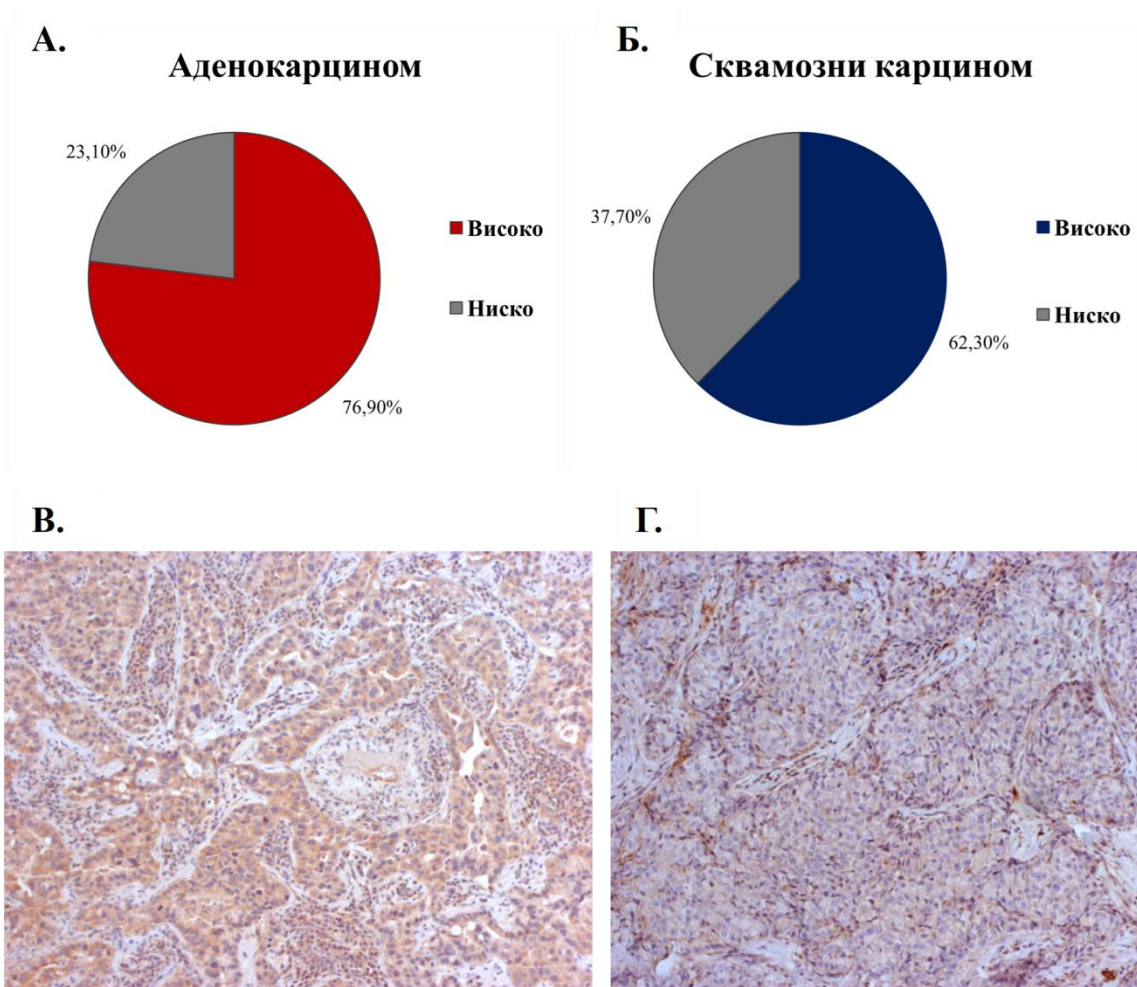
4.5. Анализа експресије *VEGF*

Укупан проценат пацијената који су показали имунореактивност за *VEGF* је био 71,8% *NSCLC* пацијената. Просечна вредност експресије износила је $44,77 \pm 25,661$ при чему се опсег вредности кретао од минималних 5 до 90%. Када су посматране вредности *VEGF* скорa, просечна вредност скорa код *NSCLC* пацијената била је $3,46 \pm 2,319$, при чему је најмањи забележени скор износио 1 а највећи 9. Расподела пацијената у односу на вредност *VEGF* скорa приказана је на Фигури 26.



Фигура 26. Дистрибуција вредности *VEGF* скорa код *NSCLC* пацијената.

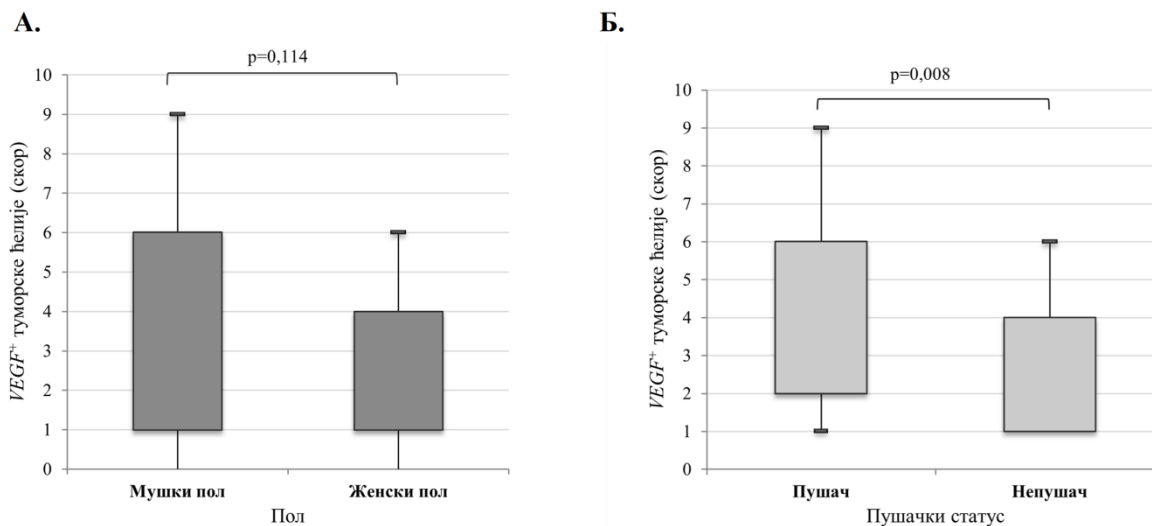
Код аденокарцинома позитивна имунореактивност за *VEGF* је забележена код 74 (82,2%) *NSCLC* пацијената, док је код сквамозног карцинома она забележена код 41 (56,0%) *NSCLC* пацијената (Фигура 27).



Фигура 27. Учесталост имунореактивности за *VEGF* према хистолошком типу карцинома. А. Заступљеност *VEGF* позитивних (n=74) код аденокарцинома (n=90) приказана је као проценат. **Б.** Заступљеност *VEGF* позитивних (n=41) код сквамозног карцинома (n=73) приказана је као проценат. **Микроморфолошки приказ *VEGF* експресије код NSCLC В. жлездане и Г. сквамозне диференцијације** (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x200)

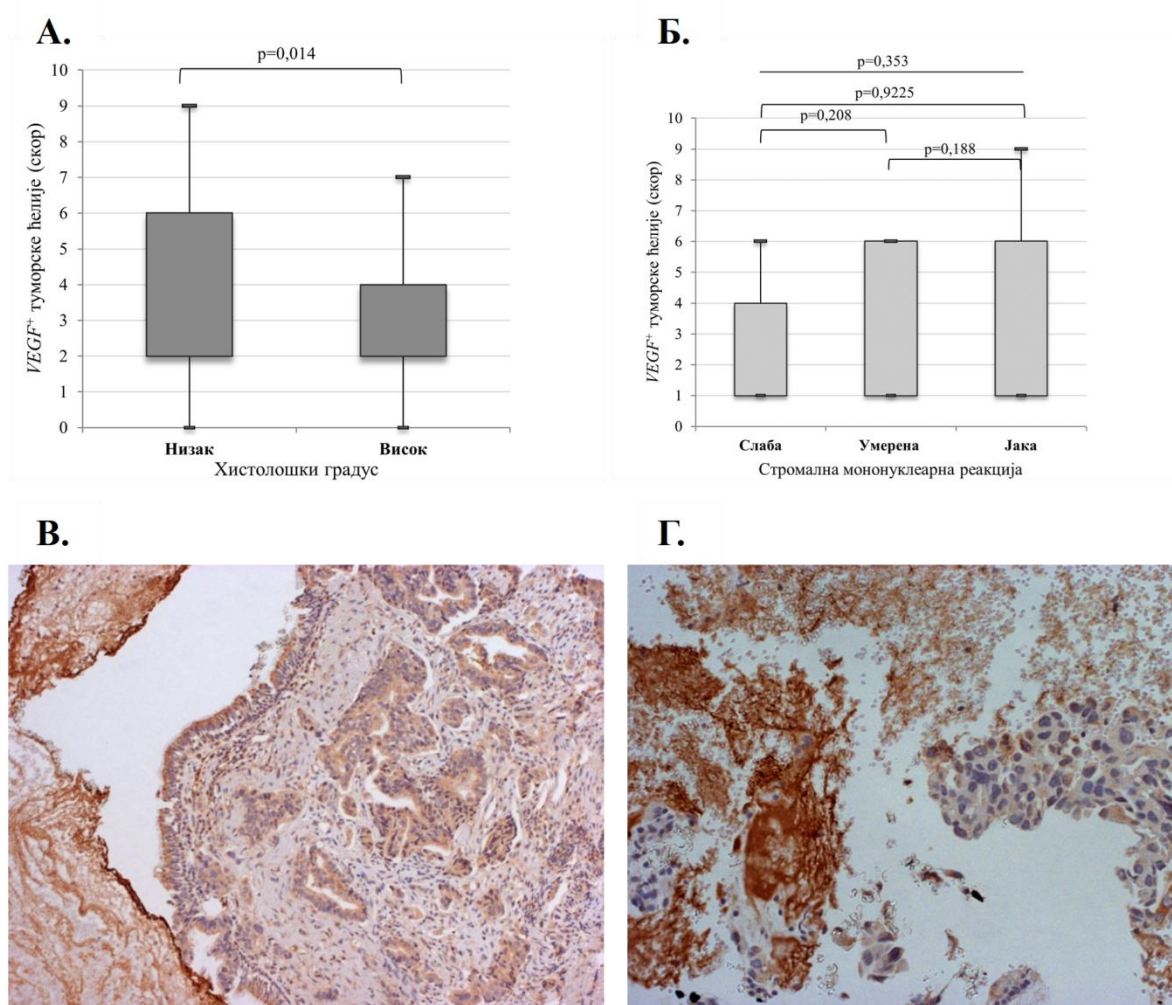
4.5.1. Повезаност VEGF са клиничко-патолошким карактеристикама

У односу на пол *NSCLC* пацијената, није показана статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa ($p=0,190$) (Фигура 28А). Што се тиче пушачког статуса, пушачи су имали статистички значајно веће вредности *VEGF* скорa у односу на непушаче ($p=0,008$) (Фигура 28Б).



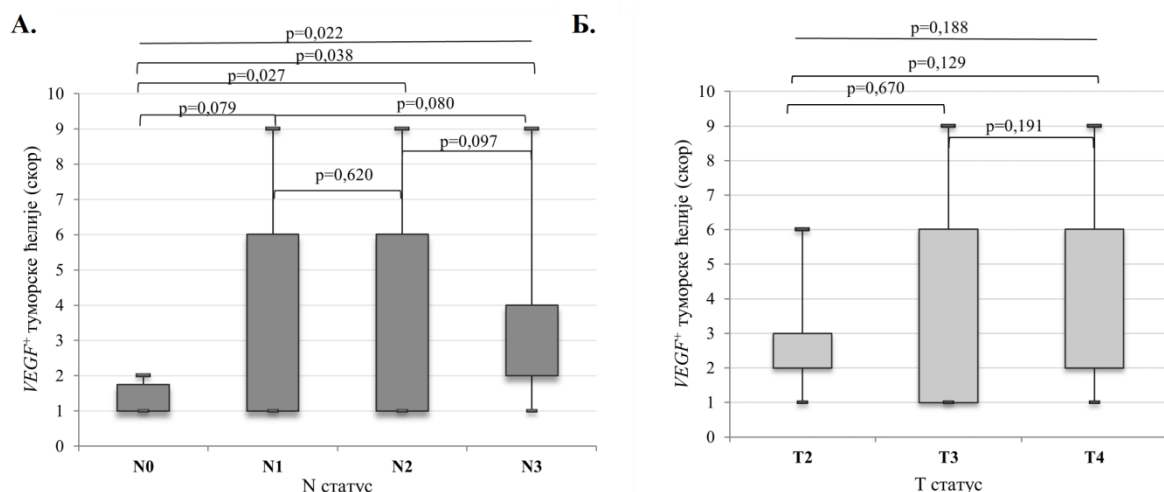
Фигура 28. Вредности *VEGF* скорa у односу на пол и пушачки статус. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa у односу на пол ($p=0,114$). **Б.** Постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa у односу на пушачки статус ($p=0,008$).

Постојање статистички значајне разлике у вредностима *VEGF* скорa је показано у односу на хистолошки градус ($p=0,014$) (Фигура 29А). Пацијенти са нижим степеном диференцијације показали су вишу *VEGF* експресију (Фигура 30В-Г). Значајна разлика није уочена када су посматрани пацијенти у односу на стромалну моноклеарну реакцију ($p=0,353$) (Фигура 29Б).



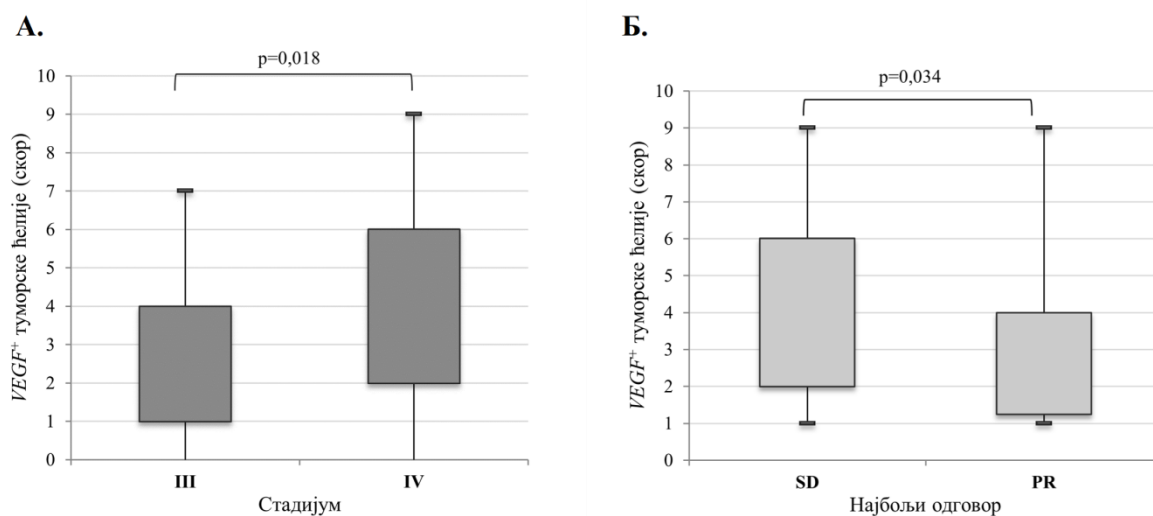
Фигура 29. Вредности *VEGF* скова у односу на хистолошки градус и стромалну мононуклеарну реакцију А. Постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скова у односу на хистолошки градус ($p=0,014$) Б. Не постоји статистички значајна разлика у вредности *VEGF* скова у односу на стромалну мононуклеарну реакцију ($p=0,353$). **Хистолошки приказ обрнуте корелације између В.-Г. хистолошког градуса и *VEGF* експресије (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање $\times 200$).**

Статистички значајно веће вредности *VEGF* скова су показане је био у групи *N0* у односу на групе *N2* и *N3* (0,022) (Фигура 30А). Није постојала статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скова у односу на *T* статус ($p=0,188$) (Фигура 30Б).



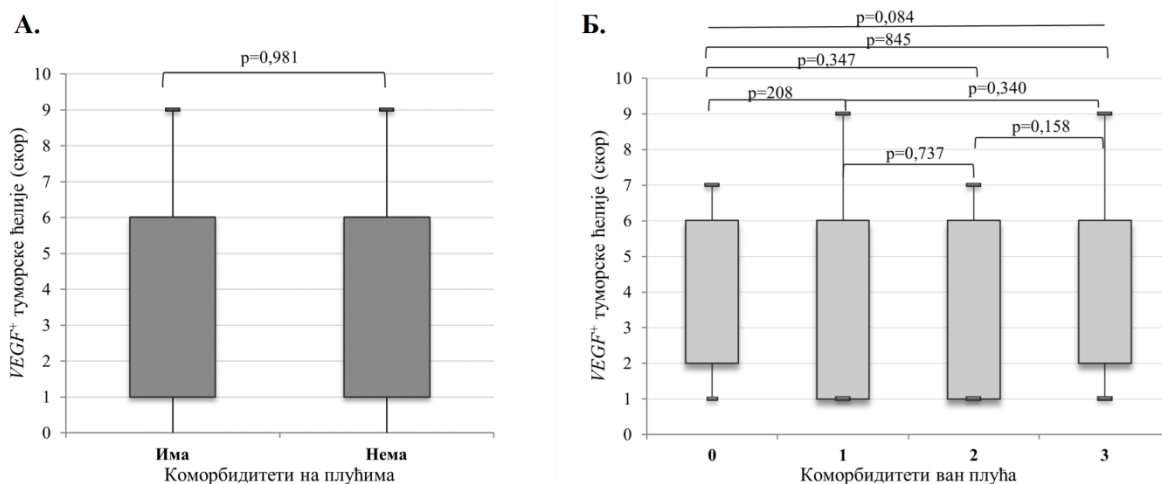
Фигура 30. Вредности *VEGF* скорa у односу на N и T статус. **А.** Постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa у односу на N статус ($p < 0,05$). Значајна разлика је уочена између група N0 и N2 ($p = 0,027$) и група N0 и N3 ($p = 0,038$). **Б.** Не постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa у односу на T статус ($p = 0,0188$).

Када је посматран *VEGF* скор у односу на стадијум болести, значајно веће вредности скорa су показане код пацијената који су били у IV стадијуму болести ($p = 0,254$) (Фигура 31Б). Значајна статистичка разлика је показана и када су посматрани пацијенти у зависности од њиховог најбољег одговора, при чему су веће вредности скорa имали пацијенти са SD одговором ($p = 0,034$) (Фигура 31Б).



Фигура 31. Вредности *VEGF* скорa у односу на стадијум болести и најбољи одговор пацијената. **А.** Постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa у односу на стадијум болести ($p = 0,0018$). **Б.** Постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* скорa у односу на најбољи одговор ($p = 0,034$).

Вредности *VEGF* скорa нису се значајно разликовала код пацијената који су имали и оних који нису имали коморбидитете на плућима ($p = 0,981$) (Фигура 32А), као ни код различитих група у односу на број коморбидитета ван плућа ($p = 0,084$) (Фигура 32Б).



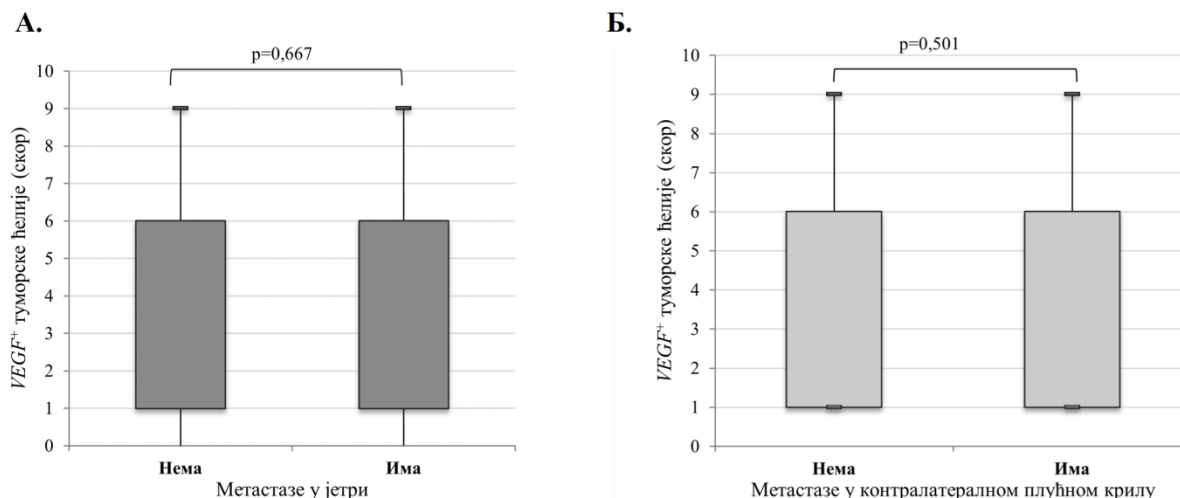
Фигура 32. Вредности VEGF скорa у односу на присуство коморбидитета на плућима и ван плућа. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредностима VEGF скорa у односу на присуство коморбидитета на плућима ($p=0,981$). **Б.** Не постоји статистички значајна разлика у вредностима VEGF скорa у односу на коморбидитете ван плућа ($p=0,084$).

На основу *cut off* (граничне) вредности од 25% пацијенте смо сврстали у две категорије. Пацијенти груписани на овакав начин показали су статистички значајну повезаност са хистолошким типом, хистолошким градусом, *T* статусом, *N* статусом и коморбидитетима ван плућа (Табела 21).

Табела 21. Повезаност између вредности VEGF експресије са клиничко-патолошким карактеристикама

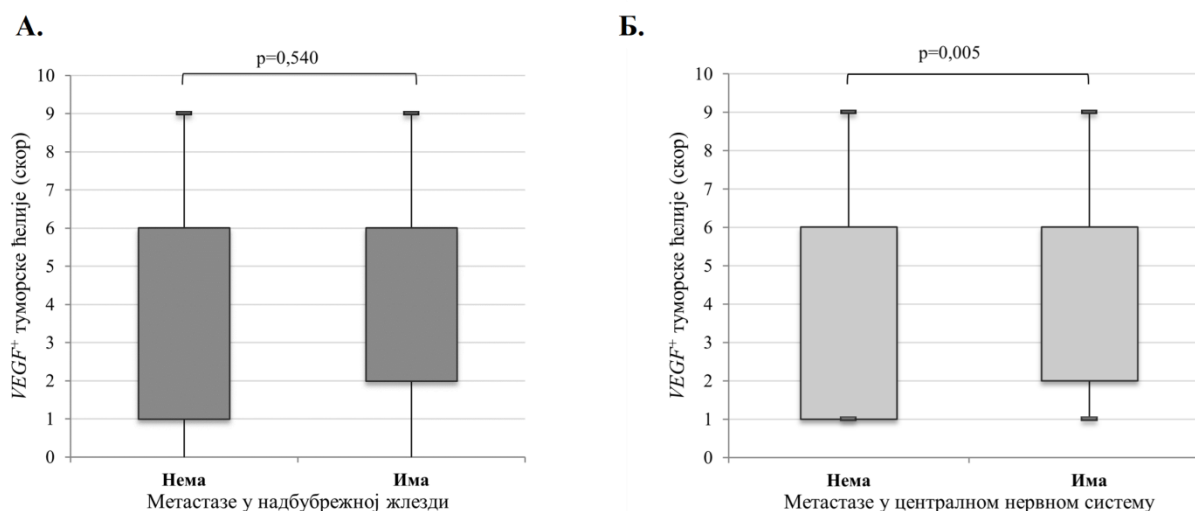
КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	VEGF НЕГАТИВНИ број (%)	VEGF ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/р
Пол			
Мушки	30 (68,2%)	75 (69,4%)	0,023/0,879
Женски	14 (31,8%)	33 (30,6%)	
Пушачки статус			
Пушач	37 (84,1%)	89 (88,1%)	0,155/0,694
Непушач	7 (15,9%)	12 (11,9%)	
Хистолошки тип			
Сквамозни карцином	23 (52,3%)	38 (35,2%)	3,799/0,048
Аденокарцином	21 (47,7%)	70 (64,8%)	
Хистолошки градус			
Низак	12 (27,3%)	13 (12,5%)	3,812/0,034
Висок	32 (72,7%)	91 (87,5%)	
T статус			
T2	9 (20,5%)	11 (10,3%)	6,127/0,044
T3	3 (6,8%)	22 (20,6%)	
T4	32 (72,7%)	74 (69,1%)	
N статус			
N0	0 (0,0%)	4 (3,7%)	8,593/0,042
N1	1 (2,3%)	12 (11,1%)	
N2	26 (59,1%)	66 (61,1%)	
N3	17 (38,6%)	26 (24,1%)	
Стадијум болести			
III	13 (29,5%)	36 (33,3%)	0,069/0,793
IV	31 (70,5%)	72 (66,7%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	9 (36,0%)	21 (25,0%)	1,688/0,430
Умерена реакција	4 (16,0%)	22 (26,2%)	
Јака реакција	12 (48,0%)	41 (48,8%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	28 (75,7%)	72 (71,3%)	0,088/0,767
Има коморбидитета	9 (24,3%)	29 (28,7%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	9 (24,4%)	1 (1,0%)	24,135/0,000
Један коморбидитет	17 (45,9%)	47 (48,0%)	
Два коморбидитета	0 (0,0%)	9 (9,2%)	
Три коморбидитета	11 (29,7%)	41 (41,8%)	
Најбољи одговор			
SD	18 (41,9%)	47 (57,3%)	2,116/0,146
PR	25 (58,1%)	35 (42,7%)	

Није показана статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* експресије у зависности од присуства метастаза у јетри ($p=0,667$) (Фигура 33А), и у контралатералном плућном крилу ($p=0,501$) (Фигура 33Б).



Фигура 33. Вредности *VEGF* експресије у односу на присуство метастаза у јетри и контралатералном плућном крилу. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* експресије у односу на присуство метастаза у јетри ($p=0,667$). Б. Не постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* експресије у односу на присуство метастаза у контралатералном плућном крилу ($p=0,501$).

Пацијенти са и без метастаза у надбубрежној жлезди нису се значајно разликовали у вредностима *VEGF* експресије ($p=0,540$) (Фигура 34А). Што се тиче присуства метастаза у централном нервном систему, значајно веће вредности *VEGF* експресије су показане код пацијената који су имали метастазе у односу на оне код којих метастазе у централном нервном систему нису постојале ($p=0,005$) (Фигура 34Б).



Фигура 34. Вредности *VEGF* експресије у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди и централном нервном систему. А. Не постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* експресије у односу на присуство метастаза у надбубрежној жлезди ($p=0,540$). Б. Постоји статистички значајна разлика у вредностима *VEGF* експресије у односу на присуство метастаза у централном нервном систему ($p=0,005$).

4.5.2. Повезаност VEGF експресије са клиничко-патолошким карактеристикама у односу на хистолошки тип ћелија

Када су посматрани само пацијенти са аденокарциномом, клиничко-патолошке карактеристике које су биле значајно повезане са експресијом *VEGF* су биле пушачки статус, хистолошки градус, Т статус, стадијум болести и коморбидитети ван плућа, док је код осталих карактеристика значајна повезаност изостала (Табела 22).

Табела 22. Повезаност експресије *VEGF* са клиничко-патолошким карактеристикама код пацијената са аденокарциномом

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	VEGF НЕГАТИВНИ број (%)	VEGF ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/р
Пол			
Мушки	11 (68,8%)	47 (63,5%)	0,157/0,692
Женски	5 (31,3%)	27 (36,5%)	
Пушачки статус			
Пушач	13 (100,0%)	54 (75,0%)	4,123/0,042
Непушач	0 (0,0%)	18 (25,0%)	
Хистолошки градус			
Низак	5 (38,5%)	7 (9,5%)	7,822/0,005
Висок	8 (61,5%)	67 (90,5%)	
T статус			
T2	0 (0,0%)	15 (20,3%)	18,465/0,000
T3	7 (46,7%)	5 (6,7%)	
T4	8 (53,3%)	54 (73,0%)	
N статус			
N1	1 (6,3%)	3 (4,1%)	1,657/0,437
N2	12 (75,0%)	45 (60,8%)	
N3	3 (18,7%)	26 (35,1%)	
Стадијум болести			
III	8 (50,0%)	18 (24,3%)	4,222/0,040
IV	8 (50,0%)	56 (75,7%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	3 (25,0%)	17 (29,8%)	0,240/0,887
Умерена реакција	3 (25,0%)	11 (19,3%)	
Јака реакција	6 (50,0%)	29 (50,9%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	12 (92,3%)	54 (79,4%)	0,500/0,479
Има коморбидитета	1 (7,7%)	14 (20,6%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	0 (0,0%)	3 (4,6%)	10,552/0,014
Један коморбидитет	12 (92,3%)	28 (45,2%)	
Два коморбидитета	0 (0,0%)	4 (6,4%)	
Три коморбидитета	1 (7,7%)	30 (48,4%)	
Најбољи одговор			
SD	5 (55,6%)	27 (46,6%)	
PR	4 (44,4%)	31 (53,4%)	

Није показана статистички значајна повезаност између експресије *VEGF* и фактора тироидне транскрипције 1 (*TTF1*), као ни рецептора епидермалног раста (*EGFR*) код пацијената са аденокарциномом. Такође, статистички значајна разлика у

експресији *VEGF* није показана у односу на то да ли су пацијенти као прву линије терапије уз хемиотерапију користили анти*VEGF* (Табела 23).

Табела 23. Повезаност експресије *VEGF* и *TTF1* и *EGFR* код пацијената са аденокарциномом

	<i>VEGF</i> НЕГАТИВНИ број (%)	<i>VEGF</i> ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
<i>TTF1</i>			
Негативно	0 (0,0%)	4 (7,7%)	2,222/0,566
Позитивно	16 (100,0%)	48 (92,3%)	
<i>EGFR</i>			
Дивљи тип	8 (100,0%)	53 (86,9%)	2,104/0,583
Мутације	0 (0,0%)	8 (13,1%)	
Прва линија терапије			
Хемиотерапија	9 (56,3%)	52 (70,3%)	1,184/0,277
Хемиотерапија+анти <i>VEGF</i>	7 (43,7%)	23 (29,7%)	

Хистолошки градус, коморбидитети ван плућа и најбољи одговор пацијената су биле клиничко-патолошке карактеристике значајно повезане са позитивношћу *VEGF* (Табела 24).

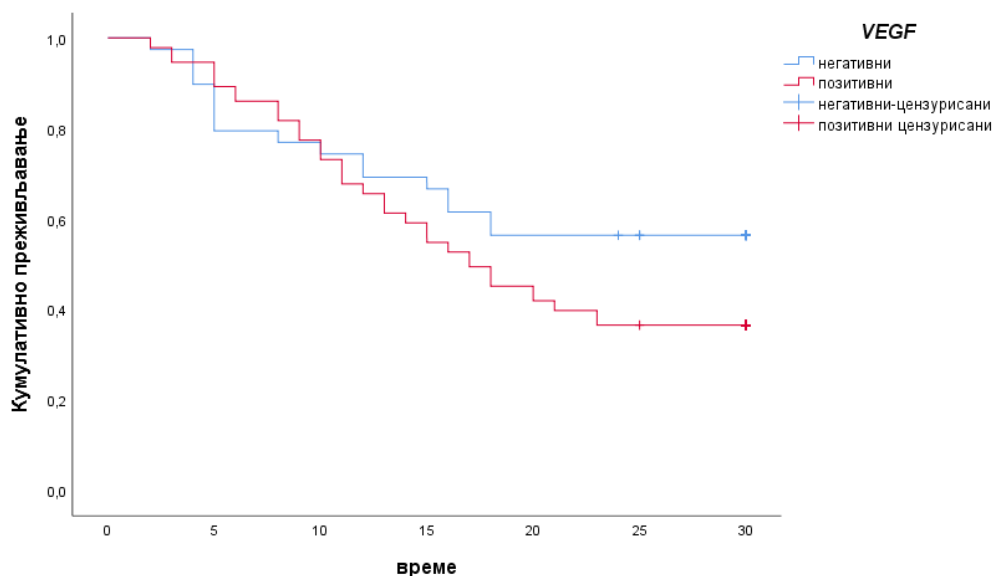
Табела 24. Повезаност експресије *VEGF* са клиничко-патолошким карактеристикама код пацијената са сквамозним карциномом

КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	VEGF НЕГАТИВНИ број (%)	VEGF ПОЗИТИВНИ број (%)	Хи-квадрат тест/ <i>p</i>
Пол			
Мушки	26 (81,3%)	21 (75,6%)	0,086/0,770
Женски	6 (18,7%)	10 (24,4%)	
Пушачки статус			
Пушач	29 (100,0%)	38 (92,7%)	0,792/0,261
Непушач	0 (0,0%)	3 (7,3%)	
Хистолошки градус			
Низак	9 (28,1%)	3 (7,7%)	5,225/0,022
Висок	23 (71,9%)	36 (92,3%)	
T статус			
T2	3 (9,4%)	2 (4,9%)	1,243/0,537
T3	7 (21,9%)	13 (31,7%)	
T4	22 (68,7%)	36 (63,4%)	
N статус			
N0	3 (9,4%)	1 (2,4%)	4,560/0,207
N1	3 (9,4%)	7 (17,1%)	
N2	20 (62,5%)	30 (73,2%)	
N3	6 (18,7%)	3 (7,3%)	
Стадијум болести			
III	10 (31,3%)	16 (39,0%)	0,195/0,659
IV	22 (68,7%)	25 (61,0%)	
Стромална мононуклеарна реакција			
Слаба реакција	3 (13,6%)	10 (43,5%)	4,879/0,087
Умерена реакција	10 (45,5%)	7 (30,4%)	
Јака реакција	9 (40,9%)	6 (26,1%)	
Коморбидитети на плућима			
Нема коморбидитета	18 (62,1%)	22 (56,4%)	0,048/0,826
Има коморбидитета	11 (37,9%)	17 (43,6%)	
Коморбидитети ван плућа			
Нема коморбидитета	1 (3,8%)	8 (20,5%)	8,078/0,044
Један коморбидитет	12 (46,2%)	16 (41,0%)	
Два коморбидитета	6 (23,1%)	2 (5,1%)	
Три коморбидитета	7 (26,9%)	13 (33,3%)	
Најбољи одговор			
SD	7 (31,8%)	27 (73,0%)	7,958/0,005
PR	15 (68,2%)	10 (27,0%)	

4.6. Анализа преживљавања

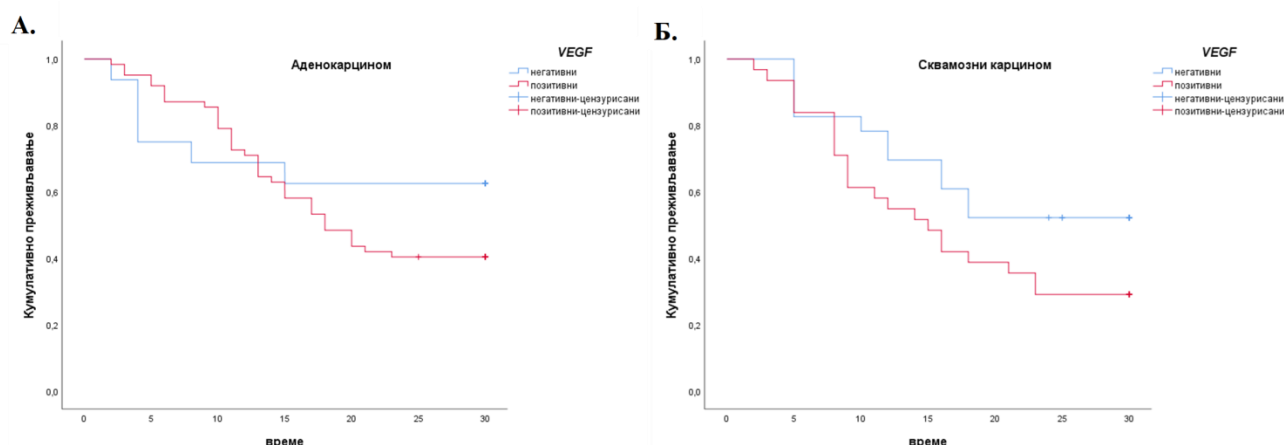
4.6.1. Анализа преживљавања у односу на експресију VEGF

Двогодишње преживљавање пацијената са *NSCLC* било је 39,3%, док је 50% пацијената било живо 17 месеци. Када је посматран одвојено III и IV стадијум болести, стопа двогодишњег преживљавања је код III стадијума била 41,1%, док је код IV стадијума она износила 39,7%. Када су посматрани сви *NSCLC* пацијенти, показано је да није постојао статистички значајан утицај експресије *VEGF* на преживљавање (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,095$) (Фигура 35).



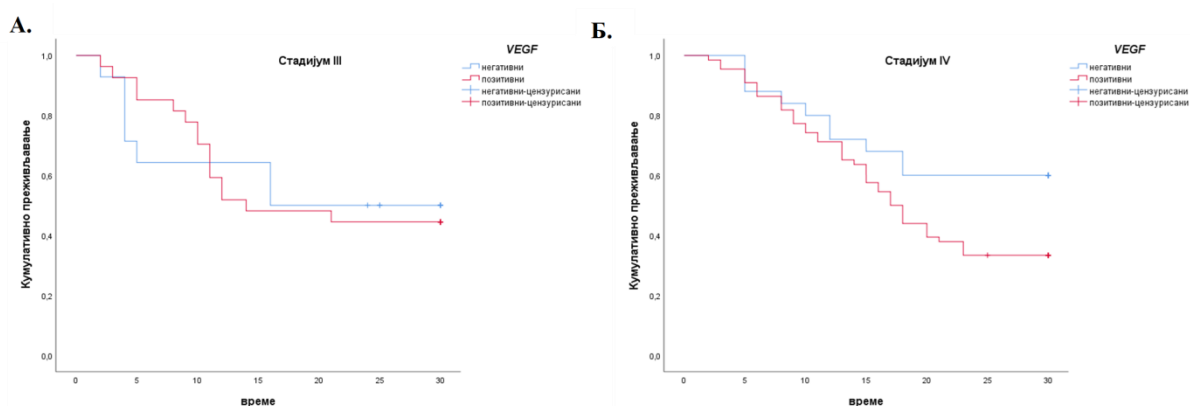
Фигура 35. Kaplan-Meier крива преживљавања *NSCLC* пацијената у односу на експресију *VEGF*.

Испитиван је утицај експресије *VEGF* на преживљавање у зависности од хистолошког типа ћелија, при чему није показан утицај ни код пацијената са сквамозним карциномом (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,091$), као ни код пацијената са аденокарциномом (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,282$) (Фигура 36).



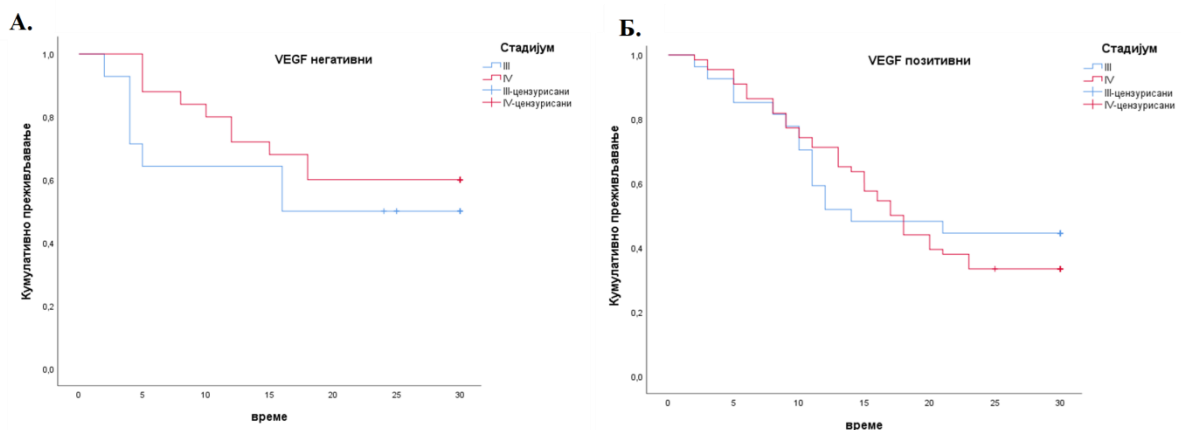
Фигура 36. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на експресију *VEGF* код аденокарцинома и сквамозног карцинома.

Статистички значајан утицај експресије *VEGF* на преживљавање (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,048$) је показан код пацијената који су се налазили у IV стадијуму болести, док је код пацијената са III стадијумом болести овај ефекат изостао (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,884$) (Фигура 37).



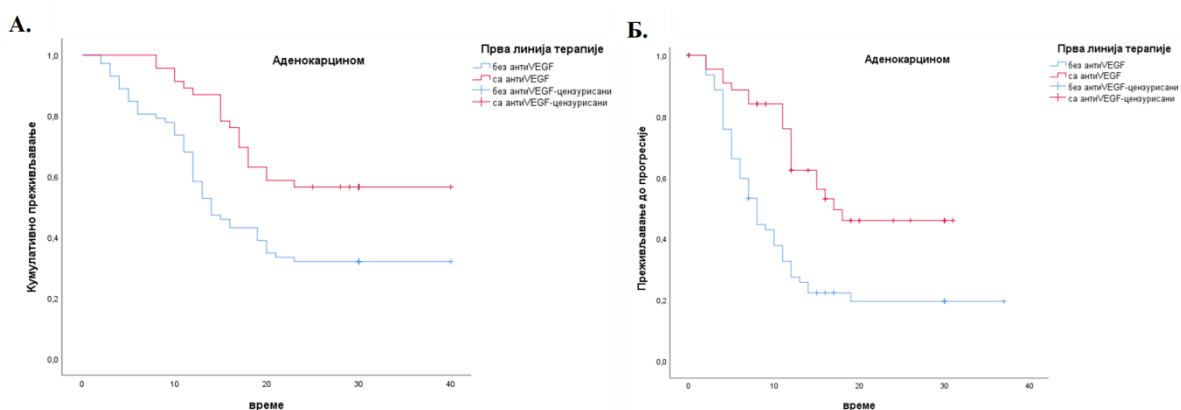
Фигура 37. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на експресију *VEGF* код пацијената са III и IV стадијумом болести.

Такође, посматран је утицај стадијума болести *NSCLC* пацијената код *VEGF* позитивних и код *VEGF* негативних одвојено. Значајан утицај стадијума болести није показан ни код групе *VEGF* позитивних (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,549$), као ни код *VEGF* негативних (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,377$) (Фигура 38).



Фигура 38. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на стадијум болести код пацијената који су *VEGF* позитивни и *VEGF* негативни.

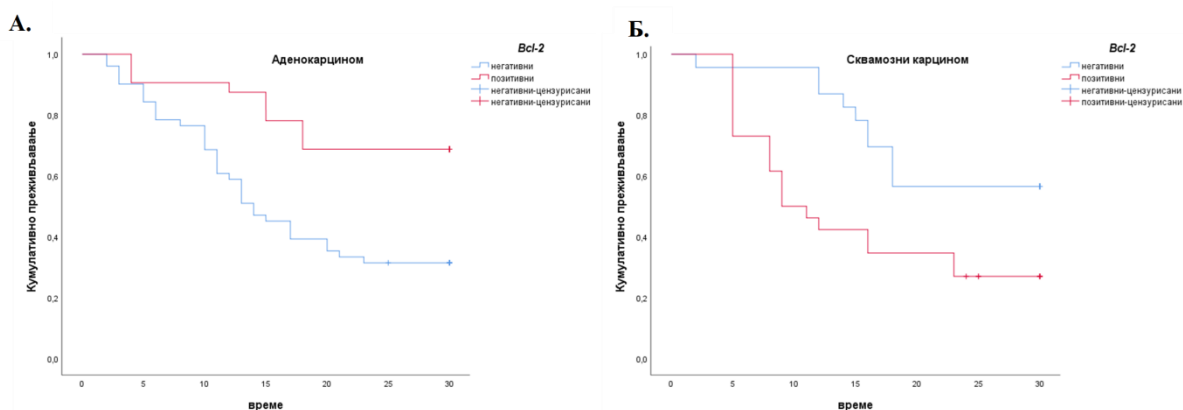
У случају пацијената са аденокарциномом, показано је да је примена антиVEGF терапије остварила статистички значајан утицај (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,002$) на преживљавање пацијента. Код ових пацијената показан је ефекат примене антиVEGF терапије и на време преживљавања до прогресије болести (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,000$) (Фигура 39).



Фигура 39. Kaplan-Meier крива преживљавања и преживљавања до прогресије код пацијената са аденокарциномом у односу на примењену антиVEGF терапију.

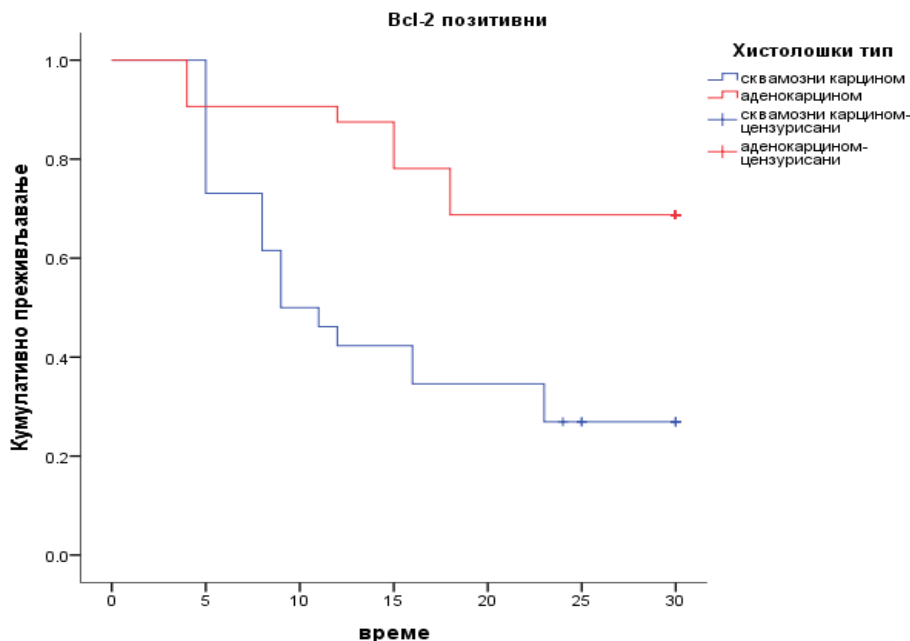
4.6.2. Анализа преживљавања у односу на експресију Bcl-2

Када је посматран утицај експресије *Bcl-2* на преживљавање у зависности од хистолошког типа ћелија, статистички значајан утицај овог параметра је показан и код пацијената са аденокарциномом (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,001$), као и код пацијената са сквамозним карциномом (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,011$) (Фигура 40).



Фигура 40. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на експресију *Bcl-2* код аденокарцинома и сквамозног карцинома.

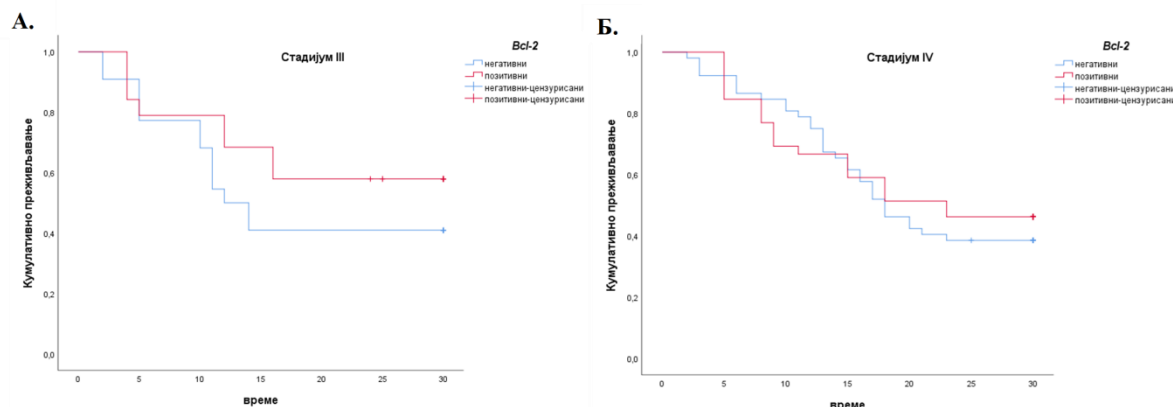
Такође, показан је утицај хистолошког типа карцинома на преживљавање NSCLC пацијената код *Bcl-2* позитивних пацијената (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,001$) (Фигура 41).



Фигура 41. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на хистолошки тип код *Bcl-2* позитивних пацијената.

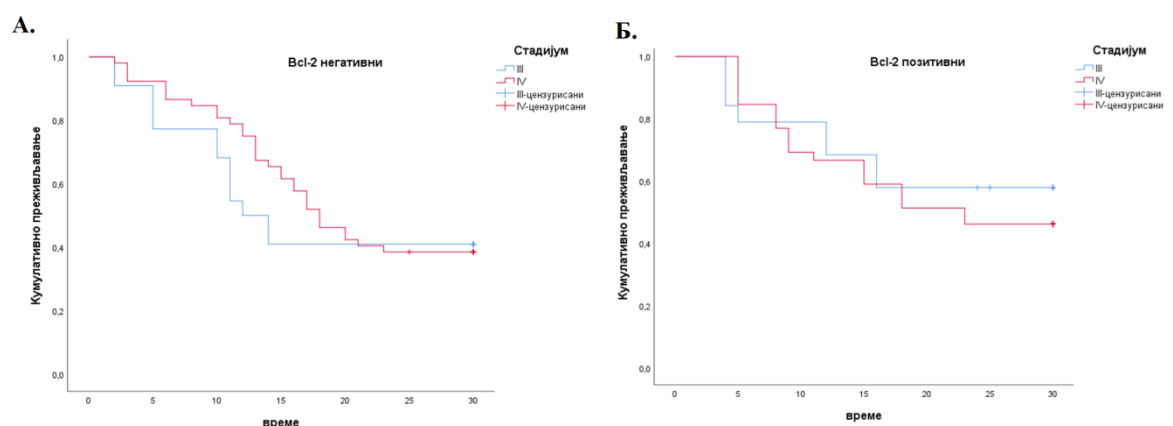
Није показана статистички значајна разлика утицаја експресије *Bcl-2* на преживљавање пацијената у односу на то да ли су били III стадијум болести (Log Rank

(Mantel-Cox) тест, $p=0,252$) или IV стадијум болести (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,607$) (Фигура 42).



Фигура 42. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу хистолошки тип код пацијената који су *Bcl-2* позитивни и *Bcl-2* негативни.

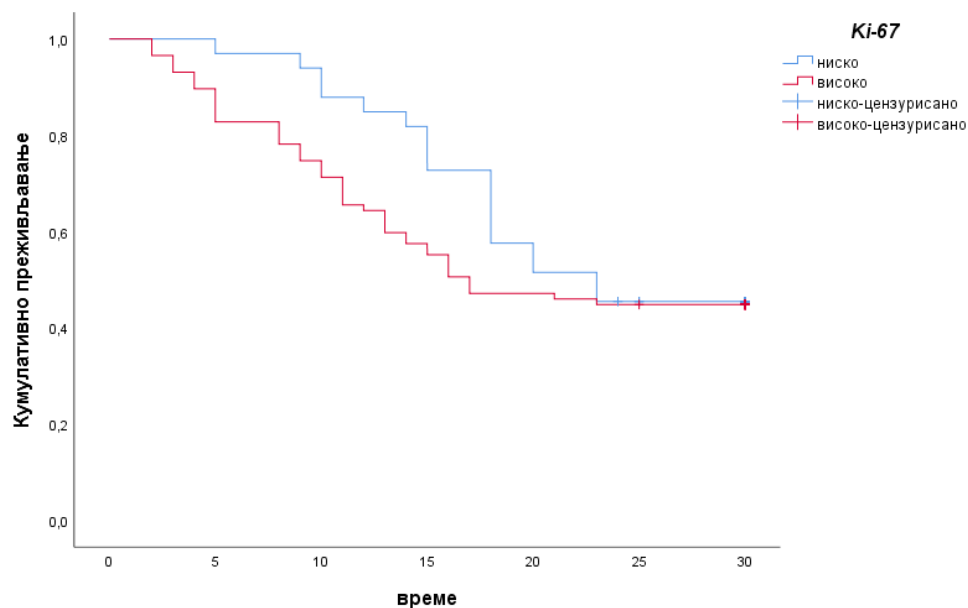
Статистички значајна разлика није показана када је посматран утицај стадијума болести *NSCLC* пацијената посебно код *Bcl-2* позитивних (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,554$) и код *Bcl-2* негативних (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,615$) (Фигура 43).



Фигура 43. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на стадијум болести код пацијената који су *Bcl-2* позитивни и *Bcl-2* негативни.

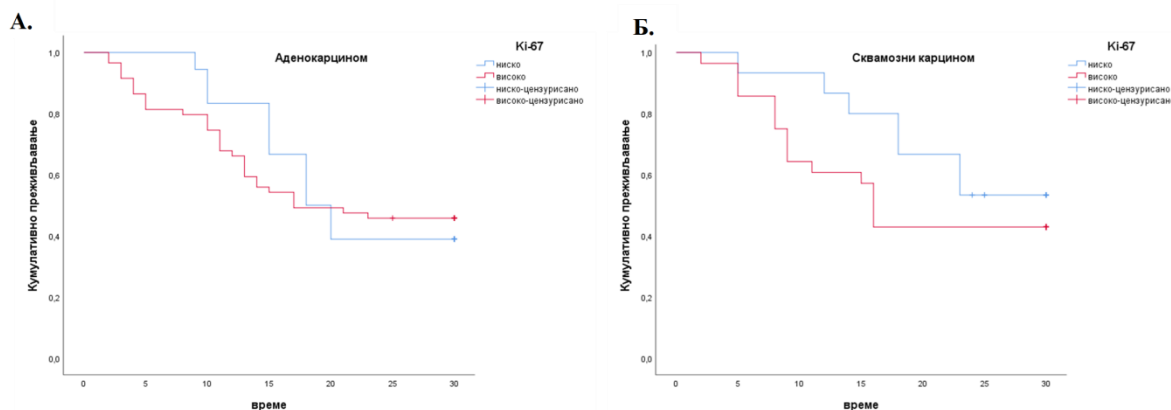
4.6.3. Анализа преживљавања у односу на вредност *Ki-67*

Утицај вредности пролиферативног индекса *Ki-67* на преживљавање код *NSCLC* пацијената није био статистички значајан (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,388$) (Фигура 44).



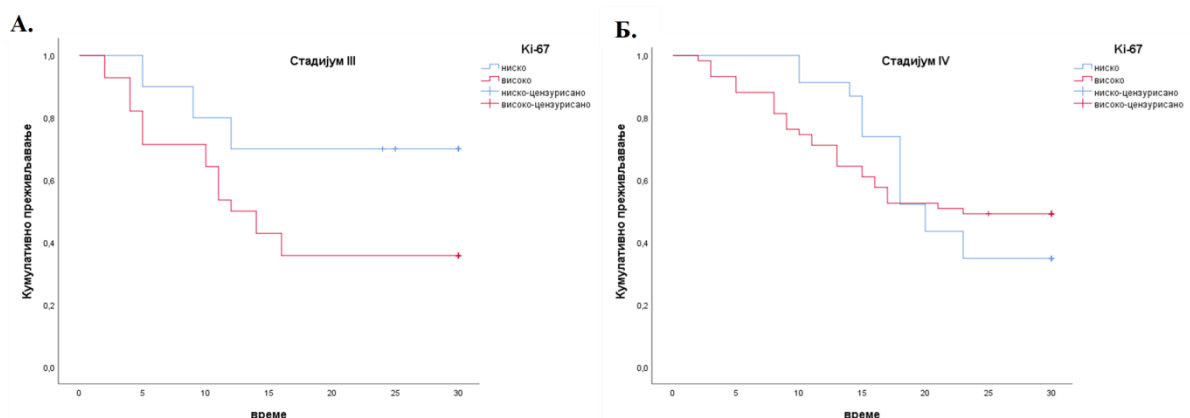
Фигура 44. Kaplan-Meier крива преживљавања *NSCLC* пацијената у односу на вредност *Ki-67*.

У односу на хистолошки тип ћелија код *NSCLC* пацијената, није показан значајан утицај вредности *Ki-67* ни код пацијената са аденокарциномом (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,884$), као ни код пацијената са сквамозним карциномом (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,285$) (Фигура 45).



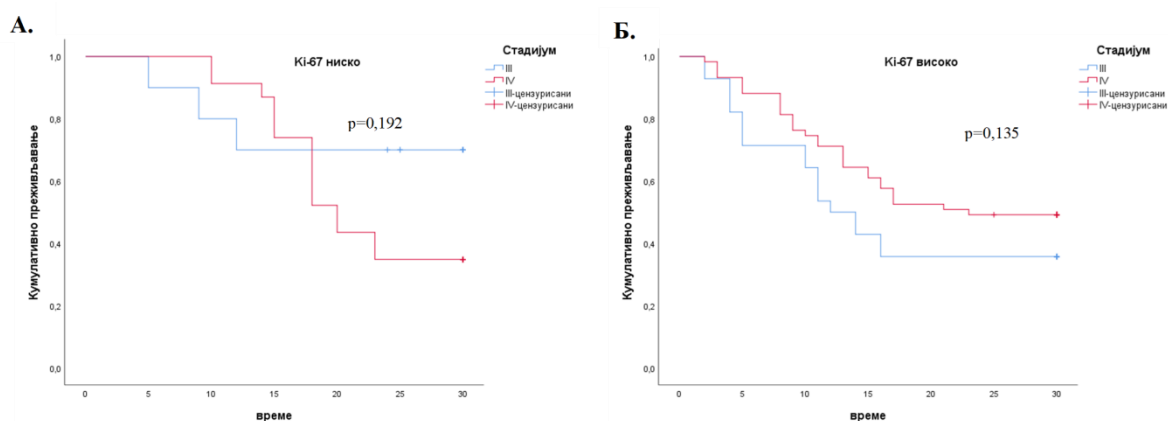
Фигура 45. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на вредност *Ki-67* код аденокарцинома и сквамозног карцином.

Када је испитиван утицај вредности *Ki-67* на преживљавање пацијената у зависности од стадијума болести, није показан статистички значајан утицај ни код пацијената са III стадијумом болести (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,090$), као ни код пацијената са IV стадијумом болести (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,807$) (Фигура 46).



Фигура 46. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на вредност *Ki-67* код пацијената са III и IV стадијумом болести.

Такође, испитиван је утицај стадијума болести у зависности од вредности пролиферативног индекса *Ki-67*, при чему утицај стадијума није био статистички значајан ни код пацијената који су имали ниске вредности пролиферативног индекса *Ki-67* (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,192$), као ни код пацијената који су имали високе вредности пролиферативног индекса *Ki-67* (Log Rank (Mantel-Cox) тест, $p=0,135$) (Фигура 47).



Фигура 47. Kaplan-Meier крива преживљавања у односу на стадијум болести код пацијената са ниском и високом вредности *Ki-67*.

4.6.4. Анализа утицаја клиничко-патолошких карактеристика пацијента на преживљавања до прогресије болести и укупно преживљавање

Испитиван је утицај клиничко-патолошких карактеристика *NSCLC* пацијената на стопу преживљавања до прогресије болести (PFS) униваријантном и мултиваријантном Сох-овом регресионом анализом. Мултиваријантна анализа је идентификовала пол ($p=0,040$), експресију *VEGF* ($p=0,001$) и метастазе у централном нервном систему ($p=0,001$) као независне факторе који су утицали на стопу преживљавања до прогресије болести (Табела 25).

Табела 25. Униваријантна и мултиваријантна анализа прогностичких фактора ризика на стопу преживљавања до прогресије болести

Фактор ризика	Униваријантна анализа			Мултиваријантна анализа		
	HR	95% интервал поверења	p	HR	95% интервал поверења	p
Пол	0,742	0,478-0,952	0,044	0,613	0,345-0,912	0,040
Старост	1,192	0,804-1,769	0,382	-	-	-
Пушачки статус	0,732	0,409-1,312	0,295	-	-	-
Хистолошки тип	0,938	0,624-1,411	0,760	-	-	-
T статус	0,837	0,553-1,268	0,402	-	-	-
N статус	1,823	0,919-3,617	0,086	-	-	-
Стадијум болести	1,077	0,704-1,149	0,733	-	-	-
<i>Bcl-2</i>	0,892	0,555-1,433	0,636	-	-	-
<i>Ki-67</i>	1,303	0,753-2,255	0,344	-	-	-
<i>VEGF</i>	1,441	1,827-2,511	0,038	2,256	1,652-9,325	0,001
Метастазе у централном нервном систему	4,248	2,650-6,811	0,000	6,037	3,475-10,491	0,001

Такође, испитиван је утицај клиничко-патолошких карактеристика *NSCL* пацијената на укупну стопу преживљавања (OS). Резултати униваријантне и мултиваријантне Сох-ове регресионе анализе су показали да постоји статистички значајан утицај пола ($p=0,037$), пушачког статуса ($p=0,003$), стадијума болести ($p=0,010$) и присуства метастазе у централном нервном систему ($p=0,001$) на стопу преживљавања код *NSCL* пацијената (Табела 26).

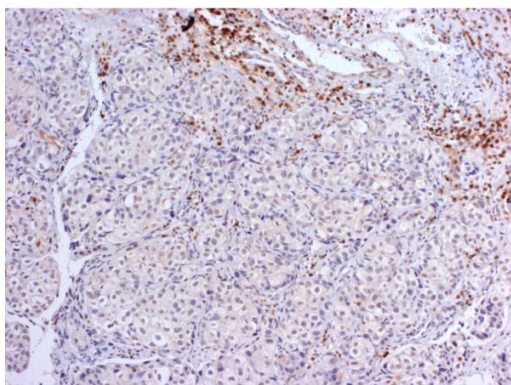
Табела 26. Униваријантна и мултиваријантна анализа прогностичких фактора ризика на укупну стопу преживљавања

Фактор ризика	Униваријантна анализа			Мултиваријантна анализа		
	HR	95% интервал поверења	p	HR	95% интервал поверења	p
Пол	0,698	0,453-0,956	0,036	0,665	0,391-0,825	0,037
Старост	0,982	0,667-1,447	0,929	-	-	-
Пушачки статус	0,641	0,365-0,856	0,018	0,852	0,428-0,993	0,003
Хистолошки тип	0,850	0,570-1,267	0,425	-	-	-
T статус	0,980	0,653-1,471	0,923	-	-	-
N статус	1,596	0,832-3,064	0,160	-	-	-
Стадијум болести	0,933	0,618-0,967	0,020	0,274	0,142-0,529	0,010
<i>Bcl-2</i>	0,782	0,490-1,247	0,302	-	-	-
<i>Ki-67</i>	1,264	0,735-2,174	0,398	-	-	-
<i>VEGF</i>	1,564	0,911-2,685	0,105	-	-	-
Метастазе у централном нервном систему	5,106	3,240-8,137	0,000	7,210	3,0611-16,984	0,001

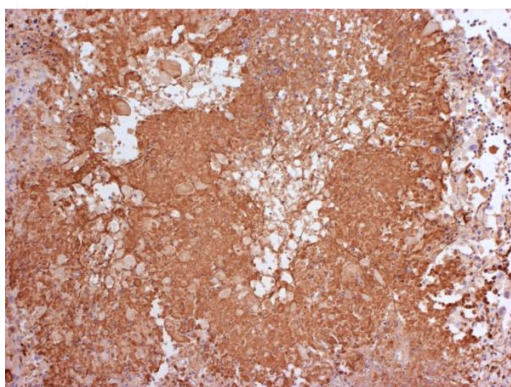
4.7. Корелација између испитиваних параметара

Показана је негативна статистички значајна корелација између експресије *Bcl-2* и *VEGF* код *NSCLC* пацијената ($p=0,039$), односно са порастом нивоа *Bcl-2* ниво *VEGF* опада (Фигура 48).

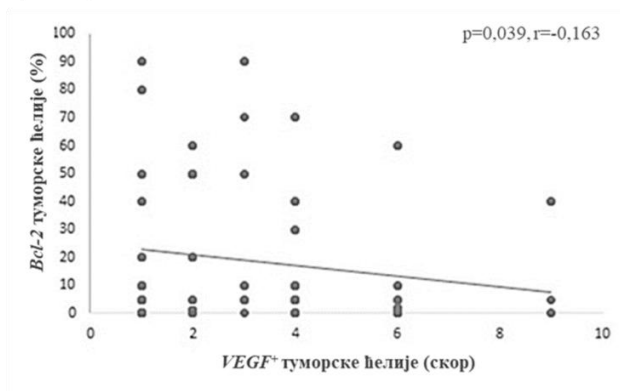
А.



В.

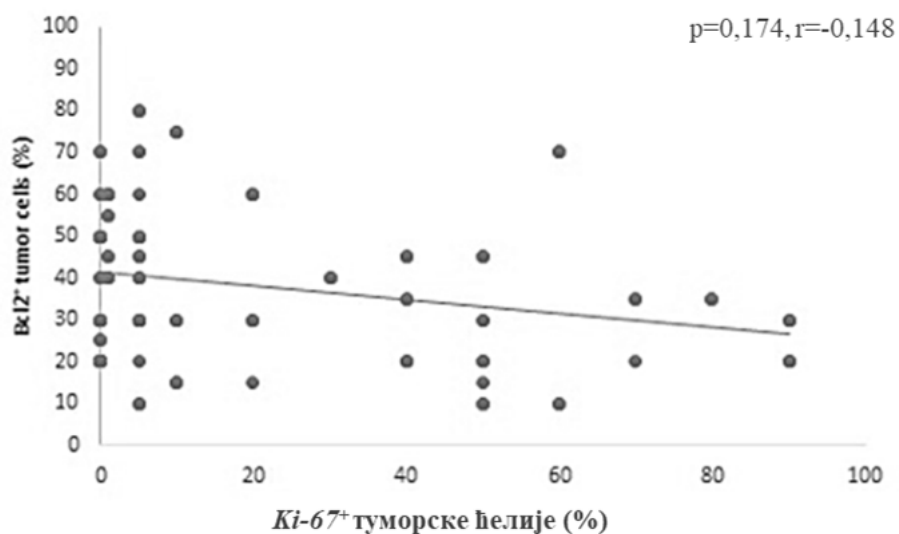


Б.



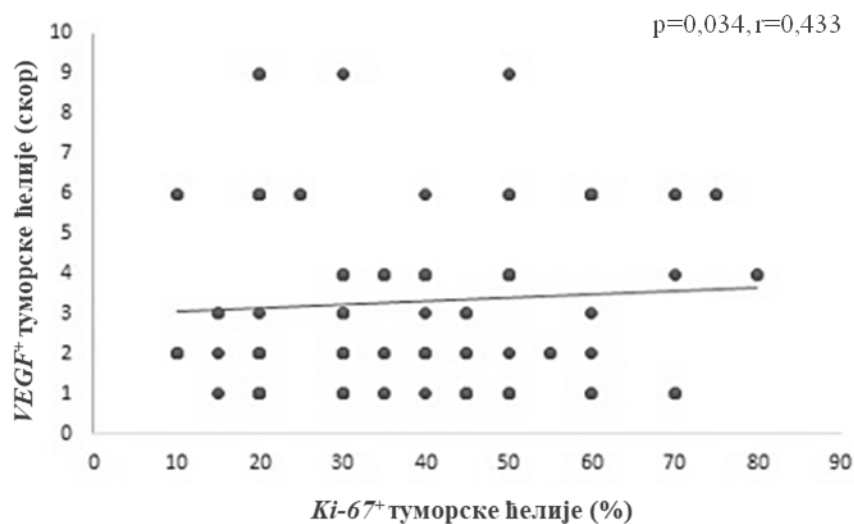
Фигура 48. А. и В. Микроморфолошки приказ инверзне корелације између *Bcl-2* и *VEGF* експресије (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x400), Б. Корелација између *Bcl-2* и *VEGF* код *NSCLC* пацијената.

Није постојала статистички значајна повезаност између *Bcl-2* и пролиферативног индекса *Ki-67* ($p=0,174$) (Фигура 49).



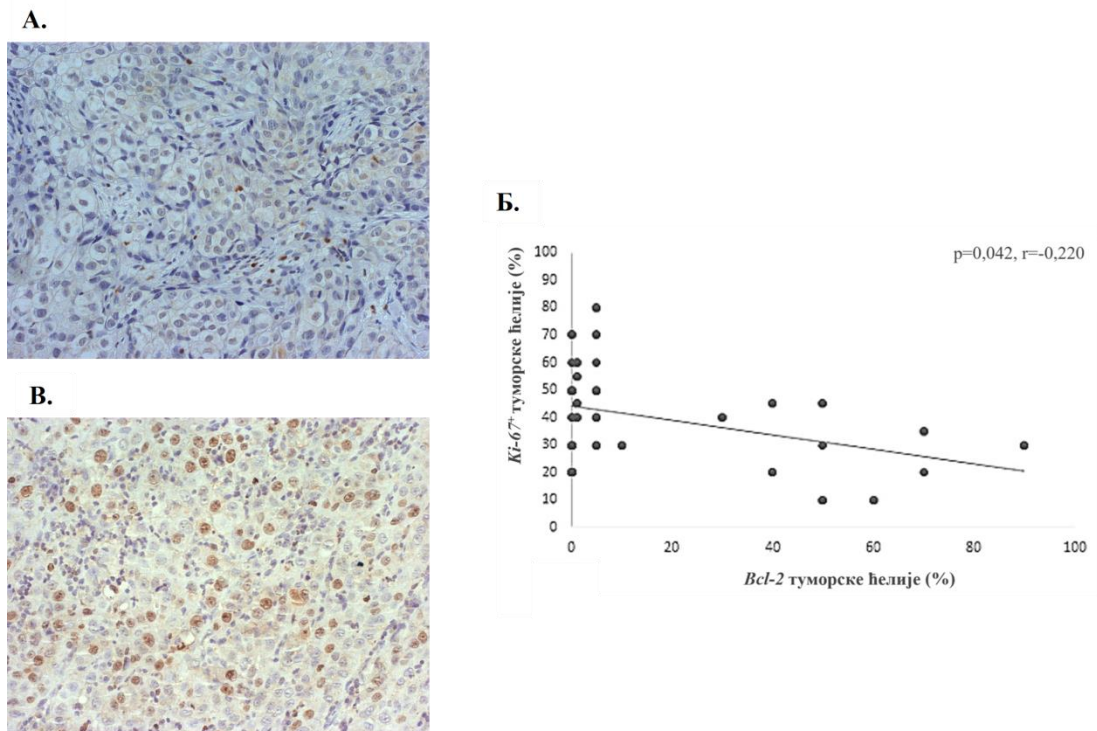
Фигура 49. Корелација између *Bcl-2* и пролиферативног индекса *Ki-67* код *NSCLC* пацијената.

Показана је позитивна корелација између пролиферативног индекса *Ki-67* и *VEGF*, односно са порастом експресије пролиферативног индекса *Ki-67* експресија *VEGF* расте (Фигура 50).



Фигура 50. Корелација између *VEGF* и пролиферативног индекса *Ki-67* код NSCLC пацијената.

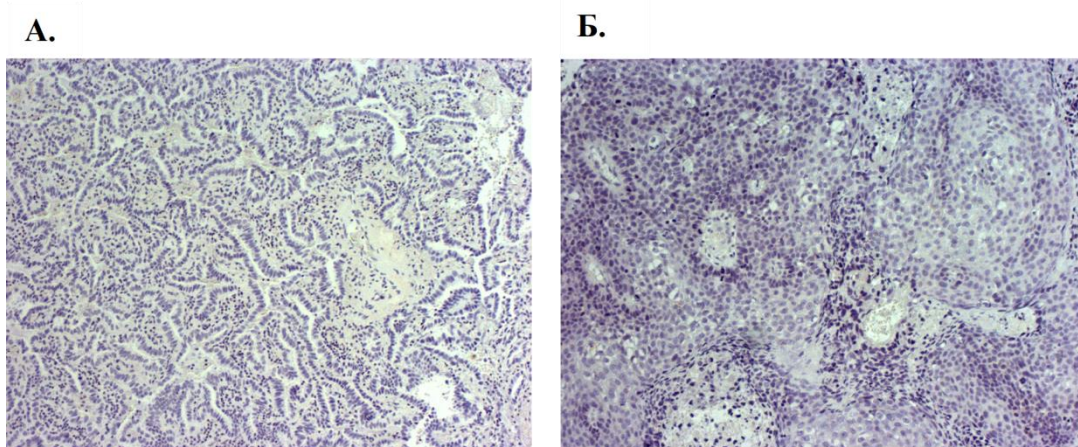
Када су посматрани само пацијенти са аденокарциномом, показана је негативна корелација између *Bcl-2* и пролиферативног индекса *Ki-67* ($p=0,042$). Сквамозна диференцијација не показује повезаност пролиферативног индекса *Bcl-2* експресије (Фигура 51).



Фигура 51. А. и В. Хистолошка слика негативне корелације између *Bcl-2* експресије и пролиферативног индекса (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x400)) Б. Корелација између *Bcl-2* и пролиферативног индекса *Ki-67* код *NSCLC* пацијената са аденокарциномом.

4.8. Анализа експресије сурвивина

Сурвивин није показао статистичку значајну разлику у односу на испитиване клиничко-патолошке карактеристике *NSCLC* пацијената ($p=0,852$) (Фигура 52).



Фигура 52. Микроморфолошки приказ сурвивина код А. аденокарцинома и Б. сквамозног карцинома *NSCLC* пацијената (имунохистохемијско бојење, оригинално увећање x400).

5. ДИСКУСИЈА

Фундаментална претпоставка савремених истраживања карцинома плућа је да се предвиђање прогнозе и предикција на терапију може побољшати комбиновањем стандардних клиничких параметара (перформанс статус, величина тумора, статус лимфних чворова и удаљених метастаза, диференцијација и.т.д), са генетским или биохемијским особинама тумора. Идентификација молекуларних маркера, који би могли да предвиде одговор тумора на примењено лечење може да омогући оптимизацију третмана за сваког пацијента. Многи гени и протеини укључени у регулацију ћелијског циклуса, процес ангиогенезе и апоптозе су дефинисани као маркери који имају значајну улогу не само у канцерогенези и дијагностици већ и у терапијском одговору и клиничком исходу код пацијената са *NSCLC* (146-148). Најбоље проучени маркери, који данас представљају стандард у дијагностици карцинома плућа су *TTF-1* и *p63*, са високом специфичношћу и сензитивношћу у диференцијацији сквамозних од примарних и секундарних аденокарцинома (149, 150). Резултати истраживања показују, поред дијагностичког и њихов прогностички значај; *p63* је повољан прогностички фактор код оболелих од сквамозног карцинома (151), прекомерна експресија *TTF-1* продужава укупно преживљавање оболелих од аденокарцинома и у раном и у одмаклом стадијуму болести (152). Ангиогени потенцијал *Bcl-2* није довољно познат, као ни начин на који туморске ћелије са прекомерном *Bcl-2* експресијом утичу на продукцију *VEGF*-а. Хипотетски, с обзиром да су раст, прогресија и метастазирање тумора зависни од ангиогенезе, очекује се да антиапоптотски ефекат чини везу између ова два молекула. Имајући у виду огроман број података из експерименталних истраживања да *Bcl-2* и *VEGF* потенцијално могу бити обећавајући терапијски циљ у индукцији апоптозе и превенцији неоангиогенезе, а на питање да су резултати клиничких истраживања недовољно јасни и предмет дебате, ова дисертација је покушала да да одговоре.

5.1. VEGF

Више од деценије уназад улога *VEGF*-а у ангиогенези као мултифункционалног цитокина који повећава микроваскуларну пропустљивост је предмет истраживања. И поред тога што су раст и сазревање нових крвних судова сложени процеси који захтевају активацију бројних рецептора као што су рецептори са тирозин киназном активношћу, ангиопоетини – *Tie 1* и *Tie 2* (рецептори тирозин киназе- *RTKs*), тромбоцитни фактор раста (енгл. *Platelet-derived growth factor- PDGF*), *VEGF* сигнални пут је ипак кључ који одређује ток ангиогенезе (153-155).

Претпоставка је да *VEGF* лиганди подржавају раст тумора не само индукујући ангиогенезу већ и делујући директно преко *VEGFR* који се налазе на ћелијама тумора, укључујући *NSCLC*, карцином дојке, простате (156-158). Како већина солидних тумора има способност *VEGF* експресије, ова експресија имплицира улогу *VEGF/VEGFR* аутокрине петље у њима активирајући различите трансдукцијске сигнале. *In vitro* студије су показале да *VEGFR* активација преко *VEGF -A* и *VEGF -B* доводи до активације *MAPK* сигналног пута у туморским ћелијама и фенотипских промена укључујући и способност миграције и инвазије (159). *VEGF* може да промовише раст тумора директним деловањем на своје рецепторе преко сигналног пута који је независан од ендотелних ћелија и на тај начин да буде додатни таргет за терапију.

VEGF експресију код *NSCLC* први пут је описао *Mattern* са сарадницима 1996. године који су врло брзо након тога показали и да је *VEGF* експресија негативан прогностички фактор код оболелих од карцинома плућа (160, 161). Прекомерна експресија *VEGF* је повезана са прогресијом туморског раста, инвазијом и

метастазирањем тумора. Резултати нашег истраживања показују *VEGF* имунореативност у 71.8% што је у складу са резултатима других аутора (162). Разлог овако високе експресије може бити тај што је експресија регулисана ангиогенином и неким транскрипционим факторима. *Jin Y* и сарадници су показали значајну разлику у експресији *VEGF* код *NSCLC* у односу на нормално плућно ткиво (79.4% vs. 16.0%; $p < 0.01$) што указује на позитивну везу између позитивне *VEGF* експресије и развоја *NSCLC* (163).

Наша анализа је такође показала да је *VEGF* експресија виша код аденокарцинома, позитивног нодалног статуса као и код тумора дијагностикованих у IV, метастатском стадијуму болести. *Usuda* и сарадници су у свом истраживању показали да је *VEGF* експресија значајно виша код аденокарцинома у односу на сквамозелуларне карциноме, као и да *VEGF* може бити позитиван регулатор функције перицита и ангиогенезе, делујући не само на пролиферацију ендотелних ћелија већ и на сазревање крвних судова тумора што би могло да резултира повољним исходом код добро диферентованог карцинома плућа (164). Ова повезаност *VEGF* експресије и хистолошког типа тумора код карцинома плућа је описана и у ранијим студијама (165, 166) и негде је и очекивана обзиром да је *VEGF* високо експримиран и код неких других аденокарцинома као што су аденокарциноми дојке и дебелог црева (167, 168).

Лимфонодалне метастазе као интегрални део *TNM* класификације играју важну улогу у стадирању болести од чега зависи избор терапијског модалитета (169). Метастатско ширење тумора кроз лимфатичну мрежу представља неповољан прогностички фактор код различитих тумора, укључујући и карцином плућа. Поред тога што су повезане са величином тумора, хистолошким типом, метастазе у лимфним чворовима су повезане и са експресијом *VEGF* и пролиферативним индексом *Ki67* (170, 171). Као што је већ речено, *VEGF* припада фамилији фактора раста која укључује *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *B VEGF-D* и *PlGF*. *VEGF-A* је повезан са ангиогенезом и има значајну улогу у пропустљивости крвних судова тумора док *VEGF-C* и *VEGF-D* имају улогу како у ангиогенези тако и у лимфогенези. *VEGFR-1* и *VEGFR-2* се налазе на ендотелним ћелијама крвних судова док *VEGFR-3* експримирају ендотелне ћелије лимфних судова и управо за овај рецептор се везује *VEGF-C* који игра улогу у лимфогенези. У складу са овим, истраживања су показала да је инциденца лимфонодалних метастаза виша код *VEGF-A* и *VEGF-C* позитивних тумора, па као такви могу послужити као предиктори присуства лимфонодалних метастаза код карцинома плућа (172, 173). Повезаност експресије *VEGF*-а и лимфонодалних метастаза показана је и у другим солидним туморима као што су карциноми једњака, простате, желуца, ректума (174-177). На прогностички значај *Ki67* у последње време се све више указује (178-182). *Ki67* је ДНА везујући нуклеопротеин који је активан током *G2*, *S*, *G2* фазе и достиже врхунац експресије у *M* фази ћелијског циклуса (183) и као такав је добар маркер пролиферације (184). Иако представља важан патохистолошки параметар у доношењу терапијских одлука код пацијената са карциномом дојке или неуроендокриним туморима гастроинтестиналног тракта (185, 186) још увек није део рутинске патохистолошке евалуације код *NSCLC*. Анализом резултата нашег истраживања показали смо статистички значајну повезаност пролиферативног индекса *Ki67* и лимфонодалних метастаза ($p < 0.05$) што је у складу са резултатима других истраживања (182, 187-189). Поред карцинома плућа, ова позитивна корелација *Ki67* и присуства лимфонодалних метастаза је показана и код карцинома оваријума (190), дојке (191), папиларног карцинома штитасте жлезде (192) указујући на тај начин да корелација ова два параметра на бољи начин рефлектује малигни потенцијал тумора у односу на само анатомску класификацију метастаза у лимфним жлездама. Како висок *Ki67* може да корелира са лимфонодалним и можданим метастазама (193, 194), његова

анализа у комбинацији са другим биомаркерима као што је *VEGF* би могла имати како прогностички значај тако и значај у откривању недетектоване метастатске болести нарочито код оперисаних пацијената без клинички доказаних лимфонодалних метастаза (172).

Ово истраживање је показало статистички значајну повезаност *VEGF* експресије и пушења. *In vitro* налази су у складу са проангиогеним ефектом никотина, никотин дакле утиче на ангиогенезу али није доказана његова улога у канцерогенези. Ефекти никотина на васкуларне структуре се остварују везивањем никотина за никотинске ацетилхолинске рецепторе (*nAChRs*) који су експримирани на нормалним али и на ћелијама карцинома плућа, чиме се промовише ангиогенеза и инхибира апоптоза изазвана хипоксијом у ендотелним ћелијама (195). *Heeschen C* и сарадници су у *Lewis*-ом моделу карцинома плућа приметили да су мишеви третирани никотином показали значајно бржи раст тумора као и да су ти тумори имали већу густину капилара у односу на контролну групу. Такође, показали су и да је концентрација *VEGF*-а била значајно виша у никотинској групи (196). Нека истраживања показују да је простациклин укључен у ангиогенезу а оно што се већ зна је да се он ослобађа из васкуларних ендотелних ћелија под утицајем никотина. Претпоставка је да су ефекти никотина посредовани и *p53* експресијом. У ћелијама без *p53* функције никотин има израженији повољан утицај на преживљавање у ћелијама третираним цитотоксичним агенсима (197). На крају, никотин индукује фактор раста фибробласта и ослобађање фактора раста који потиче од тромбоцита у ендотелним ћелијама и на тај начин подстиче пролиферацију (198, 199). *Conklin BS* и сарадници су у свом истраживању показали да никотин и котинин повећавају *VEGF* експресију у ендотелним ћелијама, показујући да котинин можда има и израженији ефекат због дужег полуживота (200). *Zhang* и сарадници су показали да никотин значајно стимулише акумулацију *HIF-1α* и *VEGF* експресију код неситноћелијског карцинома плућа (201). Утицај никотина на ангиогенезу сугеришу и резултати истраживања *Zhu* и сарадника који су показали да пасивно пушење значајно повећава величину тумора, густину капилара, *VEGF* експресију и циркулишуће ендотелне прогениторне ћелије као и да је овај ефекат супримиран мекамиламином који је инхибитор, редукујући на тај начин *VEGF* експресију (202).

Анализом резултата нашег истраживања, уочили смо значајну повезаност *VEGF* експресије и *EGFR*. У претклиничким студијама, мутације у *EGFR* гену су корелирале са *VEGF* експресијом код карцинома плућа обзиром да је показано да ћелије неситноћелијског карцинома са *EGFR* онкогеном адикцијом секретују више *VEGF*-а него што је то случај са дивљим типом несквамозног карцинома плућа (203). Разлог томе је тај што ћелије *EGFR* мутираног неситноћелијског карцинома конститутивно регулишу *HIF-1α* независно од хипоксије а зна се да *HIF-1α* индукује *VEGF* експресију (204). Истраживања су показала да су у тренутку детектоване резистенције на примену инхибитора тирозин киназе (*TKI*), резистентне ћелије имале повишен ниво *VEGF* сугеришући на тај начин на међусобну повезаност *EGFR* и *VEGF* сигналних путева. На основу ове претпоставке, резултати бројних клиничких студија показали су бенефит од дуалне *EGFR* - *VEGF* сигналне инхибиције, укључујући дуже време до прогресије болести и одлагање резистенције на *TKI* (205-207). *JO25567* је прва рандомизована проспективна студија фазе II која је испитивала ефикасност примене комбинације ерлотиниба са бевацизумабом наспрам само примене ерлотиниба у оквиру прве линије лечења узнапредовалог *EGFR* мутираног *NSCLC*. Резултати студије су показали статистички значајно продужење времена до прогресије болести са медијаном од 16.0 месеци у групи која је добијала ерлотиниб у комбинацији са бевацизумабом према 9.7 месеци у групи која је добијала само ерлотиниб (208). *ARTemis* (*CTONG 1509*), студија

фазе 3 испитивала је ефикасност примене комбинације ерлотиниба са бевацизумабом наспрам само примене ерлотиниба код претходно нетретираних азијата са узнапредовалим *EGFR* мутираним *NSCLC*. Време до прогресије је статистички значајно продужено у групи која је добијала дуалну *EGFR-VEGF* блокаду (18 наспрам 11.2 месеци, *HR*: 0.55, $p < 0.001$) (209). Истраживале су се и комбинације ефеката бевацизумаба са другим *TKI* укључујући гефитиниб и афатиниб након стечене резистенције на *TKI*, а резултати тих студија такође иду у прилог боље контроле болести (210, 211). Глобална, плацебо контролисана студија фазе 3 – *RELAY* је испитивала ефикасност комбинације ерлотиниба са рамуцирумабом наспрам примене ерлотиниба са плацебом чији су резултати показали статистички значајно продужење времена до прогресије болести са медијаном од 19.4 месеци у групи која је добијала ерлотиниб у комбинацији са рамуцирумабом према 12.4 месеци у групи која је добијала ерлотиниб у комбинацији са плацебом (*HR*: 0.59, $p < 0.0001$) уз значајно дуже трајање одговора (18.0 наспрам 11.1 месецим $p = 0.0003$) (212). Резултати свих ових студија су етаблирали бенефит дуалне *EGFR-VEGF* блокаде код *NSCLC* са *EGFR* онкогеном адикцијом.

Отприлике 50% тумора мозга чине метастатски тумори чије примарно исходиште у највећем броју случајева чине плућа (43%), дојка (15.7%) и меланом (16.4%)(213). Десет процената пацијената има метастазе на мозгу у моменту постављања дијагнозе *NSCLC*, а око 40% пацијената са карциномом плућа ће добити мождане метастазе током лечења (214, 215). У нашој испитиваној групи пацијената, 34% је имало детектоване ЦНС метастазе. Такође, регистрована је статистички значајна повезаност *VEGF* експресије и ЦНС метастаза ($p = 0.005$). Ангиогенеза игра главну улогу у развоју многих патолошких ангиогених процеса у ЦНС-у, нарочито када је у питању раст тумора и у корелацији је са степеном малигности и агресивности можданих тумора (216). Да *VEGF* стимулише ангиогенезу тумора ЦНС-а говори чињеница да *VEGF* стварају ћелије глиома у *in vitro* условима код којих је и доказано присуство *VEGFR* као што је и доказано да се експериментално индукована ангиогенеза и раст можданих тумора миша могу специфично инхибисати анти- *VEGF* моноклонским антителима (217). Као што је познато, експресија *VEGF* је примарно одређена хипоксијом што је и показано у *in vitro* условима на астроцитима код којих, када су изложени хипоксији, долази до повећане експресије *VEGF*-а (218). *Yano* и сарадници су у свом истраживању показали да је ниво *VEGF* експресије у хуманим ћелијама тумора у директној корелацији са ангиогенезом и растом можданих метастаза, нарочито када су у питању ћелије колоректалног карцинома и аденокарцинома плућа као и да инхибиција *VEGF*-а представља важан терапијски циљ. Током последњих година, примена различитих терапијских модалитета у лечењу *NSCLC* је довела до боље локалне контроле болести и дужег преживљавања, па је из тих разлога важно идентификовати пацијенте који су у већем ризику од развоја можданих метастаза за које је неопходно наћи одговарајући терапијски приступ у будућности (219, 220). *Saad* и сарадници су у свом истраживању показали да пацијенти са *NSCLC* и високим *Ki67* индексом, високом *VEGF*-C експресијом, ниском каспаза-3 и ниском експресијом Е-кадрина имају виши ризик од развоја можданих метастаза (221). Пацијенти са високим индексом пролиферације *Ki67* имају 12 пута већи ризик од појаве можданих метастаза и лошију прогнозу у односу на пацијенте са ниском *Ki67* индексом пролиферације (222). Наши резултати не показују статистички значајну повезаност високе *Ki67* вредности и појаве можданих метастаза ($p = 0.066$) али смо уочили висок проценат *Ki67* позитивних ћелија код оних пацијената који су имали мождане метастазе. Литературни подаци све више указују на прогностички значај *Ki67*, такође наша студија је то показала. Дакле, са порастом вредности *Ki67* експресија *VEGF* расте

чиме се показује њихов синергизам а тиме и на индиректан начин указује на то да је висока *VEGF* експресија показатељ лоше прогнозе. *Tekenaka* и сарадници су у свом истраживању показали корелацију експресије *VEGF* и *Ki67* као и њихову повезаност са стандардизованом вредношћу преузимања радиофармака (*Standardized uptake value – SUV* и њена максимална вредност *SUVmax*). На тај начин, одређивањем односа *SUVmax* и биолошких маркера пролиферације и ангиогенезе који утичу на прогресију тумора, *FDG-PET* би могао бити користан у дијагностичком алгоритму али и за процену терапијског одговора и за предикцију прогнозе код *NSCLC* (223).

У даљем истраживању испитивали смо повезаност *VEGF* експресије и примене антиангиогеног агенса бевацизумаба код аденокарцинома. Иако подаци о прогностичком значају *VEGF* експресије датирају још од 1990. године, први инхибитор ангиогенезе који таргетира *VEGF* је бевацизумаб, одобрен је од стране Америчке управе за храну и лекове (*Food and Drug Administration- FDA*) тек 2004. године (224). Анализом наших резултата утврдили смо да је примена анти *VEGF* терапије остварила статистички значајан утицај на преживљавање пацијената као и на време до прогресије болести. Овакав налаз је у складу са резултатима ранијих студија на основу којих је бевацизумаб у комбинацији са хемиотерапијским дублетом део терапијског алгоритма за лечење локално узнапредовалог и метастатског *NSCLC*. Рандомизована студија фазе III, *ECOG 4599* укључила је пацијенате са локално узнапредовалим и метастатским несквамозним карциномом плућа код којих је примењена хемиотерапија паклитаксел-карбоплатин у комбинацији са бевацизумабом поредила са групом пацијената који су добијали само хемиотерапијски дублет. Резултати студије су показали статистички значајно продужење *PFS* и *OS* са *mOS* од 12.3 месеци у групи која је примала бевацизумаб према 10.3 месеци у групи која није добијала антиангиогенезни агенс (84). *Johnson* и сарадници су такође показали да је додавање антиангиогеног агенса бевацизумаба цисплатинском дублету у првој линији терапије довело до побољшања *ORR*, *PFS* и *OS* али и до више стопе хемоптизија нарочито код оних пацијената са сквамозним хистолошким типом карцинома, кавитираним лезијама и централно локализованим туморима (225). Међутим, студије су показале да блокирање ендогеног *VEGF*-а бевацизумабом није инхибирало раст ћелија *NSCLC* што сугерише да сам *VEGF* као такав не одржава пролиферацију туморских ћелија *in vitro*, па се верује да је развој *NSCLC* резултат деловања комбинације различитих фактора туморског микроокружења (енг: *Tumor microenvironment – TME*) (203, 226). Како *VEGF* нема само улогу у ангиогенези већ и делујући на *TME* супримира имунолошку активацију и подстиче локалну и системску имуносупресију, све је више доказа о потенцијалној синергистичкој ефикасности *VEGF/VEGFR* циљане терапије и инхибитора контролних тачака (енг: *Immune checkpoint inhibitors -ICIs*) (227). Неке клиничке студије које испитују примену антиангиогених лекова у комбинацији са *ICIs* су у току. Резултати првих истраживања иду у прилог томе да додавање *ICIs* комбинацији бевацизумаб-хемиотерапијски дублет статистички значајно доводи до побољшања *PFS* и *OS* (82, 228). Избор антиангиогеног агенса, *ICIs* као и праве терапијске комбинације, испитивање безбедности и ефикасности примењених терапеутика је оно чиме ће се бавити будућа клиничка истраживања.

Сваке године се у свету региструје близу два милиона новодијагностикованих пацијената са карциномом плућа. Отприлике 30% оних пацијената код којих је болест откривена у четвртој стадијуму болести умире унутар 3 месеца од постављања дијагнозе због чега је карцином плућа водећи узрок смрти међу малигним болестима (229). У нашој групи од 216 пацијената са локално узнапредовалим и метастатским *NSCLC* регистрована стопа двогодишњег преживљавања је 39.3%. Детектован је статистички значајан утицај пола и *VEGF* експресије на време до прогресије болести.

Интересантно, *VEGF* експресија није имала значајан утицај на укупно преживљавање у овој испитиваној групи али јесу старост, пол, присуство можданих метастаза и стадијум болести. Друге испитиване карактеристике пацијената и тумора нису испољиле статистички значајан утицај на преживљавање пацијената.

Када је посматран целокупан узорак испитаника, показано је да није постојао статистички значајан утицај *VEGF* експресије на преживљавање ($p=0,095$) као ни утицај експресије на преживљавање у зависности од хистолошког типа тумора. Али, показана је статистичка значајност утицаја *VEGF* експресије на преживљавање код пацијената у IV стадијуму болести ($p=0,048$) што није случај код пацијената у III стадијуму болести ($p=0,884$).

Резултати бројних истраживања иду у прилог томе да је висока *VEGF* експресија повезана са лошом прогнозом код карцинома плућа (230-233). Мета-анализа која је анализирала резултате 51 студије, обухватила 5386 пацијената, показује да резултати 28 студија идентификује високу *VEGF* експресију као индикатор лоше прогнозе док резултати 23 студије нису показале статистички значајан утицај *VEGF* експресије на преживљавање (231). Са друге стране, *Usuda* и сарадници нису доказали прогностичку вредност *VEGF* експресије код ресектабилног карцинома плућа (164). *Liao* и сарадници су такође анализирали ресектабилни *NSCLC* и показали да није постојала статистички значајна разлика у 5-годишњем преживљавању између оних пацијената са *VEGF* позитивним и *VEGF* негативним туморима. Оно што је интересно у њиховом истраживању јесте већа стопа *VEGF* експресије код I и II стадијума болести него што је то забележено код III стадијума, указујући на тај начин да је неоангиогенеза можда израженија у раним фазама канцерогенезе а да неки други биолошки фактори као што је *p53* касније одређују значај *VEGF*-а у предикцији прогнозе (234). *Ludovini* и сарадници такође нису показали значајну разлику у укупном преживљавању у односу на то да ли се радило о *VEGF* позитивним или негативним туморима плућа у III и IV стадијуму болести (235). Поред тога, и други радови су објавили да *VEGF* експресија није била у корелацији са преживљавањем пацијената са карциномом дојке (236), оралног карцинома сквамозних ћелија (237), карцинома грлића материце (238). Оно чиме би се сви ови контроверзни резултати истраживања могли објаснити су различита коришћена антитела за имунохистохемијску анализу, *cut off* вредности, величина узорка, хетерогеност тумора и слично (118).

5.2. Сурвивин

Сурвивин није показао статистичку значајност у односу на испитиване клиничкопатолошке карактеристике *NSCLC*-а. С друге стране у студији *Liang* и сарадници су испитивали потенцијалну корелацију експресије протеина сурвивина са *NSCLC* и његовим клиничкопатолошким карактеристикама. Анализом су утврдили већу експресију сурвивина код пацијената са *NSCLC* у поређењу са нормалним контролама. Експресија сурвивина била је повезана са клиничкопатолошким карактеристикама *NSCLC* и може послужити као важан биомаркер за прогресију *NSCLC* (142).

5.3. Bcl-2

Способност ћелија да избегну апоптозу и наставе са пролиферацијом је једна од основних карактеристика канцерогенезе. *Bcl-2* онкопротеин је кључни регулатор митохондријалног пута апоптозе, али не функционише само као антиапоптотички молекул већ и индукцијом неефикасне ДНК синтезе изазива ДНК репликациони стрес (239). Први пут је детектован као онкоген код Б-ћелијских малигнитета (240). *Bcl-2* је

експримиран и у нелимфоидном ткиву као што су ћелије нервног система и епител (241) а чињеница да је експримиран у нормалном епитеном ткиву указује на могућност његове експресије и у малигним ћелијама. Прекомерна *Bcl-2* експресија је описана код различитих тумора, па и код карцинома плућа (242-244). Повезује се са прогресијом тумора, укључујући појаву метастаза у јетри код карцинома дебелог црева (118), са лимфоваскуларном инвазијом код карцинома дојке (121) и са стадијумом болести код карцинома желуца (245). Такође, показано је да се експресија *Bcl-2* мења током прогресије од пре-инвазивних лезија до инвазивног карцинома плућа (246). Како транслокација 14. и 18. хромозома није пронађена код карцинома плућа апсолутно је непознат узрок прекомерне *Bcl-2* експресије код ових тумора. Претпоставља се да би промене у контроли транслокације *mRNA* могле да доведу до аберантне акумулације *Bcl-2* онкопротеина (247).

Shibata и сарадници пријављују *Bcl-2* експресију код 29.1% *NSCLC* и код 44.4% сквамoцелуларних карцинома плућа (248). Резултати овог, али и других истраживања су у складу са резултатима нашег рада који показују *Bcl-2* имунореактивност код 41,4% *NSCLC*, и то 44.2% у III и 40.7% у IV стадијуму болести, а када се погледају подргрупе испитиване популације 51% сквамoцелуларних карцинома и 34,8% аденокарцинома су били *Bcl-2* позитивни. Сквамoцелуларна диференцијација карцинома плућа је повезана са вишим процентом *Bcl-2* имунореактивности у односу на аденокарциноме што је у складу са резултатима из литературе (242, 249, 250). Према резултатима истраживања *Bcl-2* експресија се код ресектабилног *NSCLC* креће од 20-44% (251-254) док се код локално узнапредовалог и метастатског *NSCLC* пријављују резултати 8-58% (255-257) што указује на чињеницу да је *Bcl-2* експресија независна од стадијума болести.

Даље, наши резултати показују повезаност *Bcl-2* експресије са хистолошким градусом и моноклеарном стромалном реакцијом. Експресија *Bcl-2* није била повезана са полом, пушачким статусом, хистолошким типом, Т и N дескриптором као ни са стадијумом болести. *Suri C* у свом истраживању показује прекомерну *Bcl-2* експресију код слабо диферентованих сквамoцелуларних тумора оралне регије (258). Како се прекомерна *Bcl-2* експресија повезује са високим хистолошким градусом тумора може се сматрати да је то још једна од раније утврђених неповољних хистопатолошких карактеристика тумора. Предпоставља се да ова прекомерна *Bcl-2* експресија одражава отпорност туморских ћелија на апоптозу чиме се продужава преживљавање. Са друге стране, *Petrisor* и сарадници су показали да је *Bcl-2* експресија нижа код слабо диферентованих карцинома дебелог црева у односу на ниско-градусне туморе чиме се може објаснити боља прогноза *Bcl-2* позитивних тумора (259). Код карцинома плућа није пронађена веза између експресије *Bcl-2* и степена диференцијације тумора (242, 247). Резултати нашег истраживања показују да се прекомерна *Bcl-2* експресија повезује са туморском дедиференцијацијом и агресивнијим понашањем тумора.

Испитивањем утицаја *Bcl-2* експресије на преживљавање утврдили смо да није постојао статистички значајан утицај *Bcl-2* експресије на преживљавање када је посматрана целокупно испитивана популација *NSCLC* пацијената, али када је испитиван утицај *Bcl-2* експресије на преживљавање у зависности од хистолошког подтипа, показан је статистички значајан утицај овог параметра код пацијената са аденокарциномом као и код пацијената са сквамoцелуларним карциномом плућа. Такође, ово истраживање је показало да *Bcl-2* позитивни аденокарциноми имају статистички значајно дуже преживљавање у односу на *Bcl-2* позитивне сквамoцелуларне карциноме, $p=0.001$. Утицај експресије *Bcl-2* протеина на прогнозу код *NSCLC* пацијената показује контроверзе. Поједина истраживања су показала да је експресија *Bcl-2* добар прогностички индикатор, што делује као парадокс обзиром да је

његова основна функција инхибиција апоптозе (235, 255, 260, 261). Мета-анализа *Zhang* и сарадника показује повезаност *Bcl-2* позитивности и бољег преживљавања осим када је у питању I стадијум болести, док са друге стране поједина истраживања долазе до закључка да *Bcl-2* експресија нема никакву прогностичку значајност или је чак повезана са лошим исходом (116, 262). Утицај *Bcl-2* експресије на преживљавање показује супротстављена мишљења и када су у питању хистолошке подгрупе. *Feng* и сарадници су у свом истраживању показали да *Bcl-2* позитивни сквамозеларни карциноми плућа имају боље преживљавање (263), резултати *Anagnostou* и сарадника иду у прилог бољег преживљавања оних пацијената са несквамозном хистологијом (242), али има и резултата где је преживљавање *Bcl-2* позитивних пацијената независно од хистолошког типа тумора. Механизми преко којих би *Bcl-2* код *NSCLC* могао да испољи заштитни ефекат су у и даље недовољно јасни. Како *Bcl-2* као антиапоптотски протоонкоген има могућност да продужи преживљавање ћелије претпоставља се да је његова експресија повезана са другим повољним прогностичким карактеристикама као што су одсуство експресије *c-erb-B2* и *p53* мутације (264). Према хипотези *Gurova* и сарадника, губитак апоптозе инактивацијом *p53* доводи до генетске нестабилности и прогресије тумора, док губитак апоптозе преко прекомерне *Bcl-2* експресије ствара генетски стабилне туморе који избегавају селективни притисак да инактивирају *p53* па су мање склони прогресији и самим тим имају бољу прогнозу (265).

Резултати нашег истраживања показује инверзну корелацију *Bcl-2* и *VEGF*. Овакав резултат приказују и друга истраживања али претежно код оперисаних карцинома плућа (266, 267). Бројна ранија истраживања су показала да прекомерна експресија *Bcl-2* својим антиапоптотским својствима повећава степен пролиферације, поспешује миграторни, инвазивни и метастатски потенцијал тумора (268-270). С обзиром да су раст и прогресија тумора зависни од степена неоваскуларизације, логична је могућа повезаност анти-апоптозе са стварањем или повећањем проангиогеног фенотипа (269, 271). Експерименталне *in vitro* и *in vivo* анализе су недвосмислено ово и показале, извесивши о позитивној корелацији између прекомерне *Bcl-2* експресије и продукције *VEGF* молекула у туморима дојке, простате, неуробласту и меланому. Међутим, резултати клиничких истраживања показују да је ова повезаност недовољно јасна и много компликованија, и да вероватно генотипска хетерогеност тумора условљава активирање других интраћелијских сигналних путева које би независно од *Bcl-2* статуса регулисала експресију *VEGF*. Ово поткрепљује и чињеница да експресија *VEGF* није увек у корелацији са микроваскуларном густином тумора. Такође, резултати клиничких истраживања, посебно на пољу карцинома плућа, показују да прекомерна експресија *Bcl-2* може као повољан прогностички фактор бити у инверзној корелацији са *VEGF*-ом (272, 273) али и у позитивној корелацији са негативном прогностичком импликацијом (274, 275). Такође, показано је да *p53* онкопротеин регулише неоваскуларизацију индукцијом инхибитора ангиогенезе, тромбоспондина-1 док са друге стране *Bcl-2* може да инхибира *p53* што се повезује са стимулацијом неоангиогенезе. На тај начин, *Bcl-2* може да регулише ангиогенезу било стимулацијом ослобађања инхибитора ангиогенезе или супресијом ангиогених фактора преко сигнала путева који су другачији у односу на *p53* (276).

Показали смо да код *NSCLC* пацијената није постојала статистички значајна повезаност *VEGF* и пролиферативног индекса *Ki67* ($p=0,174$), али када су посматране хистолошке подгрупе показана је негативна корелација *Bcl-2* и *Ki67* ($p=0,042$) код аденокарцинома. Овакав резултат само додатно показује сложену функцију *Bcl-2* онкопротеина узимајући у обзир његову улогу инхибитора апоптозе и утицај на ћелијску пролиферацију. Поједина истраживања су показала негативну корелацију *Bcl-2* и *Ki67* код карцинома дојке (277). Са друге стране, позитивна корелација *Bcl-2* и *Ki67*

која је описана код сквамозелуларног карцинома усне дупље (278), карцинома дојке (279) сугерише да је прекомерна *Bcl-2* експресија узрокована пролиферативним потенцијалом који индукује *Ki67* и последично се повезује са лошом прогнозом болести

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Имунореактивност за *Bcl-2* доказана имунохистохемијском методом постоји код 41,4% NSCLC.
2. Експресија *Bcl-2* позитивних туморских ћелија статистички значајно се разликује према хистолошком облику NSCLC.
 - а) сквамозелуларни карциноми показују већу експресију *Bcl-2* (51,0%), у односу на аденокарциноме (34,8%).
 - б) експресија *Bcl-2* позитивних туморских ћелија већа је у туморима са вишим хистолошким градусом
 - в) експресија *Bcl-2* позитивних туморских ћелија је повезана са слабом стромалном моноклеарном реакцијом.
3. Експресија *Bcl-2* позитивних туморских ћелија није била повезана са полом, пушачким статусом, Т и Н дескриптором као ни са стадијумом болести.
4. Експресија *Bcl-2* је у негативној корелацији са високим индексом пролиферације *Ki67* код аденокарцинома.
5. Виши ниво експресије *Bcl-2* позитивних туморских ћелија био је заступљен код пацијената који су имали коморбидитете на плућима.
6. Постоји значајна повезаност између *Bcl-2* позитивних туморских ћелија и преживљавања болесника са узнапредовалим NSCLC.
 - а) двогодишње преживљавање било је статистички значајно дуже у групи пацијената са аденокарциномом плућа и *Bcl-2* позитивним туморским ћелијама у односу на сквамозелуларни карцином са *Bcl-2* позитивним туморским ћелијама.
7. Имунореактивност за *VEGF* доказана имунохистохемијском методом постоји код 71,8% NSCLC.
8. Експресија *VEGF* позитивних туморских ћелија статистички значајно се разликује према хистолошком подтипу NSCLC, аденокарциноми показују већу експресију *VEGF* (82,2%), у односу на сквамозелуларне карциноме плућа (56,0%).
9. Експресија *VEGF* је била повезана са хистолошким типом, хистолошким градусом, Т и Н дескриптором.
10. Постоји значајна повезаност *VEGF* експресије и присуства метастаза у централном нервном систему, значајно већа *VEGF* експресија је показана код пацијената који су имали метастазе у централном нервном систему у односу на оне код којих метастазе нису постојале.
11. Постоји значајна повезаност између експресија *VEGF* и преживљавања пацијената у стадијуму IV NSCLC.
12. Експресија *VEGF* је повезана са применом анти-ангиогеног агенса у терапијском протоколу, додавање антиангиогеног агенса хемиотерапијском дублету довело је до продужења PFS i OS код пацијената са аденокарциномом плућа.
13. Постоји негативна корелација између експресије *VEGF* и *Bcl-2* експресије.
14. Експресија *VEGF* је у позитивној корелацији са пролиферативним индексом *Ki67*.
15. Експресија сурвивина није показала статистичку значајност у односу на испитиване клиничкопатолошке карактеристике NSCLC-а.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
2. First author Rebecca L. Siegel. Cancer Statistics, 2021. Published early online January 12, 2021 in *CA Cancer Journal for Clinicians*. First author Rebecca L. Siegel, MPH, American Cancer Society, Atlanta, Ga. 2021 [Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf>].
3. Jeon J, Holford TR, Levy DT, Feuer EJ, Cao P, Tam J, et al. Smoking and Lung Cancer Mortality in the United States From 2015 to 2065: A Comparative Modeling Approach. *Ann Intern Med*. 2018;169(10):684-93.
4. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html> [
5. <https://www.batut.org.rs/index.php?content=2096> [
6. Kinoshita FL, Ito Y, Morishima T, Miyashiro I, Nakayama T. Sex differences in lung cancer survival: long-term trends using population-based cancer registry data in Osaka, Japan. *Jpn J Clin Oncol*. 2017;47(9):863-9.
7. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/, based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020. [
8. Walser T, Cui X, Yanagawa J, Lee JM, Heinrich E, Lee G, et al. Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(8):811-5.
9. Hecht SS. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int J Cancer*. 2012;131(12):2724-32.
10. Vodič za dijagnostikovanje i lečenje karcinoma pluća. Available from: [http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Decembar/Vodici/Vodic za dijagnostikovanje i lecenje karcinoma pluća.pdf](http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Decembar/Vodici/Vodic%20za%20dijagnostikovanje%20i%20lecenje%20karcinoma%20pluca.pdf).
11. Omenn GS, Merchant J, Boatman E, Dement JM, Kuschner M, Nicholson W, et al. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. *Environ Health Perspect*. 1986;70:51-6.
12. Hollings N, Shaw P. Diagnostic imaging of lung cancer. *Eur Respir J*. 2002;19(4):722-42.
13. Deslauriers J, Grégoire J. Clinical and surgical staging of non-small cell lung cancer. *Chest*. 2000;117(4 Suppl 1):96s-103s.
14. Thompson BH, Stanford W. MR imaging of pulmonary and mediastinal malignancies. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2000;8(4):729-39.
15. Melek H, Gunluoglu MZ, Demir A, Akin H, Olcmen A, Dincer SI. Role of positron emission tomography in mediastinal lymphatic staging of non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;33(2):294-9.
16. Iannettoni MD. Staging strategies for lung cancer. *Jama*. 2010;304(20):2296-7.
17. Mazzone P, Jain P, Arroliga AC, Matthay RA. Bronchoscopy and needle biopsy techniques for diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2002;23(1):137-58, ix.
18. Toloza EM, Harpole L, Detterbeck F, McCrory DC. Invasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):157s-66s.
19. Sun J, Garfield DH, Lam B, Yan J, Gu A, Shen J, et al. The value of autofluorescence bronchoscopy combined with white light bronchoscopy compared with white light alone in

the diagnosis of intraepithelial neoplasia and invasive lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Oncol.* 2011;6(8):1336-44.

20. Bojan Z, Branislav P, Aleksandra J, Goran S, Miroslav ID, Ilija A, et al. Influence of narrow band imaging (NBI) videobronchoscopy on the assessment of central lung cancer extension and therapeutic decision. *Cancer Invest.* 2009;27(9):918-23.

21. Kinoshita F, Kato T, Sugiura K, Nishimura M, Kinoshita T, Hashimoto M, et al. CT-guided transthoracic needle biopsy using a puncture site-down positioning technique. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(4):926-32.

22. Gress FG, Savides TJ, Sandler A, Kesler K, Conces D, Cummings O, et al. Endoscopic ultrasonography, fine-needle aspiration biopsy guided by endoscopic ultrasonography, and computed tomography in the preoperative staging of non-small-cell lung cancer: a comparison study. *Ann Intern Med.* 1997;127(8 Pt 1):604-12.

23. Fritscher-Ravens A, Bohuslavizki KH, Brandt L, Bobrowski C, Lund C, Knöfel WT, et al. Mediastinal lymph node involvement in potentially resectable lung cancer: comparison of CT, positron emission tomography, and endoscopic ultrasonography with and without fine-needle aspiration. *Chest.* 2003;123(2):442-51.

24. Annema JT, van Meerbeeck JP, Rintoul RC, Doooms C, Deschepper E, Dekkers OM, et al. Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: a randomized trial. *Jama.* 2010;304(20):2245-52.

25. Metin M, Citak N, Sayar A, Pekcolaklar A, Melek H, Kök A, et al. The role of extended cervical mediastinoscopy in staging of non-small cell lung cancer of the left lung and a comparison with integrated positron emission tomography and computed tomography: does integrated positron emission tomography and computed tomography reduce the need for invasive procedures? *J Thorac Oncol.* 2011;6(10):1713-9.

26. De Leyn P, Doooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R, et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45(5):787-98.

27. Travis WD, Garg K, Franklin WA, Wistuba, II, Sabloff B, Noguchi M, et al. Evolving concepts in the pathology and computed tomography imaging of lung adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(14):3279-87.

28. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(2):244-85.

29. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(5):668-84.

30. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022;17(3):362-87.

31. Matsubara D, Soda M, Yoshimoto T, Amano Y, Sakuma Y, Yamato A, et al. Inactivating mutations and hypermethylation of the NKX2-1/TTF-1 gene in non-terminal respiratory unit-type lung adenocarcinomas. *Cancer Sci.* 2017;108(9):1888-96.

32. Hwang DH, Sholl LM, Rojas-Rudilla V, Hall DL, Shivdasani P, Garcia EP, et al. KRAS and NKX2-1 Mutations in Invasive Mucinous Adenocarcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol.* 2016;11(4):496-503.

33. Snyder EL, Watanabe H, Magendantz M, Hoersch S, Chen TA, Wang DG, et al. Nkx2-1 represses a latent gastric differentiation program in lung adenocarcinoma. *Mol Cell.* 2013;50(2):185-99.

34. Sugano M, Nagasaka T, Sasaki E, Murakami Y, Hosoda W, Hida T, et al. HNF4 α as a marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):211-8.
35. Chang JC, Offin M, Falcon C, Brown D, Houck-Loomis BR, Meng F, et al. Comprehensive Molecular and Clinicopathologic Analysis of 200 Pulmonary Invasive Mucinous Adenocarcinomas Identifies Distinct Characteristics of Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res*. 2021;27(14):4066-76.
36. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, et al. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(12):3087-93.
37. Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer*. 1948 Nov 1;1(4):634–56. .
38. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.
39. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest*. 1986;89(4 Suppl):225s-33s.
40. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(5):568-77.
41. Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. (eds). *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th edition. Oxford: John Wiley & Sons, Inc. 2016.
42. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, Ball D, Kim J, Lyons G, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(7):990-1003.
43. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39-51.
44. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, Bazhenova LA, Borghaei H, Camidge DR, et al. Non-small cell lung cancer, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(12):1738-61.
45. Oken MM, Hocking WG, Kvale PA, Andriole GL, Buys SS, Church TR, et al. Screening by chest radiograph and lung cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) randomized trial. *Jama*. 2011;306(17):1865-73.
46. Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med*. 2006;355(17):1763-71.
47. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409.
48. Gierada DS, Pinsky P, Nath H, Chiles C, Duan F, Aberle DR. Projected outcomes using different nodule sizes to define a positive CT lung cancer screening examination. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(11).
49. De Koning H, Van Der Aalst C, Ten Haaf K et al. Effects of volume CT lung cancer screening: Mortality results of the NELSON randomized-controlled population based trial. *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 13, Issue 10, S185

50. Ten Haaf K, van Rosmalen J, de Koning HJ. Lung cancer detectability by test, histology, stage, and gender: estimates from the NLST and the PLCO trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(1):154-61.
51. . NCCN Guidelines Version 12020 Lung CAncer Screening Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/lung_screeningpdf
52. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
53. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl_4):iv1-iv21.
54. Lindberg K, Nyman J, Riesenfeld Källskog V, Hoyer M, Lund J, Lax I, et al. Long-term results of a prospective phase II trial of medically inoperable stage I NSCLC treated with SBRT - the Nordic experience. *Acta Oncol.* 2015;54(8):1096-104.
55. Verstegen NE, Lagerwaard FJ, Hashemi SM, Dahele M, Slotman BJ, Senan S. Patterns of Disease Recurrence after SABR for Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer: Optimizing Follow-Up Schedules for Salvage Therapy. *J Thorac Oncol.* 2015;10(8):1195-200.
56. Veluswamy RR, Ezer N, Mhango G, Goodman E, Bonomi M, Neugut AI, et al. Limited Resection Versus Lobectomy for Older Patients With Early-Stage Lung Cancer: Impact of Histology. *J Clin Oncol.* 2015;33(30):3447-53.
57. Koike T, Kitahara A, Sato S, Hashimoto T, Aoki T, Koike T, et al. Lobectomy Versus Segmentectomy in Radiologically Pure Solid Small-Sized Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg.* 2016;101(4):1354-60.
58. Petrella F, Spaggiari L. The smaller the better: a new concept in thoracic surgery? *Lancet Oncol.* 2016;17(6):699-700.
59. Lang-Lazdunski L. Surgery for nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev.* 2013;22(129):382-404.
60. Lim E, Baldwin D, Beckles M, Duffy J, Entwisle J, Faivre-Finn C, et al. Guidelines on the radical management of patients with lung cancer. *Thorax.* 2010;65 Suppl 3:iii1-27.
61. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008;26(21):3552-9.
62. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonz  les-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(9):719-27.
63. Tsitsias T, Boulemden A, Ang K, Nakas A, Waller DA. The N2 paradox: similar outcomes of pre- and postoperatively identified single-zone N2a positive non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45(5):882-7.
64. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1919-29.
65. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;379(24):2342-50.
66. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(3):239-46.

67. Yang JC, Shih JY, Su WC, Hsia TC, Tsai CM, Ou SH, et al. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(5):539-48.
68. Remon J, Hendriks LEL, Cardona AF, Besse B. EGFR exon 20 insertions in advanced non-small cell lung cancer: A new history begins. *Cancer Treat Rev.* 2020;90:102105.
69. Park K, Haura EB, Leighl NB, Mitchell P, Shu CA, Girard N, et al. Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results From the CHRYSALIS Phase I Study. *J Clin Oncol.* 2021;39(30):3391-402.
70. Zhou C, Ramalingam SS, Kim TM, Kim SW, Yang JC, Riely GJ, et al. Treatment Outcomes and Safety of Mobocertinib in Platinum-Pretreated Patients With EGFR Exon 20 Insertion-Positive Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase 1/2 Open-label Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2021;7(12):e214761.
71. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5216-23.
72. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2167-77.
73. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JCH, Han JY, Hochmair MJ, et al. Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor-Naïve Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial. *J Thorac Oncol.* 2021;16(12):2091-108.
74. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(9):829-38.
75. Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO Open.* 2016;1(3):e000060.
76. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019;121(9):725-37.
77. Dagogo-Jack I, Yoda S, Lennerz JK, Langenbucher A, Lin JJ, Rooney MM, et al. MET Alterations Are a Recurring and Actionable Resistance Mechanism in ALK-Positive Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26(11):2535-45.
78. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score ≥ 50 . *J Clin Oncol.* 2021;39(21):2339-49.
79. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2078-92.
80. Papadimitrakopoulou, V. et al. OA05.07 IMpower132: PFS and Safety Results with 1L Atezolizumab + Carboplatin/Cisplatin + Pemetrexed in Stage IV Non-Squamous NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 13, Issue 10, S332 - S333.
81. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(21):2040-51.
82. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378(24):2288-301.
83. Soria JC, Mauguén A, Reck M, Sandler AB, Saijo N, Johnson DH, et al. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-

based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2013;24(1):20-30.

84. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(24):2542-50.

85. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(3):205-16.

86. Abolfathi H, Sheikhpour M, Shahraeini SS, Khatami S, Nojoudi SA. Studies in lung cancer cytokine proteomics: a review. *Expert Rev Proteomics.* 2021;18(1):49-64.

87. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25(4):581-611.

88. Kowanz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006;12(17):5018-22.

89. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001;2001(112):re21.

90. Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascul Pharmacol.* 2016;86:14-7.

91. Zacharatos P, Kotsinas A, Tsantoulis P, Evangelou K, Kletsas D, Asimacopoulos PJ, et al. Relationship of the K-ras/c-mos expression patterns with angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Mol Med.* 2001;7(9):590-7.

92. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):38-47.

93. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32.

94. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):798-809.

95. Shimoyamada H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Ishii J, Sakaeda M, et al. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor-A expression in lung cancer cells. *Am J Pathol.* 2010;177(1):70-83.

96. Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y, Sakaki S, et al. Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res.* 1999;59(15):3783-9.

97. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.

98. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2007;92(1):81-94.

99. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):46-55.

100. Zhou M, Li Y, Hu Q, Bai XC, Huang W, Yan C, et al. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes Dev.* 2015;29(22):2349-61.

101. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

102. Vogler M. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Adv Med.* 2014;2014:943648.

103. Gewirtz, D.A., Holt, S.E. and Grant, S. eds., 2007. Apoptosis, Senescence and Cancer. Springer Science & Business Media.

104. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev.* 2004;84(2):411-30.
105. Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, Minden MD. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood.* 2001;98(13):3541-53.
106. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):5-17.
107. Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, et al. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(22):7166-70.
108. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647-56.
109. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C45-51.
110. White E. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1371-7.
111. Sun T, Sun BC, Zhao XL, Zhao N, Dong XY, Che N, et al. Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: a study of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011;54(5):1690-706.
112. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, et al. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem.* 1996;60(1):23-32.
113. Hartman ML, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer Lett.* 2013;331(1):24-34.
114. Vairo G, Innes KM, Adams JM. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene.* 1996;13(7):1511-9.
115. Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. *Cancer Res.* 1994;54(14):3714-7.
116. Zhang J, Wang S, Wang L, Wang R, Chen S, Pan B, et al. Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3361-9.
117. Zhao XD, He YY, Gao J, Zhao C, Zhang LL, Tian JY, et al. High expression of Bcl-2 protein predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(20):8861-9.
118. Oliver L, Cordel S, Barbieux I, LeCabellec MT, Meflah K, Grégoire M, et al. Resistance to apoptosis is increased during metastatic dissemination of colon cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(2):175-80.
119. Melucci E, Cosimelli M, Carpanese L, Pizzi G, Izzo F, Fiore F, et al. Decrease of survivin, p53 and Bcl-2 expression in chemorefractory colorectal liver metastases may be predictive of radiosensitivity after radioembolization with yttrium-90 resin microspheres. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32(1):13.
120. Neri A, Marrelli D, Roviello F, DeMarco G, Mariani F, DeStefano A, et al. Bcl-2 expression correlates with lymphovascular invasion and long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;99(1):77-83.
121. Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: a comparative clinicopathologic study between "triple-negative" and non-"triple-negative" tumors. *Hum Pathol.* 2012;43(1):23-30.
122. Nix P, Cawkcwell L, Patmore H, Greenman J, Stafford N. Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(12):2185-9.
123. Choi J, Choi K, Benveniste EN, Rho SB, Hong YS, Lee JH, et al. Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 2005;65(13):5554-60.

124. Hu Y, Bebb G, Tan S, Ng R, Yan H, Sartor JR, et al. Antitumor efficacy of oblimersen Bcl-2 antisense oligonucleotide alone and in combination with vinorelbine in xenograft models of human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7662-70.
125. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3(8):917-21.
126. Altieri DC. Survivin - The inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;39:91-6.
127. Reed JC, Wilson DB. Cancer immunotherapy targeting survivin: commentary re: V. Pisarev et al., full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 9:6523-6533, 2003. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6310-5.
128. Storlazzi CT, Brekke HR, Mandahl N, Brosjö O, Smeland S, Lothe RA, et al. Identification of a novel amplicon at distal 17q containing the BIRC5/SURVIVIN gene in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol.* 2006;209(4):492-500.
129. Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell.* 2000;6(1):183-9.
130. Wang Z, Fukuda S, Pelus LM. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene.* 2004;23(49):8146-53.
131. Zhang L, Yan R, Zhang Q, Wang H, Kang X, Li J, et al. Survivin, a key component of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, contributes to traumatic brain injury-induced adult neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Int J Mol Med.* 2013;32(4):867-75.
132. Bai H, Ge S, Lu J, Qian G, Xu R. Hypoxia inducible factor-1 α -mediated activation of survivin in cervical cancer cells. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(2):555-63.
133. Zhang C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein Cell.* 2014;5(10):750-60.
134. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res.* 2015;141(4):389-97.
135. Fernández JG, Rodríguez DA, Valenzuela M, Calderon C, Urzúa U, Munroe D, et al. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Mol Cancer.* 2014;13:209.
136. Vivas-Mejia PE, Rodriguez-Aguayo C, Han HD, Shahzad MM, Valiyeva F, Shibayama M, et al. Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3716-26.
137. Morinaga S, Nakamura Y, Ishiwa N, Yoshikawa T, Noguchi Y, Yamamoto Y, et al. Expression of survivin mRNA associates with apoptosis, proliferation and histologically aggressive features in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2004;12(6):1189-94.
138. Zhu H, Wang Q, Hu C, Zhang W, Quan L, Liu M, et al. High expression of survivin predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma following radiotherapy. *Tumour Biol.* 2011;32(6):1147-53.
139. Sun YW, Xuan Q, Shu QA, Wu SS, Chen H, Xiao J, et al. Correlation of tumor relapse and elevated expression of survivin and vascular endothelial growth factor in superficial bladder transitional cell carcinoma. *Genet Mol Res.* 2013;12(2):1045-53.
140. Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol.* 2003;14(1):85-90.
141. Dobrzycka B, Mackowiak-Matejczyk B, Terlikowska KM, Kulesza-Bronczyk B, Kinalski M, Terlikowski SJ. Prognostic significance of pretreatment VEGF, survivin, and Smac/DIABLO serum levels in patients with serous ovarian carcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(6):4157-65.

142. Duan L, Hu X, Jin Y, Liu R, You Q. Survivin protein expression is involved in the progression of non-small cell lung cancer in Asians: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2016;16:276.
143. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F, et al. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):656-8.
144. Yano T, Tanikawa S, Fujie T, Masutani M, Horie T. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2000;36(5):601-9.
145. Rödel C, Grabenbauer GG, Rödel F, Birkenhake S, Kühn R, Martus P, et al. Apoptosis, p53, bcl-2, and Ki-67 in invasive bladder carcinoma: possible predictors for response to radiochemotherapy and successful bladder preservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;46(5):1213-21.
146. Zhu L, Yu H, Liu SY, Xiao XS, Dong WH, Chen YN, et al. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124230.
147. Huang LN, Wang DS, Chen YQ, Zhao CL, Gong BL, Jiang AB, et al. Expression of survivin and patients survival in non-small cell lung cancer: a meta-analysis of the published studies. *Mol Biol Rep*. 2013;40(2):917-24.
148. Farhat FS, Tfayli A, Fakhruddin N, Mahfouz R, Otrock ZK, Alameddine RS, et al. Expression, prognostic and predictive impact of VEGF and bFGF in non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;84(2):149-60.
149. Gurguş D, Grigoraş ML, Motoc AGM, Zamfir CL, Cornianu M, Faur CI, et al. Clinical relevance and accuracy of p63 and TTF-1 for better approach of small cell lung carcinoma versus poorly differentiated nonkeratinizing squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(1):139-43.
150. Moldvay J, Jackel M, Bogos K, Soltész I, Agócs L, Kovács G, et al. The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2004;10(2):85-8.
151. 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):288-95.
152. Kim JH, Kim HS, Kim BJ, Han B, Choi DR, Kwon JH. Prognostic Impact of TTF-1 Expression in Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer*. 2018;9(22):4279-86.
153. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-8.
154. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.
155. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-93.
156. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol*. 1999;188(4):369-77.
157. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P, Laudone VP, Albertsen PC, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology*. 1999;54(3):567-72.
158. Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ*. 2001;12(3):129-35.

159. Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(16):2647-53.
160. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer*. 1996;73(7):931-4.
161. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res*. 1997;17(3c):2249-52.
162. Stefanou D, Goussia AC, Arkoumani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2003;23(6c):4715-20.
163. Jin Y, Li JP, Tang LY, Chen JN, Feng ZY, Liu Y, et al. Protein expression and significance of VEGF, EGFR and MMP-9 in non-small cell lung carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(6):1473-6.
164. Usuda K, Iwai S, Funasaki A, Sekimura A, Motono N, Ueda Y, et al. Expression and Prognostic Impact of VEGF, CD31 and α SMA in Resected Primary Lung Cancers. *Anticancer Res*. 2018;38(7):4057-63.
165. Imoto H, Osaki T, Taga S, Ohgami A, Ichiyoshi Y, Yasumoto K. Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115(5):1007-14.
166. Bonnesen B, Pappot H, Holmstov J, Skov BG. Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: relation to prognosis. *Lung Cancer*. 2009;66(3):314-8.
167. Zlobec I, Steele R, Michel RP, Compton CC, Lugli A, Jass JR. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2006;19(9):1236-42.
168. Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer*. 2007;96(7):1092-100.
169. El-Sherief AH, Lau CT, Carter BW, Wu CC. Staging Lung Cancer: Regional Lymph Node Classification. *Radiol Clin North Am*. 2018;56(3):399-409.
170. Dai M, Hua C, Wang M, Gao L, Jiang L, Liu Y. Targeting regulation of VEGF by BPTF in non-small cell lung cancer and its potential clinical significance. *Eur J Med Res*. 2022;27(1):299.
171. Dezube AR, Jaklitsch MT. Minimizing residual occult nodal metastasis in NSCLC: recent advances, current status and controversies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2020;20(2):117-30.
172. Wei D, Xin Y, Rong Y, Hao Y. Correlation between the Expression of VEGF and Ki67 and Lymph Node Metastasis in Non-small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:9693746.
173. Liu J, Liu C, Qiu L, Li J, Zhang P, Sun Y. Overexpression of both platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor-C and its association with lymphangiogenesis in primary human non-small cell lung cancer. *Diagn Pathol*. 2014;9:128.
174. Yang Z, Wang YG, Su K. VEGF-C and VEGF-D expression and its correlation with lymph node metastasis in esophageal squamous cell cancer tissue. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(1):271-4.
175. Kostis G, Ioannis L, Helen K, Helen P. The expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphatic microvessel density and lymph node metastasis in prostate carcinoma: An immunohistochemical study. *Urol Ann*. 2014;6(3):224-30.

176. Kruszyna Ł, Murawa D, Jagodziński PP, Oszkinis G, Krasiński Z. The Expression and Prognostic Significance of VEGF and CXCR4 in Gastric Cancer: Correlation with Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Progression. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;44(7):3075-88.
177. Pan Z, Lu X, Zhao J, Gao Q, Wang J. VEGF-C is positively associated with lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in rectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(3):1777-83.
178. Jakobsen JN, Sørensen JB. Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2013;79(1):1-7.
179. Wei DM, Chen WJ, Meng RM, Zhao N, Zhang XY, Liao DY, et al. Augmented expression of Ki-67 is correlated with clinicopathological characteristics and prognosis for lung cancer patients: an up-dated systematic review and meta-analysis with 108 studies and 14,732 patients. *Respir Res.* 2018;19(1):150.
180. Tabata K, Tanaka T, Hayashi T, Hori T, Nunomura S, Yonezawa S, et al. Ki-67 is a strong prognostic marker of non-small cell lung cancer when tissue heterogeneity is considered. *BMC Clin Pathol.* 2014;14:23.
181. Atari M, Imai K, Nanjo H, Wakamatsu Y, Takashima S, Kurihara N, et al. Rapid intraoperative Ki-67 immunohistochemistry for lung cancer using non-contact alternating current electric field mixing. *Lung Cancer.* 2022;173:75-82.
182. Warth A, Cortis J, Soltermann A, Meister M, Budczies J, Stenzinger A, et al. Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1222-9.
183. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018;24(5):1105-12.e5.
184. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta.* 2019;491:39-45.
185. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.
186. Rindi G, Falconi M, Klersy C, Albarello L, Boninsegna L, Buchler MW, et al. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(10):764-77.
187. Wang D, Ye W, Shi Q. Prognostic Value of Ki-67 Expression in Advanced Lung Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Chemotherapy. *Cancer Manag Res.* 2021;13:6429-36.
188. He LY, Zhang H, Wang ZK, Zhang HZ. Diagnostic and prognostic significance of E-cadherin and Ki-67 expression in non-small cell lung cancer patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(18):3812-7.
189. Liu Z, Feng H, Ma S, Shao W, Zhang J, Zhang Z, et al. Clinicopathological characteristics of peripheral clinical stage IA lung adenocarcinoma with high Ki-67 expression. *Transl Cancer Res.* 2021;10(1):152-61.
190. Grabowski JP, Glajzer J, Richter R, Plett H, Muallem MZ, Braicu EI, et al. Lymphovascular space invasion and Ki67 as predictors of lymph node metastasis in primary low grade serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2021;31(1):98-103.
191. Yin Y, Zeng K, Wu M, Ding Y, Zhao M, Chen Q. The levels of Ki-67 positive are positively associated with lymph node metastasis in invasive ductal breast cancer. *Cell Biochem Biophys.* 2014;70(2):1145-51.

192. Lindfors H, Ihre Lundgren C, Zedenius J, Juhlin CC, Shabo I. The Clinical Significance of Lymph Node Ratio and Ki-67 Expression in Papillary Thyroid Cancer. *World J Surg.* 2021;45(7):2155-64.
193. Song Z, Xu X, Wei S, Chen J, Liu Y, Li X, et al. [Expression and Clinical Significance of Heparanase and Ki-67 in Non-small Cell Lung Cancer.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2009;12(7):785-8.
194. Dingemans AC, van Ark-Otte J, Span S, Scagliotti GV, van der Valk P, Postmus PE, et al. Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2001;32(2):117-28.
195. Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, et al. Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis.* 2005;26(7):1182-95.
196. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7(7):833-9.
197. Warren GW, Singh AK. Nicotine and lung cancer. *J Carcinog.* 2013;12:1.
198. Cucina A, Corvino V, Sapienza P, Borrelli V, Lucarelli M, Scarpa S, et al. Nicotine regulates basic fibroblastic growth factor and transforming growth factor beta1 production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(2):306-12.
199. Cucina A, Sapienza P, Borrelli V, Corvino V, Foresi G, Randone B, et al. Nicotine reorganizes cytoskeleton of vascular endothelial cell through platelet-derived growth factor BB. *J Surg Res.* 2000;92(2):233-8.
200. Conklin BS, Zhao W, Zhong DS, Chen C. Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am J Pathol.* 2002;160(2):413-8.
201. Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, Velikina R, Shi S, Le AD. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4686-94.
202. Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, et al. Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell.* 2003;4(3):191-6.
203. Naumov GN, Nilsson MB, Cascone T, Briggs A, Straume O, Akslen LA, et al. Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3484-94.
204. Xu L, Nilsson MB, Saintigny P, Cascone T, Herynk MH, Du Z, et al. Epidermal growth factor receptor regulates MET levels and invasiveness through hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene.* 2010;29(18):2616-27.
205. Le X, Nilsson M, Goldman J, Reck M, Nakagawa K, Kato T, et al. Dual EGFR-VEGF Pathway Inhibition: A Promising Strategy for Patients With EGFR-Mutant NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16(2):205-15.
206. Johnson BE, Kabbinavar F, Fehrenbacher L, Hainsworth J, Kasubhai S, Kressel B, et al. ATLAS: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIB trial comparing bevacizumab therapy with or without erlotinib, after completion of chemotherapy, with bevacizumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3926-34.
207. Stinchcombe TE, Jänne PA, Wang X, Bertino EM, Weiss J, Bazhenova L, et al. Effect of Erlotinib Plus Bevacizumab vs Erlotinib Alone on Progression-Free Survival in Patients With Advanced EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(10):1448-55.
208. Seto T, Kato T, Nishio M, Goto K, Atagi S, Hosomi Y, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell

- lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1236-44.
209. Zhou Q, Xu CR, Cheng Y, Liu YP, Chen GY, Cui JW, et al. Bevacizumab plus erlotinib in Chinese patients with untreated, EGFR-mutated, advanced NSCLC (ARTEMIS-CTONG1509): A multicenter phase 3 study. *Cancer Cell.* 2021;39(9):1279-91.e3.
210. Ichihara E, Hotta K, Nogami N, Kuyama S, Kishino D, Fujii M, et al. Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. *J Thorac Oncol.* 2015;10(3):486-91.
211. Hata A, Katakami N, Kaji R, Yokoyama T, Kaneda T, Tamiya M, et al. Afatinib plus bevacizumab combination after acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: Multicenter, single-arm, phase 2 trial (ABC Study). *Cancer.* 2018;124(19):3830-8.
212. Nakagawa K, Garon EB, Seto T, Nishio M, Ponce Aix S, Paz-Ares L, et al. Ramucicromab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(12):1655-69.
213. Berghoff AS, Schur S, Füreder LM, Gatterbauer B, Dieckmann K, Widhalm G, et al. Descriptive statistical analysis of a real life cohort of 2419 patients with brain metastases of solid cancers. *ESMO Open.* 2016;1(2):e000024.
214. Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vigneau FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2865-72.
215. Schouten LJ, Rutten J, Huveneers HA, Twijnstra A. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer.* 2002;94(10):2698-705.
216. Lacković V, Kostić V, Sternić N, Kanjuh V, Vuković I. [Angiogenesis in the central nervous system: a role of vascular endothelial growth factor]. *Vojnosanit Pregl.* 2005;62(1):59-67.
217. Stratmann R, Krieg M, Haas R, Plate KH. Putative control of angiogenesis in hemangioblastomas by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(11):1242-52.
218. Nag S, Takahashi JL, Kilty DW. Role of vascular endothelial growth factor in blood-brain barrier breakdown and angiogenesis in brain trauma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(8):912-21.
219. Robnett TJ, Machtay M, Stevenson JP, Algazy KM, Hahn SM. Factors affecting the risk of brain metastases after definitive chemoradiation for locally advanced non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(5):1344-9.
220. Aragon-Ching JB, Zujewski JA. CNS metastasis: an old problem in a new guise. *Clin Cancer Res.* 2007;13(6):1644-7.
221. Saad AG, Yeap BY, Thunnissen FB, Pinkus GS, Pinkus JL, Loda M, et al. Immunohistochemical markers associated with brain metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2008;113(8):2129-38.
222. Chirieac LR. Ki-67 expression in pulmonary tumors. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(5):547-51.
223. Takenaka T, Yano T, Ito K, Morodomi Y, Miura N, Kawano D, et al. Biological significance of the maximum standardized uptake values on positron emission tomography in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 2009;100(8):688-92.

224. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400.
225. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(11):2184-91.
226. Li H, Takayama K, Wang S, Shiraishi Y, Gotanda K, Harada T, et al. Addition of bevacizumab enhances antitumor activity of erlotinib against non-small cell lung cancer xenografts depending on VEGF expression. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(6):1297-305.
227. Zhao Y, Guo S, Deng J, Shen J, Du F, Wu X, et al. VEGF/VEGFR-Targeted Therapy and Immunotherapy in Non-small Cell Lung Cancer: Targeting the Tumor Microenvironment. *Int J Biol Sci.* 2022;18(9):3845-58.
228. Gadgeel SM, Stevenson JP, Langer CJ, Gandhi L, Borghaei H, Patnaik A, et al. Pembrolizumab and platinum-based chemotherapy as first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer: Phase 1 cohorts from the KEYNOTE-021 study. *Lung Cancer.* 2018;125:273-81.
229. Guo H, Li H, Zhu L, Feng J, Huang X, Baak JPA. "How Long Have I Got?" in Stage IV NSCLC Patients With at Least 3 Months Up to 10 Years Survival, Accuracy of Long-, Intermediate-, and Short-Term Survival Prediction Is Not Good Enough to Answer This Question. *Front Oncol.* 2021;11:761042.
230. Mineo TC, Ambroggi V, Baldi A, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2004;57(6):591-7.
231. Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol.* 2009;4(9):1094-103.
232. Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(1):72-9.
233. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):432-41.
234. Liao M, Wang H, Lin Z, Feng J, Zhu D. Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2001;33(2-3):125-32.
235. Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, et al. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2004;46(1):77-85.
236. Chen Z, Xu S, Xu W, Huang J, Zhang GU, Lei L, et al. Expression of cluster of differentiation 34 and vascular endothelial growth factor in breast cancer, and their prognostic significance. *Oncol Lett.* 2015;10(2):723-9.
237. Patil BR, Bhat K, Somannavar P, Hosmani J, Kotrashetti V, Nayak R. Comparison of immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and CD105 in oral squamous cell carcinoma: Its correlation with prognosis. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(2):421-7.

238. Rahmani AH, Babiker AY, Alsahli MA, Almatroodi SA, Husain N. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Her-2 Protein in the Genesis of Cervical Carcinoma. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(2):263-8.
239. Xie M, Park D, Sica GL, Deng X. Bcl2-induced DNA replication stress promotes lung carcinogenesis in response to space radiation. *Carcinogenesis*. 2020;41(11):1565-75.
240. Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce CM. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene*. 1987;2(1):3-7.
241. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):6961-5.
242. Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, Tzelepi V, Gopinath A, Liceaga C, et al. High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer*. 2010;10:186.
243. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:153.
244. Kuwashima Y, Uehara T, Kishi K, Shiromizu K, Matsuzawa M, Takayama S. Immunohistochemical characterization of undifferentiated carcinomas of the ovary. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994;120(11):672-7.
245. Gryko M, Pryczynicz A, Zareba K, Kędra B, Kemonia A, Guzińska-Ustymowicz K. The expression of Bcl-2 and BID in gastric cancer cells. *J Immunol Res*. 2014;2014:953203.
246. Brambilla E, Gazzeri S, Lantuejoul S, Coll JL, Moro D, Negoescu A, et al. p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1998;4(7):1609-18.
247. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med*. 1993;329(10):690-4.
248. Shibata Y, Hidaka S, Tagawa Y, Nagayasu T. Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2004;24(3b):1925-8.
249. Schmidt LH, Görlich D, Spieker T, Rohde C, Schuler M, Mohr M, et al. Prognostic impact of Bcl-2 depends on tumor histology and expression of MALAT-1 lncRNA in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1294-304.
250. Hanaoka T, Nakayama J, Haniuda M, Sato TA. Immunohistochemical demonstration of apoptosis-regulated proteins, Bcl-2 and Bax, in resected non-small-cell lung cancers. *Int J Clin Oncol*. 2002;7(3):152-8.
251. Berrieman HK, Smith L, O'Kane SL, Campbell A, Lind MJ, Cawkwell L. The expression of Bcl-2 family proteins differs between nonsmall cell lung carcinoma subtypes. *Cancer*. 2005;103(7):1415-9.
252. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA, et al. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1999;79(5-6):952-8.
253. Cox G, Walker RA, Muller S, Abrams KR, Steward WP, O'Byrne KJ. Does immunointensity account for the differences in prognostic significance of Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer? *Pathol Oncol Res*. 2000;6(2):87-92.
254. Ohmura Y, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):2980-7.
255. Gregorc V, Darwish S, Ludovini V, Pistola L, De Angelis V, Mihaylova Z, et al. The clinical relevance of Bcl-2, Rb and p53 expression in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2003;42(3):275-81.

256. Maráz A, Furák J, Pálföldi R, Eller J, Szántó E, Kahán Z, et al. Roles of BCL-2 and MDR1 expression in the efficacy of paclitaxel-based lung cancer chemoradiation. *Anticancer Res.* 2011;31(4):1431-6.
257. Fokkema E, Timens W, de Vries EG, de Jong S, Fidler V, Meijer C, et al. Expression and prognostic implications of apoptosis-related proteins in locally unresectable non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* 2006;52(2):241-7.
258. CHARU SURI.THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE EXPRESSION OF BCL-2 IN DIFFERENT HISTOLOGICAL GRADES OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA.Journal of Clinical and Diagnostic Research [serial online] 2009. December [cited: 2009 December 7]; 3:1891-1899.
259. Petrișor O, Giușcă SE, Sajin M, Dobrescu G, Căruntu ID. Ki-67, p53 and bcl-2 analysis in colonic versus rectal adenocarcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;49(2):163-71.
260. Yaren A, Oztop I, Kargi A, Ulukus C, Onen A, Sanli A, et al. Bax, bcl-2 and c-kit expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis. *Int J Clin Pract.* 2006;60(6):675-82.
261. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003;89(1):55-64.
262. Lee HW, Choi YW, Han JH, Kim JH, Jung JH, Jeong SH, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer.* 2009;65(3):377-82.
263. Feng C, Wu J, Yang F, Qiu M, Hu S, Guo S, et al. Expression of Bcl-2 is a favorable prognostic biomarker in lung squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018;15(5):6925-30.
264. Martínez-Arribas F, Alvarez T, Del Val G, Martín-Garabato E, Núñez-Villar MJ, Lucas R, et al. Bcl-2 expression in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Anticancer Res.* 2007;27(1a):219-22.
265. Gurova KV, Gudkov AV. Paradoxical role of apoptosis in tumor progression. *J Cell Biochem.* 2003;88(1):128-37.
266. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, Whitehouse RM, Talbot DC, Gatter KC, et al. Potential role of bcl-2 as a suppressor of tumour angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 1997;74(6):565-70.
267. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chinè S, Basolo F, Silvestri V, et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer.* 1998;34(5):718-23.
268. Beierle EA, Strande LF, Chen MK. VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg.* 2002;37(3):467-71.
269. Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C, Beecken W, Achilles-Gerte E, McDonnell T, et al. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(3):208-13.
270. Biroccio A, Candiloro A, Mottolese M, Saporita O, Albini A, Zupi G, et al. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line. *Faseb j.* 2000;14(5):652-60.
271. Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G, et al. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *Faseb j.* 2002;16(11):1453-5.
272. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular

- endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;113(2):400-6.
273. Jinyoung, Y.J.H.J.; Hyun, J.C.; Seok, J.K.; Chang, S.K. Expression of bcl-2, p53 and VEGF in Non-Small Cell Lung Carcinomas: Their Relation with the Microvascular Density and Prognosis. *Korean J. Pathol.* 2005, 39, 74–80.
274. Ahmed MB, Nabih ES, Louka ML, Abdel Motaleb FI, El Sayed MA, Elwakiel HM. Evaluation of nestin in lung adenocarcinoma: relation to VEGF and Bcl-2. *Biomarkers.* 2014;19(1):29-33.
275. Tian J, Hu L, Li X, Geng J, Dai M, Bai X. MicroRNA-130b promotes lung cancer progression via PPAR γ /VEGF-A/BCL-2-mediated suppression of apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):105.
276. Nör JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res.* 2000;37(3):209-18.
277. Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Tomaszewski J, Kucharczuk W, Lesniewicz T, et al. The effect of chemotherapy on Ki-67, Bcl-2 and Bak expression in primary tumors and lymph node metastases of breast cancer. *Oncol Rep.* 2007;18(1):113-9.
278. S Ganraj Bhat et al., Correlating BCL-2 and Ki-67 in OSCC. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2021 Nov, Vol-15(11): XC07-XC11
279. Mansouri H, Mnango LF, Magorosa EP, Sauli E, Mpolya EA. Ki-67, p53 and BCL-2 Expressions and their Association with Clinical Histopathology of Breast Cancer among Women in Tanzania. *Sci Rep.* 2019;9(1):9918.

Биографија

Марина Марковић је рођена 01.08.1982. године. Основну школу “Вук Стефановић Караџић” и средњу Медицинску школу „Сестре Нинковић“ је завршила у Крагујевцу. Интегрисане академске студије медицине је уписала 2001. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, а завршила 2009. године са просечном оценом 8.63. Докторске академске студије – смер Интерна медицина, уписала је 2010. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Након положених свих програмом предвиђених испита, укључујући и усмени докторски испит, пријавила је своју докторску дисертацију која је прихваћена 03.05.2017. год.

Др Марина Марковић је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу од 2011. године, сада у звању асистент у настави за ужу научну област Интерна медицина. Ангажована је као коистраживач на јуниор пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу: Експресија туморских маркера као показатељ хемисензитивности и прогнозе код локално унапредовалог немикроцелуларног карцинома плућа (ЈП 10-16).

2014. године је уписала специјалистичке студије из Интерне медицине, а завршила 2019. године са оценом одличан. Од 2017. године запослена у Универзитетском Клиничком центру Крагујевац, у Центру за интернистичку онкологију. Ужу специјализацију из области онкологије је уписала 2021. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

Кандидаткиња је као аутор или коаутор објавила 2 рада категорије М21, 2 рада категорије М22, 1 рад М23, 3 рада категорије М51, 1 рад категорије М52.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марина Марковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Прогностички значај експресије *VEGF*, *bel2* и сурвивина код узнапредовалог немикроцелуларног карцинома плућа“

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

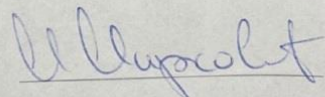
Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 13.10.2023. године,



потпис аутора

Образац 2

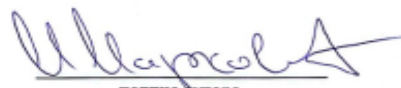
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF, BCL2 И СУРВИВИНА КОД
УЗНАПРЕДОВАЛОГ НЕСИТНОЋЕЛИЈСКОГ КАРЦИНОМА ПЛУЋА

истоветне.

У Крагујевцу, 01.12.2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марина Марковић

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

“ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ VEGF, BCL2 И СУРВИВИНА КОД УЗНАПРЕДОВАЛОГ НЕСИТНОЋЕЛИЈСКОГ КАРЦИНОМА ПЛУЋА „

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 01.12. 2023. године,



потпис аутора