

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mr sci. dr Nataša Vešović

**DIJAGNOSTIČKI I PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ NIVOVA
DUGE NEKODIRAJUĆE RNK GAS5 U PLAZMI
PACIJENATA OBOLELIH OD NESITNOĆELIJSKOG
KARCINOMA PLUĆA**

Doktorska teza

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr. Nataša Vešović, M.Sc.

**DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF
LEVELS OF LONG NON-CODING GAS5 RNK IN THE
PLASMA OF PATIENTS WITH NON-SMALL-CELL
PULMONARY CANCER**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR:

Prof. dr Dragana Jovanović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u penziji

KOMENTOR:

Docent dr sci med Darko Zdravković, Klinika za onkologiju, odeljenje onkološke hirurgije, Kliničko-bolnički centar Bežanijska kosa

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Doc dr sci. med. Milan Savić, grudni hirurg, Klinika za grudnu hirurgiju KCS
2. Prof dr Vesna Škodrić-Trifunović, pulmolog, Klinika za pulmologiju KCS
3. Prof dr Snežana Pajović, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča
,Beogradski Univerzitet i Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Zahvaljujem se:

Prof. Dragani Jovanović, mom mentoru, na zalaganju da se ova doktorska disertacija uopšte realizuje. Svih godina naše saradnje sam imala njenu apsolutnu podršku i veliku stručnu pomoć u obradi rezultata rada kao i njihovo sagledavanje i tumačenje u kliničkoj praksi i objedinjenju istih u izradi same teze.

Dr sci med. Sonji Pavlović, naučnom savetniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjstvo Univerziteta u Beogradu i rukovodiocu laboratorije za molekularnu biomedicinu, koja je svojim ličnim angažovanjem obezbedila sve tehničke uslove za eksperimentalni deo i tako omogućila da se odradi neophodni, praktični deo disertacije. Njeni dragoceni saveti su pomogli da sagledam sveobuhvatno principe naučno istraživačkog rada.

Doc. Darku Zdravkoviću, komentoru, na značajnoj pomoći, korisnim savetima i sugestijama u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Dr sci.med. Zoranu Andriću, načelniku medikalne onkologije KBC Bežanijska kosa, i članovima njegovog kolektiva u prikupljanju i selekciji pacijenata čije su analize bile neophodne.

Dr Nataši Tošić, višem naučnom saradniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjstvo, koja je sistematičnom obradom uzoraka i stručnom analizom istih, omogućila da se stvori baza podataka ovog rada. Na dalje, svojim dragocenim savetima i sugestijama pomogla mi je da se rezultati mogu jasno sagledati i tumačiti.

Tehničarima Dejanu Novakoviću i Slobodanu Milovanoviću, mojim dragim saradnicima, na spremnosti da u svakom trenutku, kada god je to situacija zahtevala, uzmu uzorke i što pre ih prenesu do Instituta za molekularnu genetiku.

Mojoj majci Zorki na ljubavi, razumevanju i podršci.

Rad posvećujem mom sinu Vukanu Dančetoviću koji me je uvek podržavao u mojim naporima da ostvarimo nesto više i bolje u našim životima...

Rezime

DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ DUGE NEKODIRAJUĆE RNK GAS5 U PLAZMI PACIJENATA OBOLELIH OD NESITNOĆELIJSKOG KARCINOMA PLUĆA

Uvod

Nesitnoćelijski karcinom pluća predstavlja najčešći tip tumora pluća i javlja se u oko 85% obolelih. Postoje tri glavna histološka tipa nesitnoćelijskog karcinoma pluća: adenokarcinom, skvamocelularni karcinom i krupnoćelijski karcinom pluća (large cell). Bez obzira na nove pristupe lečenju ovih karcinoma petogodišnje preživljavanje ovih pacijenata je samo 15%. Osnovna polazišna tačka u odlučivanju u vezi sa lečenjem ove bolesti jeste tip karcinoma i stadijum bolesti u kojem je dijagnostikovao malignitet. Na žalost, s obzirom da je jedna od karakteristika nesitnoćelijskog karcinoma pluća da može da se razvija i asimptomatski, da ne postoji pouzdan skrining za ovo oboljenje najčešće se otkriva u kasnom stadijumu bolesti. Zbog ove činjenice, terapija je često neefikasna, što uzrokuje izuzetno visoku smrtnost obolelih.

Trenutni istraživački pravci u vezi sa nesitnoćelijskim tumorima pluća koncentrisani su na otkrivanje novih biomarkera sa visokom senzitivnošću i specifičnošću – kako bi se poboljšala mogućnost rane dijagnoze ove bolesti. Upotreba novih biomarkera mogla bi da posluži i za razvoj novih terapijskih pristupa. Otkrivanje nukleinskih kiselina koje potiču iz tumorskih ćelija u perifernoj cirkulaciji otvorilo je vrata razvoju novih neinvazivnih tehnika za otkrivanje ranih molekularnih biomarkera koji mogu biti korišćeni za dijagnozu malignih tumora, pa i nesitnoćelijskog karcinoma pluća.

Gen za GAS5 dugu nekodirajuću RNK nalazi se na 1q25 lokusu: dužine je oko 650 baza i organizovan je u 12 egzona i 11 introna. Introni kodiraju male nuklearne RNK koje učestvuju u metilaciji – u epigenetskoj regulaciji. Egzoni kodiraju nekoliko varijanti GAS5 mRNK, ali zbog prisustva stop kodona, njihov rezultat nisu proteini, te se njihov transkript odbacuje. Ekspresija GAS5 je smanjena u različitim tipovima tumora, uključujući nesitnoćelijski karcinom pluća. Povećana ekspresija GAS5 indukuje apoptozu (programirana ćelijska smrt), a u ljudskom organizmu je povezana sa usporavanjem rasta tumora.

Cilj rada

Ispitati postojanje razlike u nivou ekspresije duge nekodirajuće RNK GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća u odnosu na zdravu populaciju. Takođe ispitati postojanje razlike u nivou ekspresije duge nekodirajuće RNK GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća u zavisnosti od podtipa nesitnoćelijskog karcinoma pluća. I na kraju ispitati postojanje razlike u nivou duge ekspresije nekodirajuće RNK GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća zavisno od stadijuma bolesti.

Metod

Istraživanje je sprovedeno kao kliničko-laboratorijska studija preseka stanja u okviru koje su ispitanici podeljeni na eksperimentalnu i kontrolnu grupu. Uključeni su samo novo dijagnostikovani pacijenti, to jest pacijenti koji nisu primali nikakvu onkološku terapiju. Svim pacijentima je uzet uzorak venske krvi u količini od 15 ml i u roku od 2h uzorak je transportovan u frižideru na temperaturi od 4 stepena C do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde je dalje obrađivan. Za izolaciju RNK iz plazme pacijenata korišćen je miRNeasz Serum/Plasma Kit (Qiagen, Nemačka) primenom modifikovanog protokola. Ukupna RNK (400 ng) je reverzno transkribovana u cDNK upotrebom RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Kvantitativni PCR (qPCR-Polimerasa Chain reaction) metod omogućava preciznu kvantifikaciju PCR produkata u svakom ciklusu PCR reakcije, odnosno u realnom vremenu (real time PCR). U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode za statističku analizu.

Rezultat rada

U studiji je učestvovalo 72 ispitanika, od kojih je 57 imalo potvrđenu dijagnozu karcinoma pluća, dok je u kontrolnoj grupi bilo 15 ispitanika. Najveći broj učesnika obe grupe bio je muškog pola (72%) dok je manji broj učesnika bio ženskog pola (28%). Starost ispitivanih učesnika u studiji bila je između 31 i 81 godine, sa medijanom za sve učesnike od 62 godine. Pacijenti su bili stariji, sa medijanom od 65 godina, od kontrolnih ispitanika koje su imale medijanu od 38 godina. GAS5 ekspresija bila je veća u grupi kontrola u odnosu na grupu pacijenata sa karcinomom pluća. Ova razlika između obolelih i kontrolne grupe bila je na granici statističke značajnosti ($p = 0.081$). Najveća ekspresija uočena je kod pacijenata II stadijuma bolesti, a najniža kod pacijenata III stadijuma bolesti. Postoji statistički značajna razlika u GAS5 ekspresiji između pacijenata različitih stadijuma bolesti ($p < 0,001$). Najveći pad ekspresije GAS5 vidi se u III stadijumu bolesti koji se statistički značajno razlikuje od I

($p < 0.001$), II ($p < 0.001$) i IV stadijuma ($p = 0.0037$). Statistički značajne razlike nisu uočene između I i II kao ni između I i IV stadijuma bolesti, ali statistički značajna razlike u GAS5 ekspresiji postoji između II i IV stadijuma bolesti ($p = 0.033$). Za računanje mogućnosti GAS5 ekspresije da napravi razliku između pacijenata sa tumorom pluća i zdravih kontrola korišćena je ROC kriva. U našoj studiji vrednost površine ispod krive (area under the curve – AUC) je bila 0,65 (95% CI: 0,50 – 0,79, $p = 0,81$), sa optimalnom senzitivnošću i specifičnošću od 45% i 73%, redom. ROC kriva korišćena je i za računanje mogućnosti GAS5 ekspresije da utvrdi razliku između pacijenata sa tumorom pluća u III stadijumu bolesti i zdravih ispitanika. U našoj studiji vrednost površine ispod krive (area under the curve – AUC) je bila 0,93 (95% CI: 0,84 – 1,024; $p < 0,001$), sa optimalnom senzitivnošću i specifičnošću od 87% i 93%, redom. Na kraju, ispitivali smo da li GAS5 ekspresija može da pomogne u definisanju postojanja razlike između pacijenata I i II stadijuma bolesti (kombinovano) i pacijenata u III i IV stadijumu bolesti (kombinovano). ROC kriva u ovom slučaju, imala je AUC 0,82 (95% CI: 0,71 – 0,92; $p < 0,001$) uz senzitivnost od 73% i specifičnost od 79%.

Zaključak

GAS5 ekspresija u odnosu na TNM klasifikaciju tumora progradijentno opada sa T stadijumom bolesti, tako da je najveća kod T1 stadijuma, a najniža kod T4 stadijuma. Na sličan način GAS5 ekspresija opada u odnosu na N stadijum bolesti, te je ekspresija najviša kod N0 stadijuma, a sa invazijom limfnih čvorova GAS5 ekspresija opada. GAS5 ekspresija nije se pokazala kao dobar biomarker koji je pokazatelj između zdravih lica i pacijenata I ili II stadijuma bolesti, te rezultati naše studije ne podržavaju njegovu upotrebu kao biomarkera za rano otkrivanje nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Izračunata je senzitivnost od 45% i specifičnost od 73%. Nasuprot tome, GAS5 ekspresija se pokazala kao odličan biomarker koji definiše razliku između zdravih kontrola i pacijenata u III stadijumu bolesti (kada je ekspresija najmanja) sa optimalnom senzitivnošću i specifičnošću od 87% i 93%, redom. GAS5 ekspresija je pokazala značajnu prediktivnu vrednost za diskriminaciju između zdravih kontrola i pacijenata u kasnom stadijumu bolesti, uz senzitivnost od 53% i specifičnost od 79%. Na kraju, GAS5 može da bude pokazatelj pacijenata u ranim stadijumima bolesti (I i II) i kasnim stadijumima bolesti (III i IV), i to uz senzitivnost od 73% i specifičnost od 79%.

Ključne reči: nesitnoćelijski karcinom pluća, duge nekodirajuće RNK, GAS5, TNM klasifikacija

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: pulmologija

Abstract

DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF LONG NON-CODING GAS5 RNK IN THE PLASMA OF PATIENTS WITH NON-SMALL-CELL LUNG CARCINOMAS

Introduction

Non-smallcell lung cancer represents the most common lung cancer covering around 85% of patients with this disease. There are three most common histological subtypes of non-smallcell lung cancer: adenocarcinoma, squamocellular carcinoma, and large cell lung carcinoma. Regardless of the approach to treatment, most commonly done by targeted chemotherapy and radiotherapy, the five-year survival of these patients is only 15%. The main starting point in the treatment of lung cancer patients is the diseases stage, but since lung cancer is commonly unsymptomatic, it is usually discovered in one of the late stages.

Consequently, the therapy is often inefficient, resulting in high mortality from this disease.

Current research is directed at discovering new biomarkers for non-small-cell lung cancer with increasing sensitivity and specificity, with the aim of increasing the possibility of an early diagnosis and targeted treatment of this disease. The discovery of nucleic acids originating from cancer cells measurable in peripheral blood of lung cancer patients has opened the door to the development of new non-invasive techniques for early detection of molecular biomarkers which could be used for lung cancer diagnosis.

The gene for the long non-coding RNA GAS5 can be found on the 1q25 locus: it is around 650 bases long and organized into 12 exons and 11 intrones. Intrones code small nuclear RNAs which have a part in DNA metillation – therefore in epigenetic regulation. Exones code several variants of GAS5 mRNA, but due to the presence of the STOP codons, their results are not proteins, therefore their transcripts are rejected. GAS5 expression is reduced in various types of tumors, including non-small-cell lung cancer. Increased GAS5 expression induces apoptosis, which in humans results in reduction of tumor growth.

Objective

The objective of this study was to explore the differences in long non-coding RNA GAS5 expression among patients in different stages of non-small-cell lung cancer and healthy population, the differences in GAS5 expression among different subtypes of non-small-cell lung cancer, and GAS5 expression depending on the stage of the disease.

Method

This study was conducted as a clinical and laboratory cross-sectional study with study participants divided into the experimental and control group. Only newly diagnosed patients were included, meaning patients not receiving any oncological therapy. All patients supplied a peripheral blood sample of 15 ml and the sample was transferred in the period of 2 hours to the Institute for molecular genetics and genetical engineering where it was further analyzed. RNA was isolated from the plasma by means of miRNeasz Serum/Plasma Kit (Qiagen, Germany) using a modified protocol. Total RNA (400 ng) was reversely transcribed into cDNA using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Quantitative PCR (qPCR) method was used for precise quantification of PCR products in each product of PCR reaction in real-time. Descriptive and analytical statistical methods were used for statistical analysis.

Results

There were 72 study subjects, of which 57 had a confirmed diagnosis of non-small-cell lung cancer and 15 were healthy controls. Study participants were predominantly male (72%) and their age was between 31 and 81 years, with a median value of 62 years. Patients were older than the control group with a median of 65, compared to a median of 38. GAS5 expression was higher in the control group compared to the non-small-cell lung patients group. This difference between patients and controls was at the limit of statistical significance ($p = 0.081$). The highest GAS5 expression was noted among patients in the II stage of the disease, and lowest in the III stage of the disease. There was a statistically significant difference between patients at different stages of the disease ($p < 0.001$). GAS5 expression was lowest in the III stadium of the disease which was significantly different from the I ($p < 0.001$), II ($p < 0.001$) and IV stage ($p = 0.0037$). There were no statistically significant differences between the I and II or I and IV disease stage, nor a difference between the II and IV stage ($p = 0.033$). ROC curves were used to verify the capacity of GAS5 to discriminate between the patients and healthy controls. In our study, the area under the curve (AUC) was 0.65 (95% CI: 0.50 – 0.79, $p = 0.81$), with optimal sensitivity and specificity of 45% and 73%, respectively. ROC curve was used to test the discriminatory potential of GAS5 expression to differentiate between lung cancer patients at the III stadium of the disease and healthy controls. The AUC in our study was 0.93 (95% CI: 0.84 – 1.024; $p < 0.001$), with optimal sensitivity and specificity of 87% and 93%, respectively. Finally, we have examined whether GAS5 expression can help discriminate between combined patients of I and II stadium of lung

cancer, and combined patients of III and IV stadium. In this case, the AUC was 0.82 (95% CI: 0.71 – 0.92, $p < 0.001$) with a sensitivity of 73% and specificity of 79%.

Conclusion

GAS5 expression declines with the T stadium of the disease, resulting in patients in T1 stadium having the highest GAS5 expression levels, and T4 patients having the lowest levels. In a similar way, GAS5 expression declines with the N descriptor, with higher values in N0 stadium, and lower values following the lymph node invasion. GAS5 expression did not prove of value for the discrimination between healthy controls and patients in the I and II stadium of lung cancer, therefore it cannot be recommended as a biomarker for early detection of non-small-cell lung cancer. The sensitivity and specificity in this case were 45% and 73%, respectively. Contrary to this, GAS5 could very well discriminate between healthy controls and patients in the III stadium of the disease (with lowest GAS5 expression), with a sensitivity of 87% and specificity of 93%. GAS5 expression has shown a significant predictive value when discriminating between the healthy controls and patients in the late stages of lung cancer (III and IV), with a sensitivity of 53% and specificity of 79%. Finally, GAS5 could help us discriminate between patients in the early stages of the disease (I and II) and late stages of the disease (III and IV), with a sensitivity of 73% and specificity of 79%.

Key words: non-small-cell lung cancer, long non-coding RNA, GAS5, TNM classification.

Scientific area: medicine

Narrow scientific field: pulmonology

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Epidemiologija karcinoma pluća.....	2
1.2	Faktori rizika i prevencija karcinoma pluća.....	1
1.2.1	Pušenje i karcinom pluća.....	1
1.2.2	Prevencija karcinoma pluća.....	2
1.3	Tumori pluća	5
1.3.1	Epitelni tumori pluća – karcinom pluća	5
1.3.2	Nesitnoćelijski karcinomi pluća	7
1.3.3	Sitnoćelijski karcinom pluća	10
1.4	Dijagnostika karcinoma pluća.....	11
1.4.1	Neinvazivna dijagnostika	11
1.4.2	Invazivna dijagnostika.....	16
1.5	Stejdžing nesitnoćelijskog karcinoma pluća.....	17
1.5.1	Primarni tumor – T deskriptor.....	17
1.5.2	Regionalni limfni čvorovi – N deskriptor	19
1.5.3	Udaljene metastaze – M deskriptor	20
1.5.4	Određivanje stadijuma nesitnoćelijskih karcinoma pluća	22
1.6	Lečenje karcinoma pluća	24
1.6.1	Opšti principi-modaliteti tarapije	24
1.7	Genetska osnova karcinoma pluća	27
1.7.1	KRAS	29
1.7.2	Epidermal growth factor receptor (EGFR).....	29
1.7.3	BRAF.....	30
1.7.4	MET	30
1.7.5	HER2	31
1.7.6	PI3K/AKT/mTOR.....	31
1.7.7	ALK.....	31
1.7.8	ROS	31
1.7.9	RET	31
1.7.10	DDR	32
1.7.11	Tumor supresor geni.....	32
1.8	Epigenetske promene u karcinomu pluća.....	33
1.9	Duge nekodirajuće RNK	35
1.9.1	Karakteristike i uloga duge nekodirajuće RNK.....	36
1.9.2	Duge nekodirajuće RNK povezane sa karcinomom pluća	37

1.10	GAS5 i karcinom pluća	43
2	Ciljevi istraživanja.....	47
3	Metodologija istraživanja	48
3.1	Klinički deo istraživanja.....	48
3.2	Laboratorijske deo istraživanja.....	48
3.2.1	Priprema plazme.....	48
3.2.2	Izolacija RNK iz plazme	49
3.2.3	Kvantitativna reverzna transkripcija.....	51
3.2.4	Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije <i>GAS5</i> gena primenom „real-time“ PCR (qPCR) metode	52
3.3	Statistička obrada	53
4	Rezultati istraživanja.....	55
4.1	Opšte karakteristike uzorka	55
4.2	Opšte karakteristike pacijenata.....	59
4.2.1	GAS5 ekspresija u odnosu na pol pacijenata.....	63
4.3	Stadijum bolesti.....	64
4.4	GAS5 Ekspresija	69
4.5	Diskriminatorna vrednost GAS5 ekspresije.....	81
5	Diskusija	86
6	Zaključci	91
7	Literatura	93
8	Prilozi.....	120

1 Uvod

Od karcinoma pluća godišnje umre oko 1.761.000 ljudi, a oboli 2.093.000 ljudi. Karcinom pluća predstavlja najčešći uzročnik smrti od karcinoma kod muškaraca u 93 zemlje sveta, uključujući Srbiju. Već nekoliko decenija karcinom pluća je najčešći uzrok oboljevanja od maligniteta na svetskom nivou. Karcinom pluća predstavlja vodeći uzrok smrti kod pacijenata obolelih od malignih bolesti i u svetu čini oko 31% svih slučajeva kod muškaraca, a 26% kod žena.

Prvi pisani dokument o karcinomu predstavlja „Edwin Smith Papyrus“, koji predstavlja egipatski opis karcinoma i datira iz 3000. godine pre nove ere (1,2). Hipokrat je još u V veku dao ime karcinom bolesti koja ima lošu prognozu. Jasno je da je karcinom pluća danas široko rasprostranjeno i značajno oboljenje koje predstavlja veliki problem za zdravstveni sistem. Mada nije oduvek bilo tako. Pre 150 godina karcinom pluća je bila jako retka bolest. Karcinom bronha opisali su Harting i Hesse 1879. godine misleći da se radi o sarkomu kod rudara koji su umirali u Schneeberg-u. Pravi uzrok smrti ovih rudara bila je izloženost radijumom. Prema podacima Instituta za patologiju u Drezdenu Nemačka, malignu tumori pluća su 1878. činili 1% od svih karcinoma dijagnostikovanih obdukcijom. Do 1918 procenat maligniteta pluća dijagnostikovanih obdukcijom je porastao do otprilike 10%, a do 1927. godine udeo istih dijagnostikovanih obdukcijom bio je veći od 14%. Springerov priručnik specijalne patologije iz 1930 g. ukazivao je na povećanje učestalosti karcinoma pluća na prelazu između dva veka, još više posle Prvog svetskog rata. Primećeno je da su se tumori pluća znatno češće javljali u muškoj populaciji, ali da je primećen porast javljanja tumora pluća i kod žena. Trajanje bolesti, od prepoznavanja do smrti, obično je bila od pola godine do dve godine, i iz istorija bolesti uočeno je da su svi pacijenti lečeni od hroničnog bronhitisa.

Šta je uzrokovalo tako dramatično povećanje do tada nejasne bolesti? Tada su kao mogući uzroci navedeni: povećana zagađenost vazduha gasovima i prašinom izazvani industrijskom proizvodnjom, asfaltiranje puteva, porast broja automobila na ulicama, izloženost gasu u Prvom svetskom ratu, pandemija gripa 1918 godine i rad sa benzinom ili benzenom.

Međutim, incidenca karcinoma pluća rasla je istom brzinom u zemljama sa malim brojem automobila, slabo razvijenom industrijom, malim brojem asfaltiranih puteva, i kod radnika koji nisu bili izloženi benzinu i benzenu. Tada se pušenje prvi put pominje kao jedan od mogućih etioloških agenasa. Mnoge studije, sprovedene u to vreme, nisu uspele da ukažu na

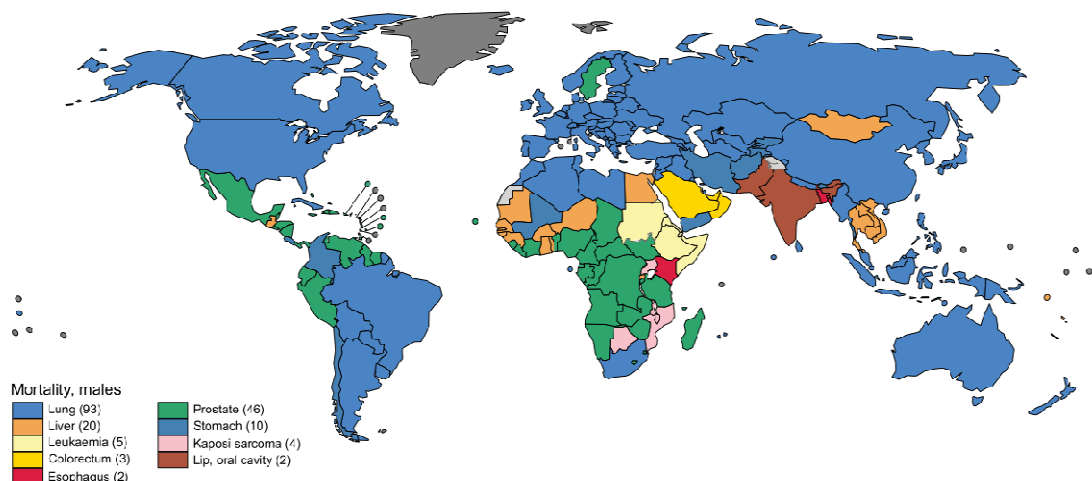
povezanost pušenja i karcinoma pluća. Zanimljivo je da je 1929.g. nemački lekar Fritz Lickint objavio članak, koji je ukazivao da su oboleli od tumora pluća najverovatnije pušači. Zatim je krenuo u krstaški rat protiv pušenja i antiduvanski aktivizam je postao široko rasprostranjen u Nemačkoj.

Šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka kao najverovatniji uzročnici karcinoma pluća istaknuti su pušenje, zagađenje vazduha, izloženost azbestu, arsenu, niklu i hromu. Prva korelacija navike pušenja i raka pluća uočena je od strane kliničara 1930g. Nakon toga, broj studija koje su ukazivale na ovu povezanost je rastao, i dve decenije kasnije, prihvaćeno je da je pušenje uzročnik karcinoma pluća. Strogo kontrolisana studija objavljena 1940.g, u Nemačkoj ukazivala je da povećana konzumacija duvana najznačajniji pojedinačni faktor u povećanju incidence karcinoma pluća (Muller 1940). U to vreme karcinom pluća je postao drugi najčešći uzrok smrti, nakon karcinoma želuca. Nakon toga objavljen je veći broj studija koje su ukazivale na jasnu i nedvosmislenu povezanost karcinoma pluća i pušenja. Trebalo je još vremena da prođe da ova povezanost bude opšte prihvaćena. Veliki otpor je naišao od strane lekara pušača. Pušenje cigareta je postalo jako popularno s kraja XIX veka. Prvi svetski rat je značajno popularizovao pušenje. Vojnici na frontu su pušili kako bi se oslobodili stresa, što je radio i veliki broj civila, uključujući i žene. Tokom poslednjih nekoliko decenija došlo je do promena u histološkim tipovima karcinoma pluća. Najčešći tip bio je skvamocelularni tumor. Adenokarcinom pluća je prvi put uočen 1961.god. Tokom poslednje dve decenije to su postali najčešći periferno lokalizovani tumori u plućima. Porast incidence ovog tipa tumora je u nitrozaminima koji su danas glavni karcinogeni u duvanskom dimu.

1.1 Epidemiologija karcinoma pluća

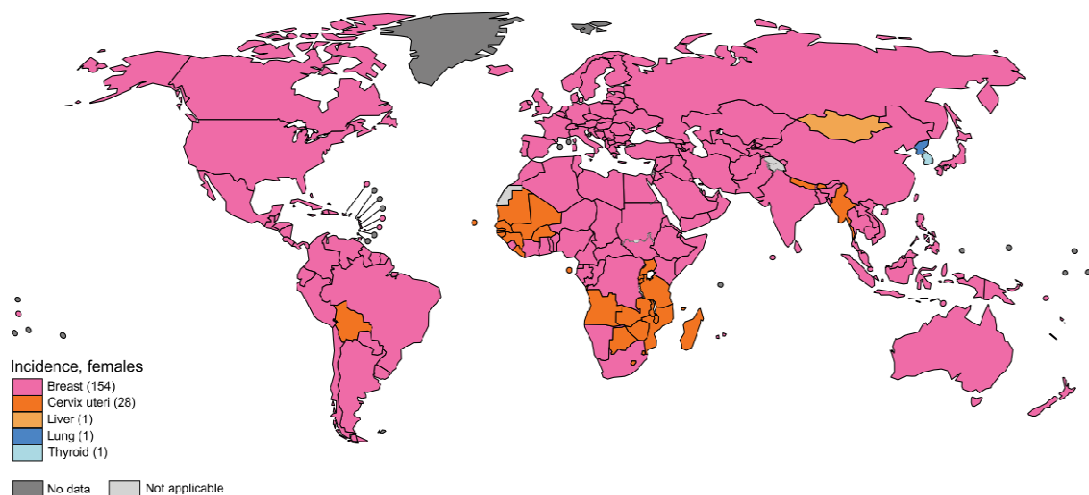
Maligni tumor pluća je odgovoran za skoro 30% smrtnih slučajeva u vezi sa malignomima i kod muškaraca i kod žena (2). Samo u Sjedinjenim Američkim Državama tokom 2019. godine očekivani broj novoobolelih bio je preko 200.000 (3)

Slika 1 prikazuje primarni uzrok smrti od različitih tumora kod muškaraca, dok **Slika 2** prikazuje primarni uzrok smrti od različitih tumora kod žena..



Slika 1. Primarni uzrok smrti od tumora kod muškaraca
(izvor: Bray et al, 2018)

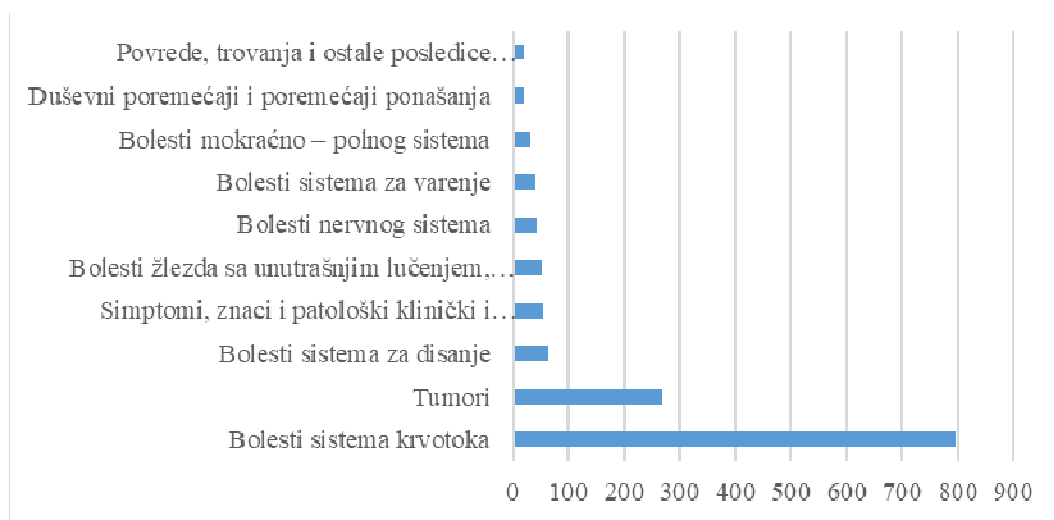
Procenjeno je da se u Sjedinjenim Američkim Državama 2008. godine javilo preko 215.000 novih slučajeva karcinoma pluća, i to oko 115.000 kod muškaraca i 100.000 kod žena. Pušenje je identifikovano kao vodeći uzrok nastanka oko 87% svih karcinoma pluća. U poređenju sa nepušačima, stopa mortaliteta od karcinoma pluća 22 puta je veća kod muškaraca pušača i 12 puta kod žena pušača (4).



Slika 2. Primarni uzrok smrti od tumora kod žena
(izvor: Bray et al, 2018)

Procenjeno je da je Srbija 2018. godine imala 6.982.604 stanovnika, a očekivano trajanje života bilo je 75,6 godina ukupno, sa nešto kraćim očekivanim trajanjem života kod muškaraca, i to 73,2 godine, nego kod žena – 78,1 godina. U 2018. godini u Srbiji je rođeno 63.975 dece, a umrlo je 101.655 ljudi, tako da je prirodni priraštaj bio -37.680 ljudi. **Slika 3** prikazuje rangirane uzroke smrti za 2018. godinu po stopi na 100.000 stanovnika. Na osnovu

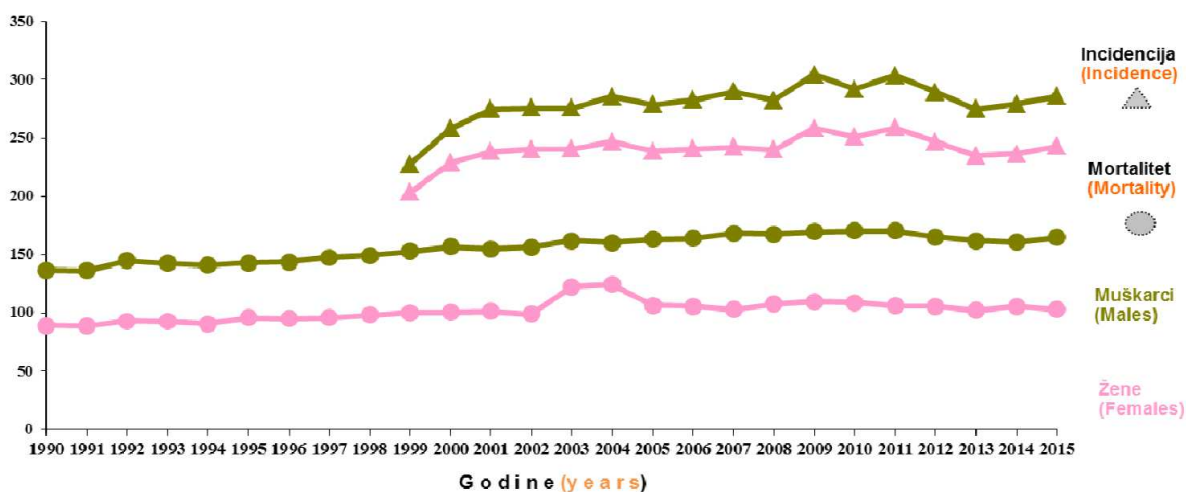
MKB 10 grupa bolesti, uočava se da su najčešći uzroci smrti bile bolesti sistema krvotoka sa stopom od 795 na 100.000 stanovnika, dok su tumori bili na drugom mestu sa stopom od 270 na 100.000 stanovnika (5).



Slika 3. Rang uzroka smrti (stopa na 100.000 stanovnika) po MKB 10 grupama, Srbija, 2018. godina

(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2019)

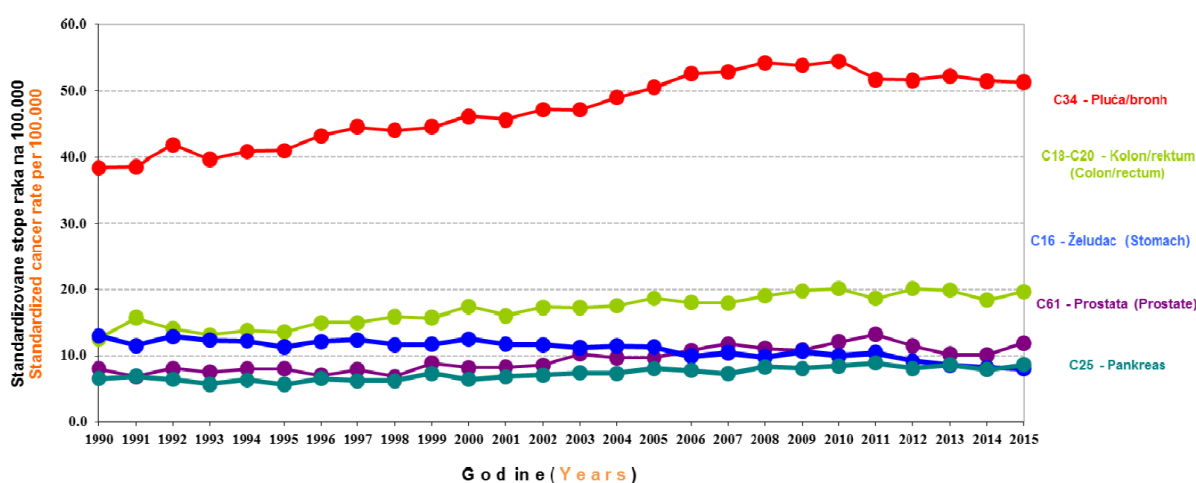
Slika 4 prikazuje standardizovane stope incidencije i mortaliteta od karcinoma u centralnoj Srbiji, po polu, od 1990. godine do 2015. godine (6). Uočava se porast incidencije maligniteta do 2009. godine, koji je praćen stagnacijom i blagim padom. Trend blagog rasta mortaliteta uočava se kod muškaraca i žena do 2011. godine, praćen stagnacijom i blagim padom do 2015. godine.



Slika 4. Standardizovana incidencija i mortalitet od karcinoma na 100.000 stanovnika, centralna Srbija, 1990-2015. godina

(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2017)

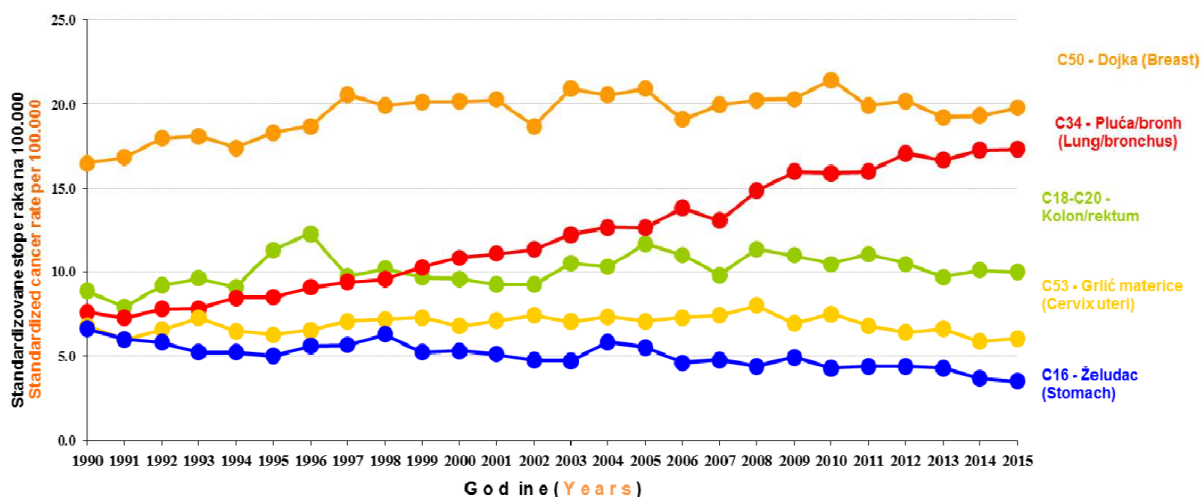
Slika 5 prikazuje standardizovane stope mortaliteta od vodećih lokalizacija karcinoma na 100.000 stanovnika kod muškaraca u centralnoj Srbiji od 1990. do 2015. godine. Na slici je izražen porast mortaliteta od karcinoma bronha i pluća (MKB šifra C34) sve do 2010 godine kada se uočava blagi pad i stagnacija stope mortaliteta. Karcinomi bronha i pluća su ujedno i najčešći uzrok smrti od karcinoma kod muškaraca, a praćeni su karcinomom kolona i rektuma, karcinomom želuca, prostate i pankreasa (6).



Slika 5. Standardizovane stope mortaliteta od vodećih lokalizacija karcinoma na 100.000 stanovnika, muškarci, centralna Srbija, 1990-2015. godina

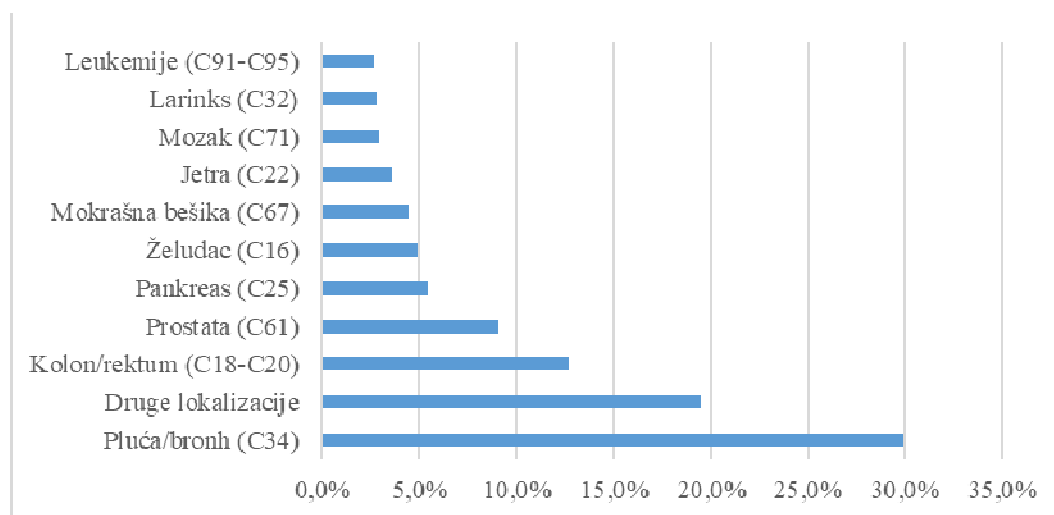
(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2017)

Slika 6 prikazuje standardizovane stope mortaliteta od vodećih lokalizacija karcinoma na 100.000 stanovnika kod žena u centralnoj Srbiji od 1990. do 2015. godine. Vodeći uzrok mortaliteta od karcinoma kod žena u ovom periodu bio je karcinom dojke, koji je do 2000-tih godina bio u porastu, da bi od 2001. godine usledila stagnacija i blagi pad. Karcinomi pluća i bronha su u konstantnom porastu od 1990. godine do 2015. godine, a od 2000. godine su prestigli kolorektalni karcinom, da bi 2015. godine skoro sustigli karcinom dojke. Ostali najčešći uzroci smrti od karcinoma kod žena u 2015. godini bili su karcinom grlića materice i karcinom želuca (6).



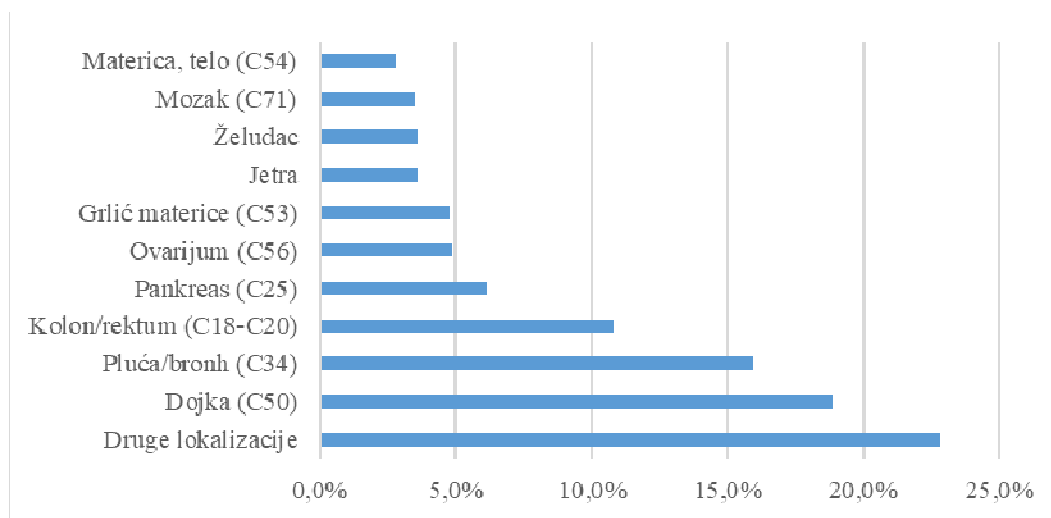
Slika 6. Standardizovane stope mortaliteta od vodećih lokalizacija karcinoma na 100.000 stanovnika, žene, centralna Srbija, 1990-2015. godina
(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2017)

Slika 7 prikazuje vodeće lokalizacije kod umiranja od malignih tumora kod muškaraca u centralnoj Srbiji 2015. godine. Karcinom pluća i bronha je najznačajnija lokalizacija malignih tumora sa 30% udela u ukupnoj smrtnosti od karcinoma kod muškaraca. Ostali najčešći uzroci smrti od karcinoma kod muškaraca su karcinom kolona i rektuma, karcinom prostate, karcinom pankreasa, karcinom želuca, karcinom mokraćne bešike, karcinom jetre, karcinom mozga, karcinom larinksa, kao i leukemije (6).



Slika 7. Vodeće lokalizacije u umiranju od malignih tumora kod muškaraca, centralna Srbija, 2015
(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2017)

Slika 8 prikazuje vodeće lokalizacije u umiranju od malignih tumora kod žena u centralnoj Srbiji 2015. godine. Karcinom pluća i bronha je drugi uzrok umiranja sa udelom od skoro 16% u svim uzrocima smrti od karcinoma, odmah posle karcinoma dojka koji ima udeo od skoro 19%. Ostali uzroci smrti od karcinoma kod žena su karcinom kolona i rektuma, karcinom pankreasa, karcinom ovarijuma, karcinom grlića materice, karcinom jetre, karcinom želuca, karcinom mozga, kao i karcinom tela materice (6).

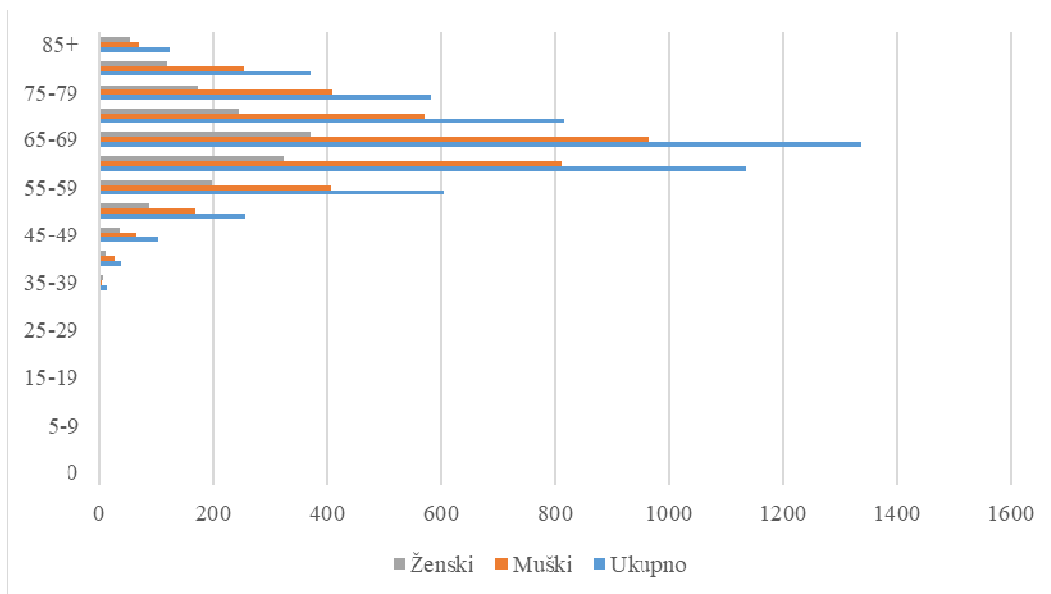


Slika 8. Vodeće lokalizacije u umiranju od malignih tumora kod žena, centralna Srbia, 2015

(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2017)

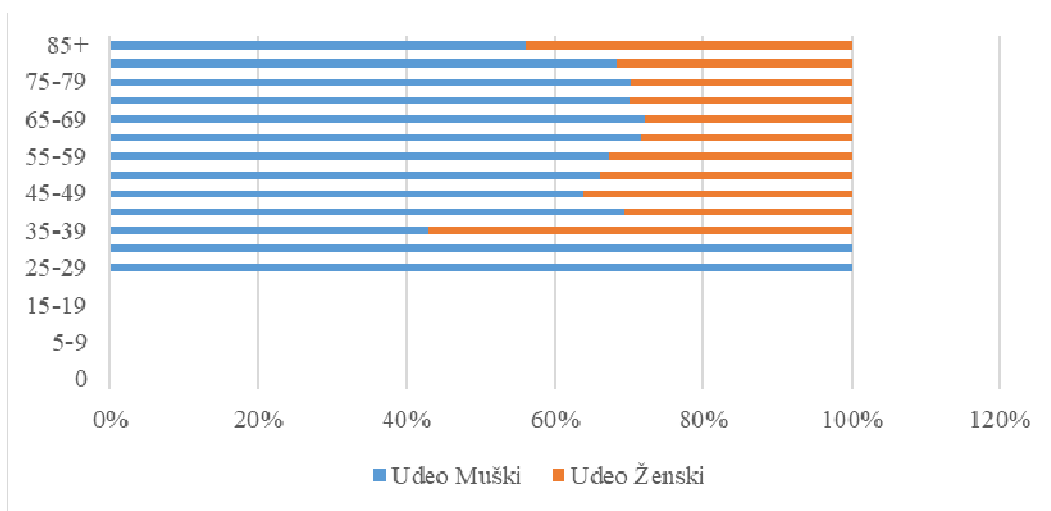
Slika 9 prikazuje broj obolelih od malignog tumora bronha i pluća po starosnim grupama, ukupno i po polu. Najveći broj obolelih grupisan je između 55. i 80. godine života, iako se sporadični slučajevi uočavaju već od 35. godine (5).

Slika 10 prikazuje udeo muškaraca i žena u umiranju od karcinoma bronhija i pluća dokom 2018. godine po starosnim grupama. Muškarci najčešće imaju udeo između 60 i 70% u ukupnom broju umrlih (5).



Slika 9. Maligni tumor bronhija i pluća po starosnim grupama, ukupno i po polu, 2018. godina

(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2019)



Slika 10. Udeo muškaraca i žena u umiranju od malignih tumora bronhija i pluća po starosnim grupama, 2018. godina

(izvor: Institut za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, 2019)

1.2 Faktori rizika i prevencija karcinoma pluća

Karcinom pluća predstavlja prvi uzrok mortaliteta u svetu i procenjuje se da je odgovoran za svaki peti smrtni ishod uzrokovan malignim tumorima. Ključni faktor rizik za nastanak ovog karcinoma predstavlja pušenje, a procenjuje se da u svetu trenutno ima skoro 1 milijardu pušača.

1.2.1 Pušenje i karcinom pluća

Duvanski proizvodi povezuju se sa skoro 90% slučajeva karcinoma pluća, te smanjenje pušenja i upotrebe ovih proizvoda i dalje predstavlja ključni faktor u smanjenu morbiditeta i mortaliteta od karcinoma pluća (7). Posebno je interesantan podatak da skoro 80% pušača (trenutnih pušača) živi u nisko- i srednje-razvijenim zemljama sveta (8). Iako je borba protiv duvanskog dima aktuelna već decenijama širom sveta, ali i u našoj zemlji, rešenje ovog problema još uvek nije na vidiku. Potrebno je istaći da je prevalencija pušenja viša među muškarcima, osobama sa nižim socio-ekonomskim statusom, osobama sa invaliditetom ili mentalnim poremećajima. Čak i kada se posmatraju niže- i srednje-razvijene zemlje, prevalencija pušenja je viša kod osoba sa nižim socio-ekonomskim statusom, što kao rezultat daje nejednako opterećenje karcinomom pluća.

Poseban izazov predstavlja povećana upotreba novih (i starih) duvanskih proizvoda kao što su cigare, negorući duvan, elektronske cigarete, itd. Iako se marketinške kampanje u vezi sa ovim, pogotovo novim proizvodima pozivaju na njihovu smanjenu štetnost ili potpunu neškodljivost, još uvek je rano za procenu dugoročnih efekata pušenja ovih alternativnih duvanskih proizvoda. Još jednu nepoznanicu predstavlja i uticaj novih duvanskih proizvoda na prestanak pušenja, što predstavlja još jedan česti stub marketinških kampanja u vezi sa novim duvanskim proizvodima. Jedno međunarodno istraživanje kod pušača starijih od 15 godina pokazalo je da čak 20% njih koristi, pored cigareta, i bar jedan novi duvanski proizvod, kao što su elektronske cigarete, cigarete sa zagrevanjem duvana, itd (9).

Na nastanak karcinoma pluća utiču genetske predispozicije osobe. Studije su pokazale da rizik od karcinoma kod bliskih srodnika može da bude i do 25% uvećan u slučaju da postoji srodnik oboleo od karcinoma pluća (10).

Na nastanak karcinoma pluća mogu uticati i niski nivoi različitih antioksidanasa u serumu. Najčešće se u vezi sa ovim malignomom dovode vitamini A, C, E, kao i β -karoten, koji imaju protektivnu ulogu.

Ne treba zaboraviti i profesionalne uzroke nastanka karcinoma pluća. Najčešće se u vezu sa ovim karcinomom dovodi izloženost azbestu, berilijumu, hromu, niklu, kadmijumu, berilijumu, silicijumu, a značajna je i izloženost policikličnim aromatičnim ugljovodonicima. Profesionalna izloženost se dovodi u vezu sa oko 5% i 10% mortaliteta kod žena i muškaraca u svetu (10).

Na kraju, karcinom pluća može nastati na polju drugih plućnih bolesti, a u ovoj grupi se najčešće pominju tuberkuloza, fibroza, silikoza, hronični bronhitis i emfizem (10).

1.2.2 Prevencija karcinoma pluća

Prestanak pušenja i dalje predstavlja primarnu prevenciju karcinoma pluća i zbog toga su širom sveta organizovani programi za savetovanje, podršku i lečenje zavisnosti od duvana. Uticaj dvostruke ili višestruke upotrebe duvanskih proizvoda (npr. cigarete zajedno sa elektronskim cigaretama) na razvoj karcinoma pluća još uvek je nejasan. Postoji opšte očekivanje da će upotreba alternativnih duvanskih proizvoda koji nisu zasnovani na sagorevanju duvana dovesti dugoročno do smanjenja morbiditeta i mortaliteta od karcinoma pluća, ali je suviše rano da bi mogao da se donese bilo kakav zaključak.

Moderna istraživanja fokusirala su se na upotrebu elektronskih sistema za dopremanje nikotina (electronic nicotine delivery systems – ENDS), ali je suviše rano za zaključke u vezi sa dugoročnim zdravstvenim posledicama, pogotovo u populaciji mladih ljudi ili trudnica. Istraživanja su pokazala da je upotreba ENDS uspešnija kao terapija za ostavljanje cigareta, ali samo uz bihevioralnu podršku (11).

Zajednički zaključak svega gore navedenog ukazuje da je globalna kontrola upotrebe duvana osnov za postizanje uspeha u smanjenju morbiditeta od svih bolesti koje su povezane sa upotrebom duvana, pa samim tim i smanjenjem morbiditeta od karcinoma pluća. Ovo je moguće postići kroz četiri globalne prakse zasnovane na dokazima (12), a to su:

1. Povećanje cene duvana;
2. Zabrana pušenja – politika za prostore bez duvanskog dima;
3. Agresivne medijske kampanje;
4. Pristup terapiji za prestanak pušenja.

Poslednji od navedenih ključnih faktora za smanjenje prevalence pušenja i posledično smanjenje morbiditeta od oboljenja povezanih sa pušenjem predstavlja poseban izazov u zemljama sa srednjim i niskim prihodima, a kao rezultat inicijative Alijanse za lečenje

zavisnosti od duvana oko 9.000 zdravstvenih radnika u ovim zemljama obučeno je u vezi sa lečenjem od zavisnosti od duvana (13).

Iako je prestanak pušenja odavno poznat kao metod primarne prevencije karcinoma pluća, kao i ostalih karcinoma povezanih sa upotrebom duvana, sada je jasno da je prestanak pušenja i ključan metod tercijarne prevencije kod karcinoma pluća. Drugačije rečeno, nastavak upotrebe duvana ima višestruki negativni efekat na lečenje karcinoma pluća uključujući (7,14):

1. Kraće preživljavanje;
2. Veća verovatnoća recidiva bolesti;
3. Pojava drugih primarnih maligniteta;
4. Veći broj simptoma;
5. Niži kvalitet života.

Prestanak pušenja kod pacijenata obolelih od karcinoma pluća je toliko značajan faktor, da je Međunarodna asocijacija za proučavanje karcinoma pluća (International Association for the Study of Lung Cancer – IASLC) savetovanje pacijenata da prestanu da puše i lečenje od zavisnosti od duvana dodala kao indikator visoko-kvalitetne nege pacijenata obolelih od ove bolesti (15).

Sekundarna prevencija karcinoma pluća podrazumeva rano otkrivanje i blagovremeno lečenje ove bolesti. Idealan test koji bi mogao da se koristi za rano otkrivanje karcinoma pluća treba da bude osetljiv, jednostavan, brz i finansijski isplativ. Efekat je moguće povećati tako što bi skriningom bile obuhvaćene rizične grupe, a kada je reč o karcinomu pluća, rizične grupe predstavljaju individue genetski predisponirane za malignitet pluća, a idealan test bi predstavljala detekcija abnormalnog genetskog materijala u sputumu ili plazmi periferne krvi.

Skrining za karcinom pluća upotrebom kompjuterizovane tomografije niske doze već dugo je poznata metoda za rano otkrivanje karcinoma pluća. Ipak, neophodno je imati na umu da se ova metoda značajno razlikuje od drugih skrining programa, kao što je upotreba mamografije za skrining karcinoma dojke, gde je skrining preporučen svim osobama u određenim godinama. Zbog implikacija koje rezultati kompjuterizovane tomografije mogu imati po pacijenta, u smislu kasnijih dodatnih analiza, invazivne dijagnostike, i hirurških intervencija, neophodno je uvek razmišljati o postupcima koji će doneti najveći benefit pacijentu, uz najmanje potencijalne negativne efekte.

Pristup u proceni rizika od karcinoma pluća prvenstveno je bio zasnovan na godinama i broju pakli cigareta koje pacijent puši, međutim ovaj pristup možda i nije najoptimalniji, pokazala su istraživanja koja su uključivala pacijente sa rizikom procenjenim na ovaj način i podvrgnutim kompjuterizovanoj tomografiji niske doze (16). Drugačiji pogled na ovaj problem dali su autori iz Severne Amerike, koji su pokazali da bi tek oko 40% pacijenata koji imaju karcinom pluća bili označeni kao rizični po kriterijuma Američke akcione grupe za preventivne usluge (U.S. Preventive Services Task Force – USPSTF). To znači da bi čak 60% pacijenata obolelih od karcinoma pluća u Sjedinjenim Američkim Državama i Kanadi bilo označeno kao nedovoljno visokog rizika da bi učestvovali u skrining programu (17).

Poslednje studije objavljene u Sjedinjenim Američkim Državama, u Evropi i Aziji pokazale su da upotreba kompjuterizovane tomografije niske doze smanjuje desetogodišnji mortalitet od karcinoma pluća za oko 25% kod muškaraca i skoro 40% kod žena (18,19).

Poslednjih godina sve se više pažnje posvećuje neinvazivnom skriningu koji uključuje biomarkere kao što je prisustvo različitih volatilnih organskih komponenti (volatile organic compounds – VOCs) u izdahnutom vazduhu. Ovaj vid skrininga zasniva se prvenstveno na analizi specifičnih molekula u izdahnutom vazduhu.

Skrining koji se zasniva na biomarkerima u telesnim tečnostima, kao što je prisustvo miRNK koji koje kontrolišu ekspresiju ključnih gena povezanih sa genezom tumora, predstavlja sličan pokušaj da se rano otkriju karcinomi pluća. Neophodno je imati na umu da su ove metode tek u početnoj fazi razvoja i da još uvek ne možemo govoriti o njihovoj praktičnoj primeni, već o istraživanjima na ovu temu.

Naše istraživanje GAS5 duge nekodirajuće RNK predstavlja jedan mali korak u pravcu otkrivanja različitih kandidata koji mogu pomoći u ranom otkrivanju, stejdžingu, prognozi i praćenju terapije nesitnoćelijskog karcinoma pluća.

1.3 Tumori pluća

Svetska zdravstvena organizacija (SZO) objavila je 2015. godine reviziju klasifikacije tumora pluća (20). Po ovoj klasifikaciji, tumori pluća dele se na:

1. Epitelne tumore;
2. Mezenhimalne tumore;
3. Limfohistiocistične tumore;
4. Tumore ektopičnog porekla i
5. Metastatske tumore;

Većina tumora pluća pripadaju patohistološkoj kategoriji epitelnih tumora. Benigni tumori su retke lezije i čine manje od 1% svih operisanih tumora pluća. Svi nebronhogeni primarni tumori (mezenhimskog, epitelijskog, limforetikularnog i vaskularnog porekla) čine samo 3% do 5% svih tumora pluća, i većina ovih retkih tumora (izuzev karcinoida i hamartoma) ima manje od 100 slučajeva opisanih u literaturi (21). Ne postoji opšte prihvaćena klasifikacija, ali je poznavanje ovih tipova tumora značajno u diferencijalnoj dijagnozi pacijenata sa solitarnim ili multiplim promenama u plućima.

U nomenklaturi tumora pluća, izraz „benigno“ se često pogrešno koristi, jer se neoplazme niskog stepena malignosti, zbog slabog potencijala za metastaziranje, često imenuju kao benigne čime se među pacijentima formira lažni osećaj sigurnosti (22).

1.3.1 Epitelni tumori pluća – karcinom pluća

Epitelni tumori pluća jesu grupa različitih patohistoloških tipova tumora koji se nazivaju karcinomi pluća. 2015. godine SZO je objavila novo izdanje „Klasifikacije tumora pluća, pleure, timusa i srca“, ali je „Nacionalni vodič dobre kliničke prakse – Karcinom pluća“ zasnovan na klasifikaciji iz 2004. godine.

1.3.1.1 Podela karcinoma pluća

Karcinomi pluća dele se na sledeće podtipove:

1. Skvamocelularni karcinom pluća
 - a. Sitnoćelijski;
 - b. Svetloćelijski;
 - c. Papilarni;

- d. Bazaloidni;
- 2. Mikrocelularni karcinom pluća (sitnoćelijski sa neuroendokrinom diferencijacijom)
 - a. Kombinovan sa krupnoćelijskim karcinomom (najčešće sa slabo diferentovanim skvamocelularnim karcinomom);
- 3. Adenokarcinom pluća
 - a. Mešoviti;
 - b. Acinarni;
 - c. Papilarni;
 - d. Bronhioalveolarni
 - i. Nemucinozni;
 - ii. Mucinozni;
 - e. Mešoviti, nemucinozni i mucinozni ili nedeterminisani;
 - f. Solidni;
- 4. Krupnoćelijski karcinom pluća
 - a. Neuroendokrini tip;
 - b. Kombinovan i sa drugim krupnoćelijskim karcinomima;
 - c. Bazaloidni;
 - d. Limfoepiteliomu sličan;
 - e. Svetloćelijski tip;
 - f. Sa rabdoidnim fenotipom;
- 5. Adenoskvamozni karcinom
- 6. Sarkomatoidni karcinom
 - a. Pleomorfni;
 - b. Vretenastoćelijski;
 - c. Gigantocelularni;
 - d. Karcinosarkom;
 - e. Plućni blastom;
- 7. Karcinoid tumor
 - a. Tipični;
 - b. Atipični;
- 8. Karcinomi pljuvačnih žlezda
 - a. Muko-epidermoidni;
 - b. Adenoid-cistični;
 - c. Epiteijalno-mioepiteijalni;

9. Premaligne lezije

- a. Displazija epitela i intraepitelijalni karcinom („in situ“);
- b. Atipična adenomatozna hiperplazija;
- c. Difuzna idiopatska plućna neuroendokrina hiperplazija

S obzirom da postoje velike razlike u terapijskom pristupu pacijentima sa sitnoćelijskim karcinomom i drugim vrstama karcinoma pluća, sve primarne maligne tumore pluća u kliničkoj praksi delimo na nesitnoćelijske i sitnoćelijske karcinome pluća (23).

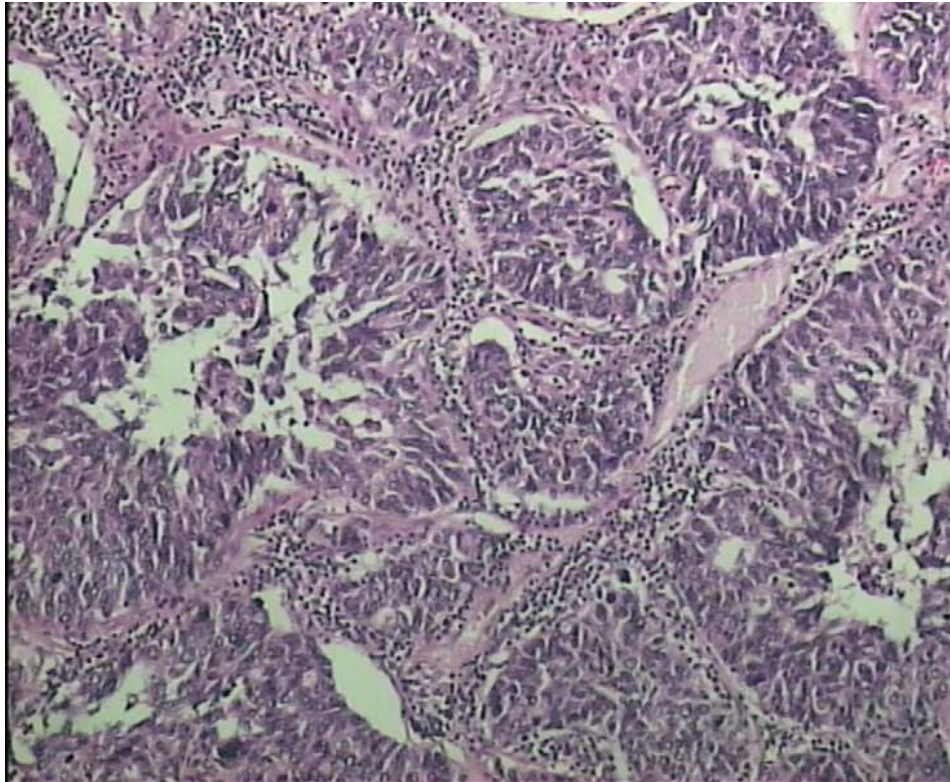
1.3.2 Nesitnoćelijski karcinomi pluća

Nesitoćelijski karcinomi pluća (non-small-cell lung carcinoma – NSCLC) predstavljaju bilo koji epitelni tumor pluća (karcinom) koji nije sitnoćelijski (small cell lung carcinoma – SCLC). Nesitnoćelijski karcinom pluća predstavlja najčešći podtip karcinoma pluća (oko 85%), a ujedno je i najčešći je primarni tumor koji metastazira u mozak (24,25).

Nesitoćelijski karcinom pluća je po svom patohistološkom tipu najčešće: adenokarcinom, skvamocelularni karcinom i krupnoćelijski karcinom.

1.3.2.1 Adenokarcinom pluća

Adenokarcinom je invazivni, maligni, epitelni tumor sa glandularnom diferencijacijom, produkcijom mukusa ili ekspresijom markera pneumocita. Ovo je najčešći ćelijski podtip nesitnoćelijskog karcinoma pluća i njegov udeo je između 40% do 50% u svim slučajevima karcinoma pluća. Kod adenokarcinoma najčešće se javljaju periferne lezije, ali se često kao primarna manifestacija bolesti javljaju udaljene metastaze. Ova vrsta tumora često nastaje na terenu ožiljaka od prethodnih bolesti pluća. *Slika 11* prikazuje adenokarcinom pluća na histološkom preparatu.

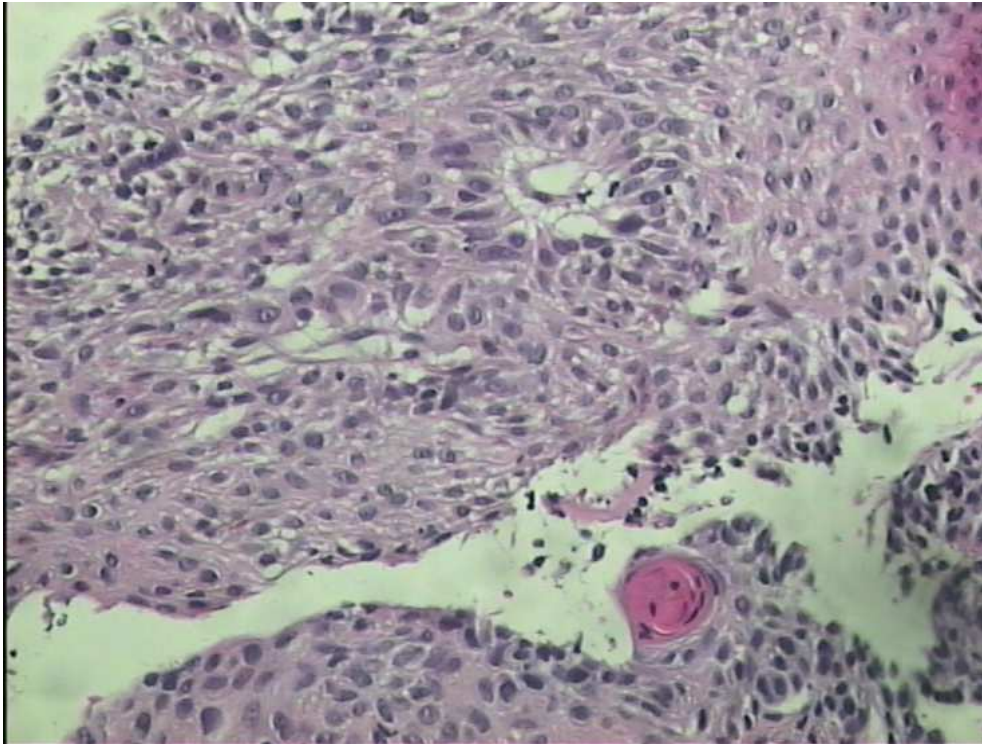


Slika 11. Adenokarcinom pluća

1.3.2.2 Skvamocelularni karcinom pluća

Skvamocelularni karcinom je maligni, epitelni tumor koji karakteriše keratinizacija i/ili intercelularni mostovi. Kao i svi karcinomi pluća, ali mnogo izraženije nego adenokarcinom pluća, skvamocelularni karcinom pluća je povezan sa navikom pušenja (20).

Skvamocelularni karcinom pluća karakteriše spor rast i kasno davanje metastaza, pretežno u jetru, nadbubrežne žlezde, bubrege i kosti. Tipična prezentacija podrazumeva centralno pozicioniran tumor koji može biti lokalizovan endobronhijalno i davati opstruktivnu leziju sa pridruženom atelektazom ili postopstruktivnom pneumonijom. Sklon je kavitaciji. U slučaju da je prisutna kavitacija, unutrašnji zid je obično nepravilno zadebljao, a kada je prisutna i sekundarna infekcija može se razviti nivo vazduha i tečnosti (26). Izražena nekroza može da dovede do formiranja cistične promene sa tankim zidom. Skvamocelularni karcinom je najčešći histološki tip koji se nalazi kod Pancoast ili tumora gornjeg sulkusa (27). *Slika 12* prikazuje skvamocelularni karcinom pluća na histološkom preparatu.



Slika 12. Skvamocelularni karcinom pluća

1.3.2.3 Krupnoćelijski karcinom pluća

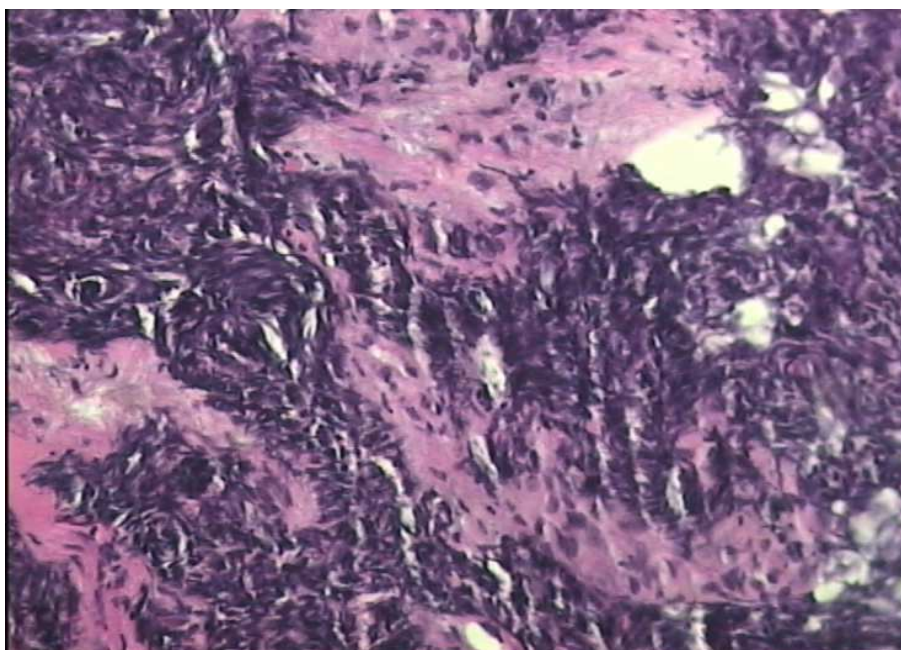
Krupnoćelijski karcinom pluća jeste nediferencirani nesitnoćelijski karcinom kome nedostaju citološke, arhitektonske i imunohistohemijske karakteristike sitnoćelijskog karcinoma, adenokarcinoma, ili skvamocelularnog karcinoma pluća. Zbog toga je za dijagnozu neophodan opsežan uzorak tumora, i nije je moguće postaviti na osnovu citoloških uzoraka.

U većini slučajeva, krupnoćelijski karcinom se prezentuje kao periferna promena. Često se javlja kavitacija i klasifikacija tumora. Ovaj tip tumora brzo raste i metastazira limfnim i hematogenim putevima, dajući često hilarnu ili medijastinalnu limfopatiju (27). Karcinom džinovskih ćelija predstavlja podtip sa više gigantskih ćelija i agresivnijim tokom, što je praćeno lošijom prognozom. Varijanta karcinoma velikih ćelija je i neuroendokrini karcinom velikih ćelija ili neuroendokrini karcinom srednje velikih ćelija, koji takođe imaju lošiju prognozu od klasičnog oblika. Neuroendokrini aktivnost ih takođe svrstava u grupu neuroendokrinih tumora pluća (atipični i tipični karcinoid, sitnoćelijski karcinom).

1.3.3 Sitnoćelijski karcinom pluća

Sitnoćelijski karcinom pluća je maligni epitelni tumor pluća koji se sastoji od malih ćelija sa oskudnom citoplazmom, loše definisanim granicama, fino distribuisanim granularnim hromatinom jedra, kao i nepostojećim ili inkapsuliranim jedarcem. Ćelije su okrugle, ovalne ili vretenastog oblika. Najčešće je uočljiva izražena nekroza i visok mitotski broj. Najveći broj sitnoćelijskih tumora eksprimira neuroendokrine imunohistohemijske markere (20). Sitnoćelijski karcinom pluća je brzo rastući, izuzetno agresivan oblik karcinoma pluća koji odlikuje kratko preživljavanje i smatra se da je u momentu dijagnostike već metastazirao. Ovi tumori verovatno nastaju iz neuroendokrinih ćelija, koje sadrže neurosekretorne granule i mogu izlučivati peptidne hormone (28).

Tipična prezentacija uključuje centralno lokalizovan tumor. Brzo infiltriše medijastinum i medijastinalne strukture. *Slika 13* prikazuje sitnoćelijski karcinom pluća



Slika 13. Sitnoćelijski karcinom pluća

Retka prezentacija bolesti je i solitarna leziju unutar parenhima pluća, karakteristična za nesitnoćelijske tumore pluća. Može biti prisutan i pleuralni i perikardni izliv, a ako se dokaže da je maligne etiologije, ukazuje na stejdžing bolesti i ishod lečenja.

1.4 Dijagnostika karcinoma pluća

Dijagnostičkim postupcima dokazujemo prirodu bolesti ali i procenu proširenosti bolesti, što je temelj određivanja adekvatnog modaliteta lečenja.

Opšti dijagnostički postupak obuhvata anamnezu i fizički pregled uz rutinske laboratorijske analize krvi predstavljaju prvi korak u planiranju dalje dijagnostike. Procena performans statusa je neophodna da bi se procenila realna mogućnost da organizam obolelog može da izdrži primenjeno lečenje i određen stepen kvaliteta života.

Dijagnostički postupci se mogu podeliti na neinvazivne i invazivne dijagnostičke postupke. Potrebno je voditi se principom što manje invazivnosti za pacijenta, ali obezbediti dovoljno veliki i kvalitetan uzorak kako bi se bolest tačno dijagnostikovala, a histološka analiza omogućila razlikovanje histoloških subtipova tumora.

1.4.1 Neinvazivna dijagnostika

Neinvazivni dijagnostički postupci podrazumevaju:

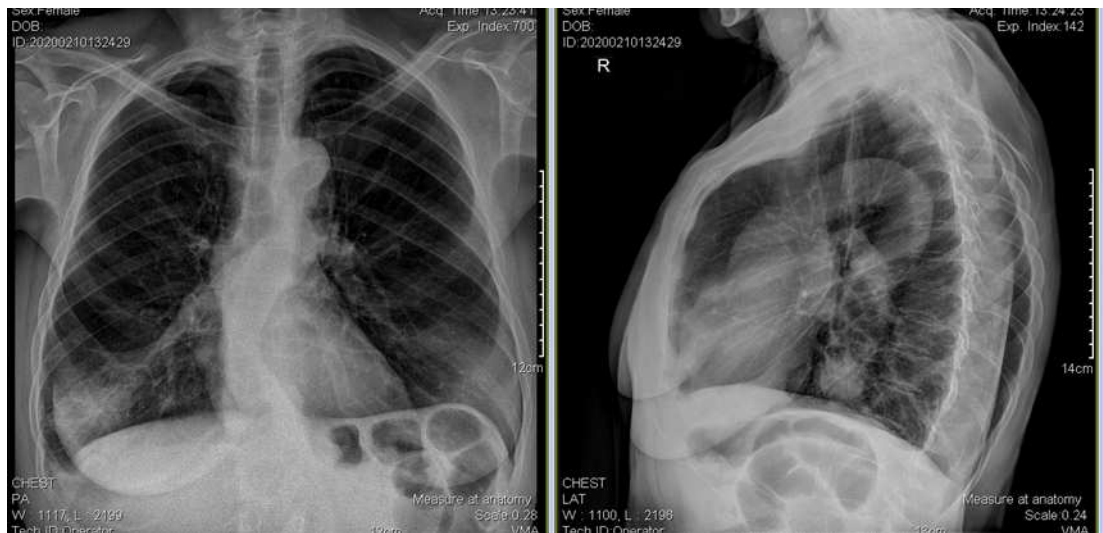
1. Citologiju sputuma;
2. Radiografiju pluća;
3. Kompjuterizovanu tomografiju grudnog koša;
4. Magnetnu rezonancu grudnog koša;
5. Kompjuterizovanu tomografiju i magnetnu rezonancu glave;
6. Pozitron emisiju tomografiju (PET);
7. Ultrazvuk grudnog koša;
8. Ultrazvuk trbuha;
9. Scintigrafiju skeleta.
10. Virtuelna bronhoskopija

1.4.1.1 Citologija sputuma

Citologija sputuma je često pozitivna kod centralno lokalizovanih tumora. Nalaz na malignitet je tačan u više od 90% slučajeva. Ipak, nije precizno razlikovanje histoloških subtipova iz ovog tipa uzorka (29).

1.4.1.2 Radiografija pluća

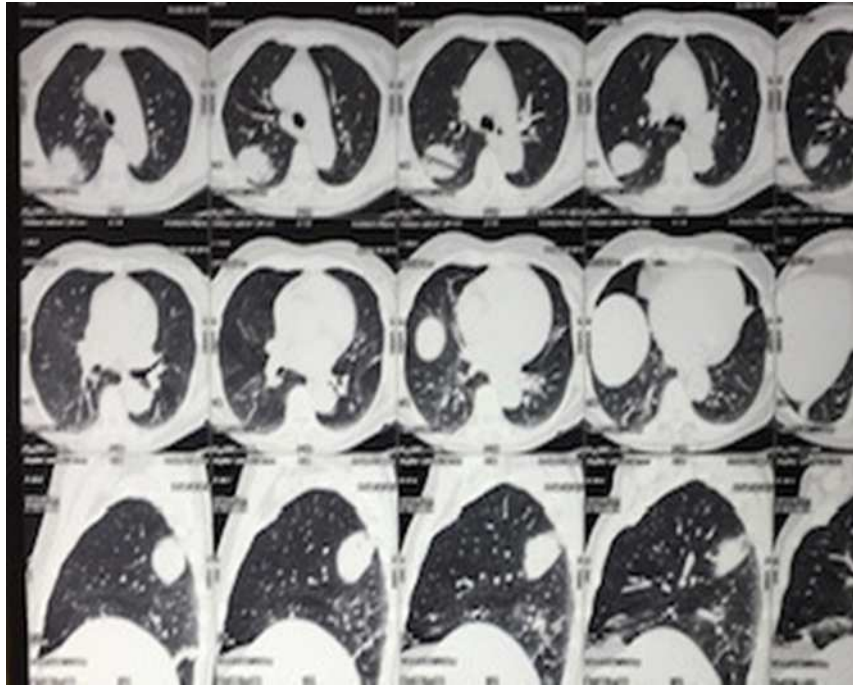
Radiografija pluća je osnov dijagnostike za postojeću kliničku plućnu simptomatologiju. Ovom metodom se inicijalno utvrđuje prisustvo promene u plućima. Ukoliko je radiografski nalaz pluća referentan, to ne isključuje prisustvo tumora, te su indikovana dodatna ispitivanja. **Slika 14** prikazuje radiografiju grudnog koša pacijenta kod kojeg je dijagnostikovan nesitnoćelijski karcinom pluća (30).



Slika 14. Radiografija pacijenta sa karcinomom pluća

1.4.1.3 Kompjuterizovana tomografija

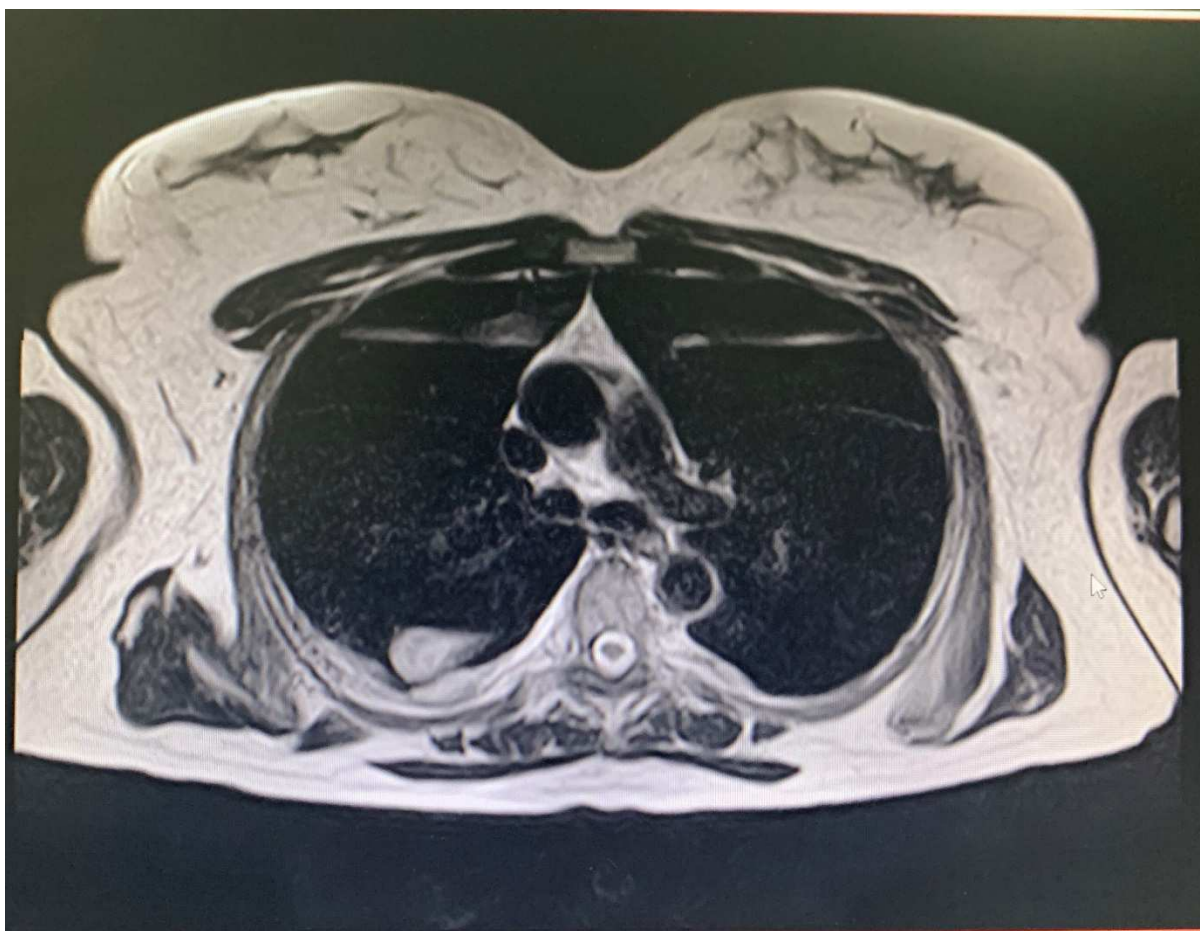
Kompjuterizovana tomografija (CT) grudnog koša i gornjeg abdomena predstavlja osnovnu metodu za radiološku potvrdu prisustva karcinoma pluća i procenu raširenosti istog. Preporučuje se sprovođenje ove dijagnostičke metode pre bronhoskopije kako bi se dalje usmerila dijagnostika. Predstavlja neophodan korak kod svih bolesnika kod kojih se razmišlja o hirurškom lečenju. Ako su na snimku kompjuterizovane tomografije vidljive limfne žlezde veće od 1 cm u najmanjem diametru, nalaz sugerise na postojanje regionalnih metastaza u tim čvorovima. Što se tiče maligno izmenjenih limfnih žlezda u medijastinumu, kompjuterizovana tomografija ima pozitivnu prediktivnu vrednost od 56%, a negativnu prediktivnu vrednost od 83% (29). **Slika 15** prikazuje kompjuterizovanu tomografiju grudnog koša.



Slika 15. Kompjuterizovana tomografija grudnog koša pacijenta sa karcinomom pluća

1.4.1.4 Magnetna rezonanca grudnog koša

Magnetna rezonanca grudnog koša je indicovana kod tumora koji suspektno infiltrišu zid grudnog koša, organe medijastinuma (velike krvne sudove, srce i srčane šupljine). *Slika 16* prikazuje snimak magnetnom rezonancom pacijenta sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (31).



Slika 16. Magnetna rezonanca grudnog koša pacijenta sa karcinomom pluća

1.4.1.5 Ultrazvuk grudnog koša i trbuha

Ultrazvuk grudnog koša se koristi pri planiranju iglene biopsije perifernog tumora koji je u kontaktu sa zidom grudnog koša ili medijastinalnim organima. Ultrazvuk se koristi za određivanje dubine i smera punkcije. Ultrazvuk trbuha se koristi za procenu raširenosti bolesti, gde nalaz uvećanja određenih organa može ukazati na metastatsku bolest.

1.4.1.6 Scintigrafija skeleta

Scintigrafija skeleta predstavlja izuzetno senzitivnu metodu nuklearne medicine u kojoj se koristi marker kao što je tehnecijum-99m (^{99m}Tc) koji skelet brzo apsorbuje i omogućava vizualizaciju patološkog deponovanja usled malignih ili benignih promena (*Slika 17*) (32).



Slika 17. Scintigrafija skeleta
(izvor: www.wikipedia.org)

Precizniji stejdžing je svakako i u vezi sa većom dostupnošću dijagnostičkih procedura, pa i primenom pozitron emisinom tomografije , koja se danas sve više koristi već u početnoj dijagnostici. Ova metoda se zasniva na osobini tumorskih ćelija da pojačano unose radioizotop 18 F-fluorodezoksiglukoze FDG. Ta metabolička aktivnost tumorskih ćelija se definiše SUV-om)Standardized Uptake Value. Studije su pokazale da je čak 62% pacijenata imalo promenu stadijuma TNM nakon PET snimanja, u kojoj je do 52% rezultiralo promenom modaliteta lečenja (33). Za evaluaciju primarnog tumora koristi se PET/CT, s tim da se mogu pojaviti i lažno pozitivni rezultati uzrokovani metabolički aktivnim infektivnim ili zapaljenskim lezijama. Granulomatozna oboljenja poput sarkoidoze, tuberkuloze ili gljivičnih granuloma obično dovod do značajne akumulacije FDG. Takođe, FDG nije pogodan za stejdžing ako su lezije premale (2 cm ili manje) i ispod praga rezolucije PET-e (34).

VIRTUELNA BRONHOSKOPIJA predstavlja kombinaciju spiralnog skenera (CT) I virtuelnih kompjuterskih tehnika kojima se vrši trodimenzionalna rekonstrukcija slike disajnih puteva.

1.4.2 Invazivna dijagnostika

Cilj invazivne dijagnostike jeste dobijanje materijala za histopatološku analizu, čime je moguće potvrditi bolest i obezbediti informacije o raširenosti iste.

1.4.2.1 Bronhoskopija

Bronhoskopija je prva metoda za dokazivanje i histopatološku potvrdu prisutnog karcinoma pluća. Može da se izvodi u lokalnoj infiltrativnoj anesteziji (fleksibilna bronhoskopija) ili u opštoj anesteziji (rigidna bronhoskopija). Rešava 57% opstrukcija velikih disajnih puteva i 43% dilataciju istih (35). Ova intervencija može biti i terapijska i palijativna. Kod postojanja perifernih tumora, uvećanih lgl uzorci za citološki pregled dobijaju se transbronhijalnom iglenom aspiracijom (transbronchial needle aspiration). Fluorescentna bronhoskopija se koristi za otkrivanje ranih promena u zidu bronha, karcinoma in situ. Bronhoskopija se koristi i u terapijske svrhe, radi ekstrakcije stranog tela i evakuaciju sekreta u traheobronhijalnom stablu. EBUS- endobronhijalni ultrazvuk predstavlja kombinaciju ultrazvuka i bronhoskopije a koristi se za procenu raširenosti bolesti ka sredogrudju. EBUS je specifičniji i senzitivniji 0.80-0.87 u odnosu na virtuelanu bronhoskopiju gde je 0.80 (36)

Perkutana iglena biopsija tumora je pouzdana do 90% za dijagnostiku perifernih tumora pluća.

Pleuralna punkcija i biopsija pleure se koriste za dijagnostiku i evakuaciju pleuralnih izliva radi dokazivanja maligne etilogije.

1.4.2.2 Invazivni hirurški dijagnostički postupci

U slučajevima kada prethodnim postupcima nije moguće potvrditi prisustvo karcinoma pluća indikovana je hirurška dijagnostika:

- Cervikalna medijastinoskopija koja se primenjuje kod dokazivanja prisustva malignih ćelija u limfnim čvorovima sredogrudja: gornjih desnih i levih paratrahealnih Lgl (2D I 2L), desnih i levih donjih paratrahealnih lgl(4Li 4D) i subkarinealnih lgl (7)
- Video-asistirana torakoskopija (VATS)-kojom vizuelizujemo sve patološke promene na plućima i pleuri kamerom i ciljano se uzimaju uzorci promenjenog tkiva. Ova minimalno invazivna metoda se koristi i u dijagnostičke ali i u terapijske svrhe. Pacijenti koji inače ne bi bili kandidati za operaciju zbog starijeg uzrasta ili značajnih komorbiditeta neretko mogu da se podvrgnu VATS (37).

- VAMLA je video asistirana medijastinoskopska limfadenektomija (38)
- TEMLA je transcervikalna ekstenzivna medijastinoskopska limfadenektomija (39)
- Otvorena biopsija pluća je danas potisnuta metoda ali kad sve ostale primenjene dijagnostičke procedure nisu dokazale bolest i ona je dragocena.

1.5 Stejdžing nesitnoćelijskog karcinoma pluća

Stejdžing kod karcinoma predstavlja neophodan korak, zasnovan na različitim deskriptorima, koji zajedno određuju prognozu bolesti. Tokom vremena klasifikacija tumora u toraksu revidirana je više puta, a ove revizije zasnovane su najčešće na sve većoj bazi sa podacima o preživljavanju pacijenata tokom vremena (40). Sistem za stejdžing „Tumor-Nodulus-Metastaza“ (TNM) upotrebljavaju najveća svetska udruženja koja se bave istraživanjem i lečenjem malignih tumora. U Januaru 2017. godine objavljena je poslednja, 8. revizija Američkog zajedničkog komiteta za karcinome (American Joint Committee on Cancer – AJCC) u vezi sa stejdžingom karcinoma pluća (41). Ova revizija zasnovana je na najdetaljnijoj bazi u koju je uključeno skoro 95.000 pacijenata iz 46 centara u preko 19 zemalja širom sveta. Pacijenti su uglavnom evropskog i azijskog porekla.

Precizno određivanje preoperativnog stadijuma kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća je važno za izbor pacijenata sa lokalizovanom bolešću koji mogu da se podvrgnu hirurškom lečenju sa ciljem da se tumor radikalno odstrani. U toj preoperativnoj proceni pomaže nam i pozitron-emisiona tomografija (PET) da bi se procenila raširenost bolesti (26). Prema Vodiču dobre kliničke prakse za karcinome pluća iz 2012. g., u Srbiji je za stejdžing nesitnoćelijskog karcinoma pluća u upotrebi 7. edicija TNM klasifikacije, ali je u našoj studiji korišćena 8. edicija koja će biti predstavljena.

TNM klasifikacija služi za procenu karakteristika primarnog tumora (T), regionalnih limfnih čvorova (N) i metastaza (M). Na osnovu TNM klasifikacije radi se staging (engl. stage = faza, stadijum) koji je polazna osnova za određivanje terapije, predviđanje evolucije i prognoze bolesti, kao i praćenje efekata terapije.

1.5.1 Primarni tumor – T deskriptor

T deskriptor prema 8. reviziji TNM stejdžing sistema sastoji se od veličine tumora, invazije tumora i lokacije odvojenog tumora u odnosu na primarni tumor. 8. revizija preciznije

klasifikuje veličinu tumora . Ova promena zasnovana je na prognostičkoj diferencijaciji koja je obrađena na preko 30.000 pacijenata sa dijagnostikovanim nesitnoćelijskim karcinomom pluća. Validacija je potvrdila „cut-off“ vrednost od 3 cm za T1 i T2 tumore. Dalja analiza u vezi sa petogodišnjim preživljavanjem potvrdila je sledeću graničnu vrednost od 5 cm za diferencijaciju između T2 i T3 klase. „Cut-off“ od 7 cm čini razliku između T3 i T4 klase. Uvedene su nove kategorije Tis i T1mi za adenokarcinome, jer je Tis u 7. reviziji korišćena samo za skvamocelularne karcinome in situ. Po 8. klasifikaciji, čisti lepidični adenokarcinomi koji se prezentuju kao „ground-glass“ noduli manji od 3 cm klasifikuju se kao Tis (tumor in situ). Ovakav nodul se smatra za T1 samo ako je veći od 3 cm. T1mi označava minimalno invazivni karcinom.

Tabela 1. TNM stejdžing 8. revizija – T deskriptor

T deskriptor	Karakteristike primarnog tumora	TNM7
TX	Ćelije tumora u sputumu ili uzorku bronhijalne lavaže, ali bez radiološki ili bronhoskopski vidljivog tumora	
T0	Nema znakova tumora	
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>	
T1	Tumor 3 cm ili manji u najvećem dijametru, okružen plućnim tkivom ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopski vidljive invazije proksimalno od lobarnih bronha, lokalizovan van glavnog bronhija	
T1mi	Minimalno invazivan adenokarcinom	*
T1a	Tumor 1 cm ili manji	**
T1b	Tumor veći od 1 cm, ali ne veći od 2 cm u najvećem dijametru	**
T1c	Tumor veći od 2 cm, ali ne veći od 3 cm u najvećem dijametru	*, **
T2	Tumor veći od 3 cm, ali manji od 5 cm, ili tumor koji zahvata glavni na bilo kojoj udaljenosti od karine traheje, ali ne zahvata karinu traheje, zahvata visceralnu pleuru, udružen je sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi na hilarnu regiju i zahvata deo ili cela pluća	**
T2a	tumor veći od 3 cm, ali manji od 4 cm u najvećoj dimenziji	**
T2b	tumor veći od 4 cm, ali manji od 5 cm u najvećoj dimenziji	**
T3	tumor veći od 5 cm ali ne veći od 7 cm ili direktno urastanje (zahvatanje): parijetalne pleure, zida grudnog koša (uključujući i tumor gornjeg sulkusa), freničnog nerva, parijetalnog perikarda; ili odvojeni tumorski nodus(i) u istom režnju kao i primarni tumor	**
T4	Tumor veći od 7 cm ili bilo koje veličine koji zahvata: dijafragmu, medijastinum, srce, velike krvne sudove, traheju, rekurentni nerv, jednjak, kičmene pršljenove i karinu traheje; odvojeni nodusi u različitiom režnju istog pluća kao primarni tumor	**

*Napomene: * uvedena nova klasa; ** promenjen opis klase.*

T kategorija se odnosi i na invaziju tumora u okolne strukture. Invazija glavnih bronhija je redukovana sa T3 na T2, kao i potpuna atelektaza ili pneumonitis. Sa druge strane, invazija dijafragme je unapređena sa T2 na T3 kategoriju. Uključenost medijastinalne pleure više ne spada u T deskriptor (41).

Tabela 1 prikazuje karakteristike T deskriptora 8. TNM revizije, uz napomenu kada se T klasa ili opis klase razlikuju u odnosu na 7. TNM reviziju.

1.5.2 Regionalni limfni čvorovi – N deskriptor

Deskriptor za regionalne limfne čvorove (N deskriptor) nije se promenio u 8. reviziji TNM klasifikacije u odnosu na 7. reviziju. Ovakva odluka doneta je zbog toga što se pokazalo da su prediktori koji utiču na prognozu ostali isti (42). **Tabela 2** prikazuje N deskriptor u 8. reviziji TNM klasifikacije.

Klasifikacija metastatskih nodusa zasnovana je na lokalizaciji limfnih čvorova umesto na broju metastatskih limfnih čvorova koji se često koristi u stejdžingu drugih tumora. Standardni kriterijum za identifikaciju abnormalnih limfnih čvorova i dalje podrazumeva limfne čvorove koji su veći od 1 cm na kratkoj osi CT ili MRI snimka kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća, dok dodatni kriterijumi podrazumevaju nestandardni oblik i unutrašnju nekrozu (41–43).

Infiltracija limfnih čvorova medijstinuma postoji kod otprilike jedne četvrtine novodijagnostikovanih pacijenata sa karcinomom pluća. Procena ovih limfnih čvorova je od suštinskog značaja za stejdžing nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Dostupne neinvazivne tehnike snimanja procenjuju limfne čvorove na osnovu veličine (CT) i metabolizma (PET), a odlikuje ih visoka senzitivnost, ali nedovoljna specifičnost (44,45).

Tabela 2. TNM stejdžing 8. revizija – N deskriptor

N deskriptor	Karakteristike limfnih čvorova
Nx	Regionalne limfne žlezde nisu određivane
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim žlezdama
N1	Metastaze u ipsilateralnim peribronhijalnim i/ili ipsilateralnim hilarnim limfnim žlezdama i intrapulmonalne limfne žlezde uključujući rastom direktno zahvatanje
N2	Metastaze u ipsilateralnim medijastinalnim i/ili subkarinalnim limfnim žlezdama
N3	Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim, kontralateralnim hilarnim, ipsilateralnim ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim žlezdama

CT često ne može da napravi preciznu razliku između benignog uvećanja limfnih čvorova i metastaza, a njegova preciznost u evaluaciji medijastinuma se nije poboljšala u poslednjoj deceniji uprkos poboljšanju rezoluciju.

1.5.3 Udaljene metastaze – M deskriptor

U reviziji M deskriptora rađena je provera M kategorizacije u odnosu na prognozu. Najveća promena uočena je kod ekstratorakalnih metastaza, koje su bile klasifikovane kao M1b u 7. reviziji TNM klasifikacije. Pokazalo se da postoji značajno bolja prognoza kod pacijenata koji imaju jednu metastazu u samo jednom organu u odnosu na one koji imaju više metastatskih lezija u jednom organu ili više metastaza u više organa. Sa druge strane, nisu uočene razlike u odnosu na M1a klasu – sa intratorakalnim metastazama.

Zbog gore pomenutih razlika u prognozi bolesti, 8. revizija TNM klasifikacije deli ekstratorakalne metastaze na M1b klasu, gde se nalaze pacijenti sa jednom metastatskom lezijom u jednom organu, i M1c, gde se nalaze pacijenti sa više ekstratorakalnih metastaza, što utiče na značajno lošiju prognozu (46). **Tabela 3** prikazuje M deskriptor 8. revizije TNM klasifikacije.

Ekstratorakalne metastaze nalaze se kod skoro polovine novo-dijagnostikovanih pacijenata sa karcinomom pluća (47). Nadbubrežne žlezde su jedno od najčešćih mesta metastaza iz karcinoma pluća. U trenutku prezentacije, 5% do 10% pacijenata sa karcinomom pluća ima

metastaze na nadbubrežnoj žlezdi. Metastaze u jetri, mozgu i skeletnom sistemu su takođe česte (48). Ređe se metastaze nalaze u bubrezima, pankreasu i tankom crevu. Serozne i mezenterične metastaze mogu poprilično da porastu i infiltrišu ili čak perforiraju susedne delove creva.

Tabela 3. TNM stejdžing 8. revizija – M deskriptor

N deskriptor	Karakteristike limfnih čvorova
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze
M1a	Odvojeni tumorski nodus(i) u kontralateralnom delu pluća, tumor sa pleuralnim nodusima, maligni pleuralni i perikardni izliv*
M1b	Jedna udaljena, vanplućna metastaza u jednom organu
M1c	Više udaljenih, vanplućnih metastaza u jednom ili više organa

**Najveći broj pleuralnih (perikardnih) izliva kod karcinoma pluća posledica je metastatske bolesti. Međutim, kod nekih izliva ponavljana mikroskopska ispitivanja su negativna na tumor, izliv nije hemoragičan i nije eksudat. U ovakvim okolnostima i uz kliničku odluku da izliv nije uzrokovan tumorom, bolesnici sa izlivom se klasifikuju kao M0.*

Kada postoji sumnja na diseminaciju karcinoma pluća na osnovu kliničkog pregleda (neurološki simptomi, bol u trbuhu ili boku, patološki prelomi ili nenormalni nivo enzima u serumu), potrebna je dopunska dijagnostička obrada koja uključuje uključuje CT ili MRI sa kontrastom PET/CT (49). Kada postoji lezija u nadbubrežnoj žlezdi veća od 3 cm, ista verovatno predstavlja metastatsku promenu i zahteva dalju obradu CT-om, MRI-om ili ponekad perkutanom biopsijom. Najčešće otkrivene lezije jetre su ciste ili hemangiomi a svaka hipodenzna promena je visoko suspektna na meta promenu. Kada je indikovano, vrši se dalja procena pomoću kontrastnog CT, MRI ili perkutane biopsije (45).

Udaljene metastaze predstavljaju svojevrsan dijagnostički izazov, jer se još uvek mogu propustiti zbog ograničenjanja svake pojedinačne tehnike. Kada postoji diseminacija tumora u mozak, MRI je značajno senzitivnija. Intenzivna fiziološka aktivnost mozga na FDG PET se koja je inače prisutna, može predstavljati problem u otkrivanju fokalnih žarišta u sklopu metastaza (50). Iz tog razloga potrebno je koristiti namenske protokole PET-a za obradu

mozga, modifikovanu opremu i produženu ekspoziciju. Još jedna otežavajuća okolnost kod ovog dijagnostičkog modaliteta je i niska senzitivnost (60%), pa se čak i kod značajnih lezija na mozgu mogu videti lažno negativni nalazi (51).

FDG PET je koristan u otkrivanju sekundarnih depozita lokalizovanih u trbuhu, a posebno na nadbubrežnoj žlezdi gde je odlikuje i visoka specifičnost u otkrivanju adrenalnih metastaza karcinoma pluća (52). Iako su podaci trenutno ograničeni, pokazalo se da FDG PET može otkriti metastatsku bolest jetre sa tačnošću od 92% do 100%, kao i da ima specifičnost, senzitivnost i tačnost veće od 90% pri evaluaciji koštanih metastaza (52).

1.5.4 Određivanje stadijuma nesitnoćelijskih karcinoma pluća

Nova klasifikacija se bazira na većem broju i detaljnijoj analizi različitih deskriptora, čijom se preciznijom analizom omogućava tačniji stejdžing i prognoziranje. Nova TNM klasifikacija takođe naglašava značaj multidisciplinarnih sastanaka kao standarda prakse u sveobuhvatnoj proceni stanja pacijenata i stejdžingu tumora (27).

Između sedmog i osmog izdanja je primećeno poboljšano preživljavanje prema odgovarajućim stadijumima (*Tabela 4*), ali se mora napomenuti da revizija klasifikacije sama po sebi ne nalaže određeno postupanje, pa promene u ustaljenom načinu lečenja treba da se zasnivaju na široj slici koja uključuje kliničku evaluaciju i dopunske dijagnostičke procedure.

Tabela 4. Stadijumi ne-sitnoćelijskog tumora pluća prema 8. reviziji TNM klasifikacije

Stadijum	T deskriptor	N deskriptor	M deskriptor
Okultni karcinom	Tx	N0	M0
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum IA	T1	N0	M0
Stadijum IA1	T1mi	N0	M0
	T1a	N0	M0
Stadijum IA2	T1b	N0	M0
Stadijum IA3	T1c	N0	M0
Stadijum IB	T2a	N0	M0
Stadijum IIA	T2b	N0	M0
Stadijum IIB	T1a-c, T2a, T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadijum IIIB	T1a-c, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadijum IIIB	T1a-c, T2a, T2b	N3	M0
	T3, T4	N2	M0
Stadijum IIIC	T3, T4	N3	M0
Stadijum IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1
Stadijum IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a, M1b
Stadijum IVB	Bilokoji T	Bilo kojiN	M1c

Evaluacija rezultata dopunskih dijagnostičkih ispitivanja podrazumeva prilagođavanje dosadašnjih parametara ali i uključivanje novih koji zahtevaju dodatno razmatranje.

Najvažnija ostaje tačnost o veličini tumora, posebno kada tumor nije solidna lezija, jer svaki centimetar vodi većem T stadijumu. M stadijum je dobio značaj koji mu pripada, važno je kvantifikovati broj ekstratorakalnih metastaza. Očekuje se da će novi stejdžing sistem uticati na ishode lečenja pacijenata sa karcinomom pluća, a za lekare je važno je da budu u toku sa

novim kriterijumima kako bi svojim pacijentima pružili najadekvatnije lečenje. Na osnovu ovih izmena, koriguju se indikacije za operacije (kako pacijenti ne bi izgubili potrebnu operaciju, ali i kako bi izbegli nepotrebnu, čime se izbegavaju perioperativne komplikacije). Takođe, na osnovu korekcija M stadijuma, pacijenti sa multiplim sekundarnim depozitima, neće više biti izjednačeni sa onima koji imaju solitarne metastaze (sa posledičnim značajnim razlikama u prognozi i modalitetu lečenja metastaza) (47).

1.6 Lečenje karcinoma pluća

1.6.1 Opšti principi-modaliteti terapije

Terapija nesitnoćelijskog karcinoma pluća zavisi od vrste karcinoma pluća i od stadijuma bolesti. Preporuke i vodiči vrlo precizno definišu korake u lečenju i modalitete koji se primenjuju (29).

Hirurško lečenje se uglavnom vezuje za I i II stadijum bolesti. Kod ovih pacijenata je bolest ograničena u plućima i hirurgija se može sprovoditi kao jedini modalitet ili u sklopu multimodalnog pristupa lečenja. Novije preporuke, bazirane na 8. izdanju TNM klasifikacije, ne isključuju hirurško lečenje ni kod pacijenata u III i IV stadijumu, ali samo u određenim grupama pacijenata i to: kod značajnog broja pacijenata u IIIA stadijumu bolesti, ali i kod pojedinačnih slučajevi u stadijumima IIIB i IV. Radikalno hirurško lečenje se odnosi na resekciju obolelog dela pluća kojim postizemo negativnu rubnu resekciju parenhima i /ili bronha i uklanjanje pripadajućih bronhopulmonalnih i medijastinalnih limfnih čvorova i maksimalnu poštedu zdravog pluća. Hirurško lečenje može biti klasičnim hirurškim pristupom i VATS-om (minimalno invazivna hirurgija) .

Standardne resekcije pluća su:

1. Lobektomija - u praksi najčešća primenjena operacija (60-68%). Prva je uradjena 1932.god i uradio ju je Harrold Brunn. Osim standardne postoje i proširene-bilobektomije a i poštedne takozvane sleeve lobektomije. Komplikacije se javljaju u 38%-40% (53)

2. Pneumonektomija je operacija karcinoma pluća koju su 1933. godine Graham i Singer obavili u jednom aktu. Indikovana je kod centralnih tumora kao i kod tumora koji obuhvataju interlobarne incizure sa uvećanim limfnim čvorovima hilusa i medijastinuma. 20-30% je prisutna u hirurškom radu. Perioperativni mortalitet je 4%. Petogodišnje preživljavanje je 45% (54)

Može biti proširena:

-pleuropneumonektomija kojom se odstranjuje ipsilateralna pleura, pluća sa pripadajućim delom perikarda i dijafragme i na taj način se leče mezoteliomi pleure.

-intraperikardna pneumonektomija se primenjuje kod centralno postavljenih tumora koji ekstraperikardijalno infiltrišu elemente hilusa tako da je potrebno njihovo intraperikardijalno zbrinjavanje.

-karinealna ili sleeve pneumonektomija kojom se odstranjuje donji deo traheje, centralne karine i glavnog bronha sa istostranim plućem. Dalje se pravi traheobronhijalna anastomoza preostalog pluća.

3. Resekcije manjeg obima-klinasta resekcija ili segmentektomija. Klinasta resekcija predstavlja operaciju kojom se uklanja tumor do u zdravo sa okolnim plućnim parenhimom i primenjuje se kod malih lezija koje moramo dijagnostikovati a na terenu ograničene plućne funkcije ($FEV_1 < 800\text{ml}$, $FEV_1/FVC < 50\%$, $MVV < 35-40\%$) i kada postoje komorbiditeti koji limitiraju opseg resekcije. Pod segmentnom resekcijom podrazumeva se ekcizija jednog ili više segmenata plućnog reznja. Primenjuje se iz istih razloga kao i klinasta resekcija. Postoperativne komplikacije se javljaju u 33,3%

4. Standardne resekcije koje su gore navedene proširene en block resekcijom zida grudnog koša leve pretkomore, dijafragme, perikarda, leve pretkomore.

VATS danas potpuno opravdano zauzima sve više prostora u svakodnevnom hirurškom radu.

Tabela 5 prikazuje uporedni prikaz karakteristika tradicionalne otvorene (torakotomije) i VATS minimalno invazivne operacije.

Prednosti VATS u odnosu na otvorenu hirurgiju:

- Manje bolova nakon operacije;
- Bolji kvalitet života;
- Adekvatniji imuni odgovor;
- Veća šansa za potpuno normalno disanje nakon operacije;
- Skraćenje operacije.

Tabela 5. Uporedni prikaz karakteristika tradicionalne otvorene (torakotomije) i VATS minimalno invazivne operacije.

Torakotomija	VATS (minimalno invazivna)
--------------	----------------------------

(Tradicionalna otvorena hirurgija)		
Bol	Bol na mestu incizije može se prolongirati i nekoliko nedeja nakon operacije	Obično je značajno slabijeg intenziteta, ako se uopšte i pojavi.
Dužina incizije	One large incision 10-15 cm	Jedna glavna incizija 4-6 cm (obično 4.5 cm); više dopunskih incizija (dužine od 2-4 cm)
Anestezija	Opšta	
Ostajanje u bolnici	6-7 dana	3-4 dana

Hemioterapija se primenjuje pre operacije (neoadjuvantna) sa ciljem da se smanji tumor ili uvećane limfne žlezde i da se bolest prevede u niži stadijum bolesti da bi se nakon toga pacijent radikalno operisao. Istraživanja su pokazala da upotreba adjuvantne hemioterapije kod kompletno resecciranog nesitnoćelijskog karcinoma pluća poboljšava preživljavanje (29). Njom se leče pacijenti dobrog opšteg stanja (performans status 0-2).

Radioterapija može biti samostalan vid lečenja, može da se primenjuje u kombinaciji sa ostalim modalitetima lečenja (hirurgija i/ili hemoterapija) ili da se sprovodi palijativno. Radioterapija može biti spolja (transkutana) i unutrašnja (brahiterapija). Druga se koristi kada tumor opstruira velike disajne puteve. Palijativno se koristi kod postojanja hemoptizija, sindroma gornje šuplje vene ili opstrukcije velikih disajnih puteva. Može se aplicirati i preoperativno kod pacijenata sa Pancoast tumorom (superior sulcus tumor) koji raste u plućnom vrhu i u blizini brahijalnog pleksusa i destruiše pripadajuća rebra a prodire ka vratnim i gornjim grudnim pršljenovima sa čestim zahvatanjem simpatikusa. Radiohirurgija ili stereotaksična radioterapija a predstavlja intenzivan zračni tretman koji ima za cilj da iz više uglova zrači zonu karcinoma, čime se u ciljno područje izlučuje najveći deo doze, dok se štedi okolno vitalno i funkcionalno tkivo. Stereotaksično zračenje se obično izvodi u jednom ili u nekoliko tretmana. Radiohirurgija može biti opcija za osobe sa malim karcinomom pluća koji nisu dostupni za hirurgiju ili bi zbog nepovoljne lokalizacija operacija bila rizična. Takođe se može koristiti za tretman udaljenih metastaza, a posebno metastaza u mozgu.

Primena radio i hemioterapije može biti istovetna (konkurentna) ili sekvencijalna kada se posle primene citostatika nastavlja lečenje zračenjem.

Molekularna (ciljana) terapija se razvila zahvaljujući istraživanju molekularnih osnova i procesa karcinogeneze. Danas se koriste dve vrste lekova koje su dale značajne rezultate u odmaklom karcinomu pluća:

-prvi su inhibitori tirozin - kinaze receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR).

-drugi su monoklonska antitela i to protiv vaskularnog endotelijalnog faktora rasta /VEGF/ i protiv epidermalnog faktora rasta.

Imunoterapija je nov pristup u lečenju malignoma pluća a zasniva se na sposobnosti odbrambenog sistema organizma da detektuje i uništi tumorske ćelije. Uglavnom se koristi u odmaklim fazama bolesti (III i IV klinički stadijum) kao modalitet lečenja nesitnoćelijskog karcinoma.

Multimodalni pristup predstavlja osnovni terapijski princip i uključuje hirurgiju, hemioterapiju, radioterapiju, ciljanu(molekularnu)terapiju i imunoterapiju

1.7 Genetska osnova karcinoma pluća

Ogroman rad uložen je u poslednjih nekoliko decenija na istraživanju molekularnih i genetskih aspekata karcinoma pluća. Molekularna osnova karcinoma pluća je kompleksna i heterogena. Stalni napredak u razumevanju molekularnih promena na više različitih nivoa (genetski, epigenetski i ekspresija proteina), i njihov funkcionalni značaj može imati uticaja na dijagnozu, lečenje i prognozu karcinoma pluća (55). Karcinom uopšteno nastaje usled promena u molekulu DNK, što dovodi do nekontrolisane ćelijske proliferacije. Najveći broj oštećenja podrazumeva promene u aktuelnim sekvencama DNK molekula tj mutacije. One mogu biti posledica slučajnih grešaka tokom replikacije, izloženosti karcinogenima, ili neefikasnim mehanizmima popravke DNK.

Karcinom pluća nastaje kao rezultat akumulacije genetskih i epigenetskih promena koje dovode do transformacije fenotipa ćelije, a posledica je aktivacije protoonkogeni i inhibicije tumor supresor gena (55). Geni odgovorni za promociju normalnog rasta ćelija nazivaju se protoonkogeni. Procesi koji dovode do aktivacije ovih gena, i njihove transformacije u onkogene su: point mutacije, DNK amplifikacija i hromozomske preraspodele. Geni koji normalno sprečavaju rast zovu se tumor-supresor geni. Gubitak njihove funkcije dovodi do neregulisanog ćelijskog rasta. Treća familija gena uključena u patogenezu su geni za

reparaciju DNK. Kada mehanizmi reparacije ne funkcionišu pravilno, bilo zbog nasleđene ili stečene mutacije, stopa nagomilavanja mutacija raste sa svakom novom deobom ćelije.

Razumevanje biohemijskih procesa uključenih u patogenezu karcinoma pluća je ključno za razvoj terapijskih strategija koje mogu ciljano delovati na postojeće izmene na molekularnom nivou i aktivirane mehanizme, i time predstavljati osnovu za primenu personalizovane medicine (55).

Specifične molekularne promene koje pokreću rast tumora, samim tim predstavljaju potencijalno mesto delovanja leka, najbolje se identifikovane kod adenokarcinoma. Danas postoji porast interesovanja i za identifikovanje molekularnih promena i kod skvamocelularnog karcinoma i time potencijalno mesto delovanja terapije.

U slučaju karcinoma pluća, kao i kod bilo kog drugog malignom oboljenja, tumorogeneza je posledica aktivacije faktora stimulacije rasta (npr. v-Kiras 2 Kirsten sarkom virusa onkogeno-KRAS, receptor epidermalnog faktora rasta-EGFR, BRAF, MEK-1, HER2, MET, ALK i RET), kao i inaktivacije tumor supresor gena (npr., P53, PTEN, LKB-1) (55).

Mutacije onkogeno identifikovane su kod preko 50% adenokarcinoma (56,57). Signalni putevi koji su kontrolisani onkogenima ili tumor supresor genima često su međusobno povezani sa signalnim putevima uključenim u karcinogenezu. Postoji velika genetska raznolikost u karcinomu pluća, broj prisutnih mutacija je značajno veći u poređenju sa ostalim tumorima (1). Njihovi genomi su veoma kompleksni. Na osnovu 31 studije o sekvencioniranju genoma NSCLC, identifikovane su nove 727 mutacije gena koje nisu prethodno prijavljene u literature ili COSMIC bazi (58).

Genetske studije su potvrdile prethodno dobro poznate mutacije u karcinomu pluća kao što su KRAS, EGFR, BRAF, takođe su identifikovane nove mutacije koje se ređe javljaju (6-8), uključujući ciljane mutacije JAK2, ERBB4 (59), RET (60,61), receptor faktora rasta fibroblasta1 (FGFR1) (62) i DDR2 (63). Ove studije pružaju sveobuhvatan pogled na genetske mutacije kod karcinoma pluća, izazov ostaje prepoznavanje biološki značajnih mutacija koje se često javljaju i koje treba razlikovati od većeg broja prolaznih mutacija. Relativni nedostatak mutacija koje se sa visokom učestalošću javljaju u karcinomu pluća, ukazuju na veliku heterogenost i složenost molekularnih mehanizama. Signalni putevi su pod uticajem različitih genetskih promena koje predstavljaju izazov za primenu personalizovane terapije.

1.7.1 KRAS

Familija RAS gena (KRAS, HRAS I NRAS) kodira G protein koji ima ulogu u transdukciji ćelijskog signala koji reguliše diferencijaciju, proliferaciju i preživljavanju ćelije (64). RAS geni mogu biti aktivirani putem tačkastih mutacija na kodonima 12,13 ili 61 menjajući tako strukturu produkta gena. Mutacije su nađene kod oko 25-40% pacijenata sa ADC (56,57,65–67), dok su HRAS I NRAS veoma retke. Mutacije KRAS onkogeno češće su zapadnoj populaciji nego kod azijata (68–71), i češće se javljaju kod muškaraca i pušača (67,71,72). Prema podacima iz studija ADC koji se javio kod nepušača uočena je pojava KRAS mutacije između 0-15% (72–74).

KRAS mutacije su veoma retke ili odsutne u slučaju SCC ili SCLS (66,69,70,72,75). KRAS mutacije se ne javljaju udružene sa EGFR mutacijama (56,67,70,71), ali ponekad mogu biti istovremeno prisutne (72). Meta analize su pokazale da su tumori sa KRAS mutacijama rezistentni na EGFR tirozin kinaza inhibitore (76). Zapravo KRAS dovode do aktivacije mehanizma koji dovode do smanjenja broja EGF receptora (77).

Visoka učestalost pojave KRAS mutacija kod karcinoma pluća predstavlja idealno ciljano mesto za dejstvo leka.

1.7.2 Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR – epidermal growth factor receptor) pripada ErbB familiji tirozin kinaznih receptora, i deo je četvoročlane grupe koju čine EGFR, ErbB-2 (HER2), ErbB-3 i ErbB-4. Njihovo formiranje homo i heterodimera utiče na mogućnost vezivanja različitih liganada koji im omogućavaju da aktiviraju receptore i pokrenu nishodne puteve signalizacije. Između 50 i 90% pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća ima prekomernu EGFR ekspresiju ili aberantnu aktivaciju ovog nishodnog puta. EGFR mutacije se češće viđaju kod pacijenata sa adenokarcinomom kao histološkim tipom karcinoma pluća, kod žena, nepušača, i pacijenata azijske etničke pripadnosti.

Mutacije EGFR uključene su u patogenezu mnogih tumora uključujući i NSCLC. EGFR kodira transmembransku tirozin kinazu (78). EGFR je uključen u regulaciji više onkogenetskih funkcija kao što su proliferacija, diferencijacija i preživljavanje ćelija, neovaskularizacija, invazije i pojave metastaze (79,80).

Mutacije EGFR dovode do aktivacije tirozin kinaze (80,81) i onkogene transformacije epitelijalnih ćelija pluća in vitro (80). Prema podacima iz studija mutacije EGFR prisutne su kod 10-15% pacijenata zapadne hemisfere (56,70) i kod 30-40% azijata (75,82,83). U slučaju NSCLC EGFR mutacija se dešava na prva četiri egzona intracelularnog tirozin kinase domena, najčešće delecija egzon 19 (oko 45%), postoji preko 20 varijanti, od kojih je najčeća delE746-A750. Ređe se javljaju mutacije koje uključuju duplikaciju ili inserciju na egzonu 20 (5-10%), postoje više varijanti, i često su udružene se rezistencijom na EGFR TKIs (71)(84). U slučaju karcinoma pluća skoro sve mutacije EGFR dešavaju se kod ADC (75,85,86), mada se mogu uočiti i kod adenoskvamoznih karcinoma. Češće se javljaju kod žena, mlađih ljudi i nepušača (67,70,71,75,85). EGFR mutacija se retko može javiti i kod SCC (74,87). Kliničke studije ciljanim lekovima dale su razočaravajuće rezultate.

1.7.2.1 FGFR1

Amplifikacija gena uočena je i kod SCC u određenom broju gena uključujući SOX, PDGFRA (62) I FGFR1 (55,88). FGFR1 je membranski receptor za tirozin kinazu koji učestvuje u regulaciji proliferacije. Kod oko 10% pacijenata sa SCC uočeno je amplifikacija FGFR ali se može javiti I kod pacijenata sa ADC (88,89).

1.7.3 BRAF

BRAF kodira serin/treonin protein kinazu koji je efektorni protein KRAS i aktivira MPAK transdukciju signala uključenu u regulaciju proliferacije i preživljavanja ćelije (90). BRAF mutacije su česte kod melanoma, zapaženo je da se javljaju kod 3% pts sa NSCLC (72,90–92). Mogu da se jave kod pušača i bivših pušača , ali se najčešće javljau kod žena nepušača (91).BRAF mutacije imaju značajno mesto u ciljanoj terapiji melanoma, ali postoje ograničeni podaci u primeni u terapiji NSCLC (92).

1.7.4 MET

Protoonkogen MET nalazi se na hromozomu 7q21-q31 i kodira membranski tirozin kinazu receptor koji je takođe poznat kao receptor faktora rasta hepatocita (93). Kod NSCLC mutacija MET je posledica amplifikacije (94–97). Amplifikacija MET je poznati mehanizam

sekundarne pojave EGFR-TKI rezistencije (90,94,95,98). Uticaji MET uočene su kod oko 3-5% ADC (67).

1.7.5 HER2

Gen receptora epidermalnog faktora rasta2 (HER2/ERBB2) kodira membranski vezujući receptor tirozin kinazu koji pripada porodici ERBB receptora zajedno sa EGFR. Mutacije su prisutne 1,6-4% NSCLC.

1.7.6 PI3K/AKT/mTOR

The PI3K/AKT/mTOR je značajni transdukcioni signalni put uključen u regulaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije (99). Izmene u ovom putu uočene su kod NSCLC i kod SCLC (100,101). Do aktivacije dolazi putem aktivacije različitih tirozin kinaznih receptora uključujući EGFR, HER2, insulin sličan faktor rasta, endotelijalni faktor rasta (102). Deregulacija ovog puta uočena je kod mnogih tumora, uključujući 50-70% NSCLC (67), uočena je kod 47% SCC.

1.7.7 ALK

Mutacije ALK uočene su otprilike kod 4% NSCLC (103), mada su neke studije ukazivale na nešto nižu prevalencu (56,104). Češće se javljaju kod mlađih pacijenata sa ADC koji nisu nikad bili pušači ili su povremeno konzumirali duvan (105,106). Retko se javljaju udružene sa EGFR ili KRAS mutacijama (56,104,106,107). Istovremeno prisustvo rearanžmana ALK i EGFR mutacije razlog je rezistencije na TKI (105,108–110).

1.7.8 ROS

ROS je protoonkogen lociran na hromozomu 6q22 koji kodira transmembranski tirozin kinaza receptor koji pokazuje veliku slučnost sa ALK. Mutacije ROS1 češće se javljaju kod mlađih ljudi koji su nepušači, i koji nisu Azijati, slično ALK (111).

1.7.9 RET

RET je lokalizovan na hromozomu 10q11.2 i kodira tirozin kinazni receptor. Mutacije RET od ranije je poznato da imaju ulogu u nastanku papilarnog i modularnog karcinoma štitaste

žlezde (112). Aktivacija RET je posledica mutacije i ona je uočena kod malog broja pacijenata sa NSCLC (60,61). Slično ALK i ROS1 rearanžmanima, mutacije RET se takođe najčešće javljaju kod ADC koji nisu nikad bili pušači (60,61).

1.7.10 DDR

Mutacije DDR onkogena uočene su kod otprilike 3,8% pacijenata sa SCC. DDR kodira membranski receptor tirozin kinazu koja je uključena u ćelijskoj proliferaciji i preživljavanju.

1.7.11 Tumor supresor geni

Tumor supresor geni su geni koji normalno sprečavaju rast. Gubitak funkcije ovih gena značajan je mehanizam u karcinogenezi i zahteva inaktivaciju oba alela (113). U slučaju karcinoma pluća tumor supresor geni koji su često bivaju inaktivirani su TP53, retinoblastoma 1 (RB1), serintreonin kinaza 11 (STK 11), CDKN2A, FHIT, RASSF1 I PTEN (55,67,114).

1.7.11.1 p53

TP53 nalazi se na hromozomu 17p13 i kodira nuklearni fosfoprotein koji identifikuje i vezuje oštećenu DNK. TP 53 omogućava reparaciju DNK ili dovodi do apoptoze ćelija sa značajnim oštećenjem DNK. Do inaktivacije gena dovode tačkaste mutacije ili delecije. Inaktivacija TP53 jedna od najznačajnijih genetskih anomalija u karcinomu pluća, uočena je kod 90% pacijenata sa SCLC i u oko 65% pacijenata sa NSCLC (115). Češća je kod pacijenata sa SCC (81%) nego kod pacijenata ADC(46,8%) (109).

1.7.11.2 PTEN

Mutacija PTEN uočena je kod oko 5 % sa NSCLC (116), češća je kod SCC nego kod ADC (10.2% naspram 1.7%) I povezana je s prethodnom istorijom pušenja (55).

1.8 Epigenetske promene u karcinomu pluća

Iako pušenje predstavlja vodeći faktor rizika za karcinom pluća, naučnici su već decenijama zainteresovani da činjenicu da će „samo“ 10% pušača na kraju oboleti od ove bolesti (117). Adenokarcinom, na primer, predstavlja najčešći karcinom pluća kod nepušača (118). Karcinogeneza je očigledno kompleksan proces koji se ne može objasniti samo jednim faktorom rizika, pa čak ni sa nekoliko faktora rizika. Ovaj proces pokreće takozvana akumulacija genetskih i epigenetskih promena koje su odgovorne za deregulaciju onkogeno, tumor-supresorskih gena i mehanizama popravke DNK. Zbog toga je verovatnoća da kod jedne osobe dođe do odgovarajuće kombinacije ovih patoloških promena zavisna od individualnih izloženosti, genotipa i fenotipa.

Epigenetska varijabilnost uključuje DNK metilaciju, modifikaciju histona i ekspresiju nekodirajućih RNK, a ovi elementi fenotipske varijabilnosti utiču na kapacitet popravke DNK, imunski odgovor, metaboličke puteve ksenobiotika individue, pa samim tim i rizik od nastanka maligniteta. Zbog toga je razumevanje epigenetike karcinoma pluća neophodno za potpuno shvatanje patogeneze ove bolesti. U odnosu na genetske modifikacije i njihov uticaj na karcinogenezu, epigenetske modifikacije su češće kod karcinoma pluća (119). Jedna od najranijih tačaka uticaja na nastanak karcinoma pluća predstavlja inaktivacija tumor-supresorskih gena. Mehanizam ovog procesa zasnovan je na metilaciji, tj. hipermetilaciji promotera tumor supresorskih gena (120). Istraživanja su pokazala da je upravo metilacija promotera tumor-supresorskih gena, zajedno sa ukupnim brojem hipermetiliranih gena odgovorna za intenziviranu progresiju od obične hiperplazije do adenokarcinoma (121,122).

Najčešće proučavani geni koji se pominju u kontekstu promoterske metilacije u karcinomima pluća jesu p16INK4a, APC, RAR β , CDH13, FHIZ, MGMT i CDH1. Čak u učestalost njihove metilacije i mutacije varira od karcinoma do karcinoma. Gen p14arf se relativno retko inaktivira u nesitnoćelijskom karcinomu pluća, dok se metilacija, mutacija ili delecija gena p16INK4a nalazi u čak 60% pacijenata, ali se promena ovog gena uočava u tek 10% slučajeva sitnoćelijskog karcinoma pluća (123,124).

Ni metilacija svih gena koji mogu učestvovati u patogenezi karcinoma pluća ne dešava se u isto vreme. CDKN2A gen i njegova hipermetilacija pominju se rano u genezi karcinoma pluća, i on je identifikovan kao prekancerozna lezija (125). Hipermetilacija drugih gena, kao što su hDAB2IP, H-Cadherin, FBN2 i DAL-1 najčešće se pominju u kasnim stadijumima nesitnoćelijskog karcinoma pluća (126–128). Iako se neke epigenetske promene vezuju za

gene u kasnim stadijumima karcinoma pluća, neophodno je uzeti u obzir njihov potencijalni značaj u omogućavanju karcinomu da napreduje u kasnom stadijumu, da utiče na imunski sistem domaćina, loše reaguje na terapiju, ili da daje lokalne i udaljene metastaze. Takođe, pojava određenih epigenetskih promena i njihova povezanost sa vremenom (stadijumom) mora biti analizirana u kontekstu određenog tipa/podtipa karcinoma pluća, jer su karcinomi pluća heterogeno oboljenje i svaki tumor je na svoj način jedinstven.

Zanimljivo je pomenuti da su određene epigenetske promene specifične za pušački status, tj. javljaju se samo u plućima pušača, dok se određene modifikacije viđaju kod nepušača. Kod pušača, metilacija promotera gena uočena je na genima APC, RASSF1A, FHIT i CCND2, a kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća je i učestalost metilacije promotera gena p16INK4a, MTHFR, MGMT veća kod pušača u odnosu na nepušače (129–132). S druge strane, metilacija TNFRSF10C, BHLHB5 i BOLL gena češća je kod nepušača.

U ranim fazama karcinoma pluća najčešće uočavamo metilaciju, kao epigenetski mehanizam, koja je vezana za određene gene. Međutim, metilacija, ili njen nedostatak, uočen je i na mnogo širem nivou – na nivou celog genoma. Nasuprot hipermetilaciji gena, hipometilacija genoma, gubitak metilacije na nivou genoma, uočava se kasno tokom karcinogeneze, barem kada je adenokarcinom u pitanju (118). Ni u ovom slučaju ne postoji jedno pravilo koje se može primeniti na sve tipove karcinoma pluća. Određeni autori ukazali su na hipometilaciju kod prelaska normalnog tkiva u karcinom kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća (133).

Još jedan značajan epigenetski mehanizam jeste metilacija histona. Histonska dezacetilaza pokazuje povećanu ekspresiju kod karcinoma pluća, a ova dezacetilaza katališe uklanjanje acetil grupa histonskog repa, što kao rezultat da je inaktivno heterohromatinsko stanje (134,135). Kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća deo histonske dezacetilaze (SIN3A) je hipoekspresiran (utišan) (136).

Promena ekspresije mikroRNK se često ja kod karcinoma pluća. Najčešće pominjane jesu miR-196a i miR-200b čija je ekspresija povećana kod karcinoma pluća, sa prosečnim uvećanjem od 23 i 37 puta, redom (137). Najčešće se pominje njihova uloga kao tumor supresorskih gena ili onkogeni u patogenezi karcinoma pluća. Za bolje razumevanje procesa nastanka ali i lečenja karcinoma pluća neophodno je proučiti lezije različitog stepena displazije i genetske mehanizme koji se nalaze u pozadini ovog procesa.

Mnogo se manje zna o dugačkim nekodirajućim RNK, čija se uloga povezuje sa regulacijom proteina i organizacijom njihove strukture, ali imaju ulogu i u ekspresiji gena.

1.9 Duge nekodirajuće RNK

Napredak u tehnologiji doveo do otkrivanja velikog broja novih transkripata koje je sada moguće identifikovati panelima visoke rezolucije (high-resolution microarray) i tehnologijama sekvenciranja celog genoma (138,139). Uočena je i nova klasa dugih nekodirajućih RNK molekula (long non-coding RNA – lncRNA), najčešće dužine od 200 bp (baznih parova) do 100 kbp. Pretpostavlja se da je uloga duge nekodirajuće RNK značajna u različitim oblastima biologije i medicine, počevši od embriogeneze, razvoja ćelija, kao i tkiva (100,101,140–142). Promene u ekspresiji duge nekodirajuće RNK povezana je, pored velikog broja drugih bolesti, i sa malignim tumorima, i identifikovano je nekoliko desetina dugih nekodirajućih RNK koje utiču na razvoj i progresiju malignih tumora, čime je ova grupa molekula dobila potencijalan značaj u terapiji ove bolesti (143–145).

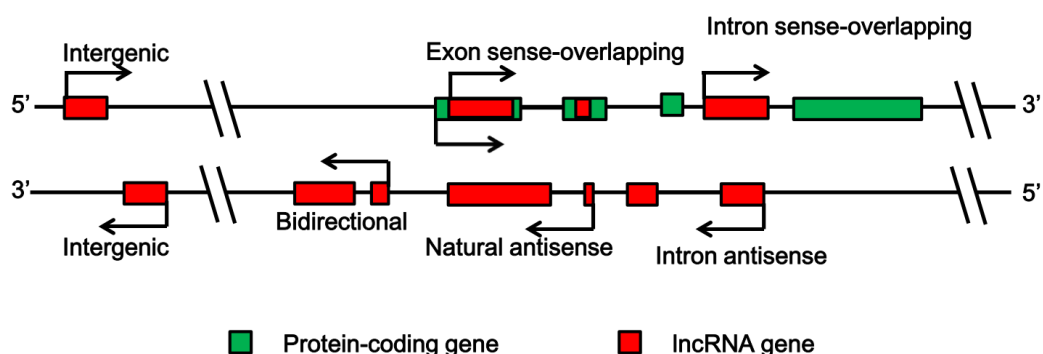
Dugačke nekodirajuće RNK dele se najčešće u 6 širokih kategorija (146):

Intergenske;

Bidirekzione;

1. Preklapajuće intronske;
2. Preklapajuće egzonske;
3. Antisens intronske;
4. Prirodne antisens.

Slika 18. prikazuje tipove dugih nekodirajućih RNK.



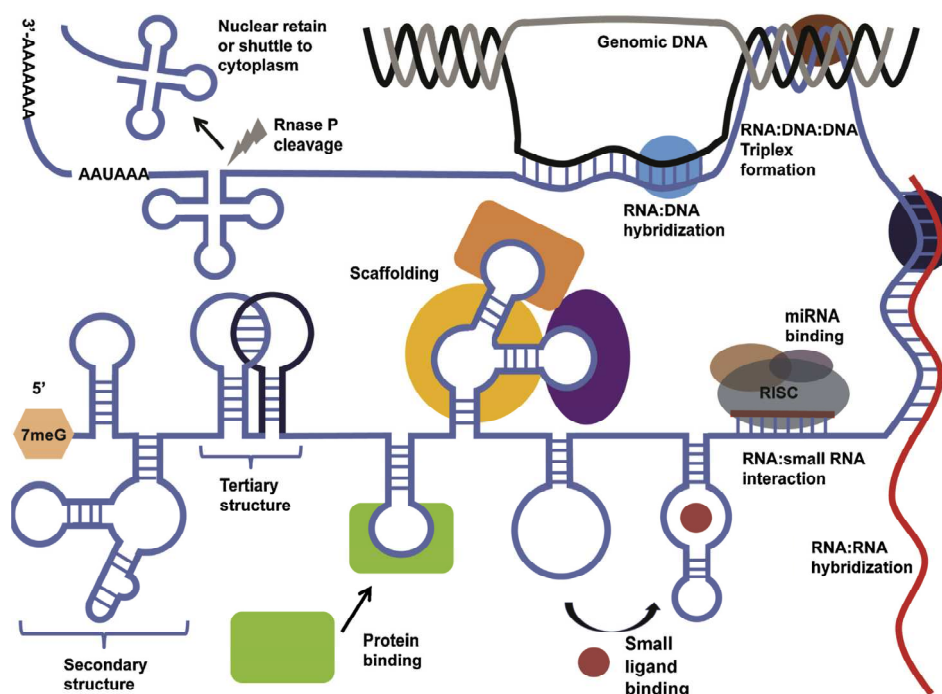
Slika 18. Tipovi dugih nekodirajućih RNK

(izvor: Wei et al, 2016)

1.9.1 Karakteristike i uloga duge nekodirajuće RNK

Duge nekodirajuće RNK imaju različite biološke uloge, počevši od epigenetske regulacije, kontrole ciklusa ćelijske smrti, transkripcije i regulacije transkripcije, razvoja ćelije i diferencijacije, pa sve do starenja ćelija i organizma u celini. **Slika 19.** prikazuje različite uloge i puteve aktivnosti duge nekodirajuće RNK. Nekodirajuće RNK uglavnom transkribuje RNK polimeraza II, da bi se, posle modifikacija kao što su dodavanje 5' kape, splajsovanja i poliadenilacije, savile u sekundarnu ili tercijsku strukturu (147). Sekundarne strukture sadrže određeni broj nesparenih regiona, te veći broj sekundarnih struktura može da formira tercijsku strukturu. Na osnovu trenutnog znanja, aktivnost nekodirajućih RNK zasniva se na strukturama višeg nivoa koje one formiraju (148).

Neupareni delovi viših struktura nekodirajuće RNK služe kao mesta za vezivanje različitih proteinskih faktora i mogu dovesti do formiranja kompleksa, ili, određeni delovi nekodirajuće RNK mogu služiti kao mesta za vezivanje malih molekula koji će kasnije dovesti do promena u strukturi ovog molekula. Neupareni delovi nekodirajuće RNK takođe mogu reagovati sa drugim RNK i DNK molekulima, gde, u zavisnosti od komplementarnosti, mogu regulisati aktivnost malih RNK, ili formirati duplekse ili triplekse sa mRNA i DNK (149).



Slika 19. Uloge i putevi delovanja dugih nekodirajućih RNK

(izvor: Li i Chen, 2013)

Tabela 6. prikazuje identifikovane nekodirajuće RNK i tumore sa kojima su povezani (150).

Najčešće se u literaturi pominju četiri grupe nekodirajućih RNK:

1. Dugačke intergenske nekodirajuće RNK;
2. Prirodni antisens transkripti;
3. Transkribovani ultrakonzervativni regioni;
4. Pseudogeni.

Li i Chen (2013) prikazali su detaljno tipove nekodirajućih RNK kao i specifične RNK za koje se veruje da imaju pro-kancerski efekat, s obzirom da je njihov nivo ekspresije ili aktivnost povećana u kancerskim ćelijama. Ovi autori ipak skreću pažnju na značaj tumor supresorskih nekodirajućih RNK kod malignih tumora, a kao primer navode lincRNA-p21, MEG3, i GAS5 (150).

1.9.2 Duge nekodirajuće RNK povezane sa karcinomom pluća

Do sada je identifikovano preko 30 dugih nekodirajućih RNK koje su na neki način povezane sa karcinomom pluća. Najveći broj promovise proliferaciju ćelija, njihov rast, migraciju i invaziju (npr. CAR10, MALAT1, HOTAIR). Određene duge nekodirajuće RNK utiču i na oblik ćelija, ili imaju veze sa metastazama (npr. RGMBAS1, NKX2-AS1), a pojedine su povezane sa regulacijom apoptoze ili zaštitom od oksidativnog stresa (npr. SCAL1, SPRY4-IT1). **Tabele 7. i 8.** prikazuje do sada identifikovane duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija povećana kod karcinoma pluća i njihove pretpostavljene uloge u ovoj bolesti.

Tabela 9. prikazuje do sada identifikovane duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija smanjena kod karcinoma pluća.

Tabela 6. Identifikovane nekodirajuće RNK i njihova povezanost sa različitim tumorima* (1)

Tip nekodirajuće RNK	Naziv	Tipovi tumora
	MALAT1	Hepatocelularni karcinom, kolorektalni karcinom, karcinom bešike, karcinom pluća
	HULC	Hepatocelularni karcinom
Dugačka intergenska nekodirajuća RNK	H19	Karcinom grlića materice, karcinom želuca, karcinom bešike, karcinom dojke, karcinom ezofagusa, karcinom pluća
	PCGEMI	Karcinom prostate
	HOTAIR	Karcinom dojke, hepatocelularni karcinom, karcinom pankreasa, karcinom želuca, karcinom larinksa, nazofaringealni karcinom
	aHIF	Nepapilarni clear-cell karcinom bubrega, karcinom dojke, paragangliom
	ZEB2-NAT	Nepoznato
Prirodni antisens transkript	ANRIL	Karcinom prostate, akutna limfoblastna leukemija, gliom, melanom
	BOKAS	Lejomijsarkom

*Prilagođeno prema Li i Chen (2013)

Tabela 6. Identifikovane nekodirajuće RNK i njihova povezanost sa različitim tumorima* (2)

Tip nekodirajuće RNK	Naziv	Tipovi tumora
Transkribovan ultrakonzervativan region	TUC338	Hepatocelularni karcinom
	uc.73	Kolorektalni karcinom
	uc.388	Kolorektalni karcinom
	uc.460	Neuroblastom
Pseudogen	t-uc.300a	Neuroblastom
	CXADR-Ψ	Karcinom prostate
	ATP8A2-Ψ	Luminalni karcinom dojke
	Oct4-pg	Karcinom dojke, gliom, leukemija
	PTENP1	Kolorektalni karcinom

*Prilagođeno prema Li i Chen (2013)

Tabela 7. Duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija povećana kod karcinoma pluća* (1)

Duga nekodirajuća RNK	Ekspresija	Ključni faktori	Funkcije
<i>CAR10</i>	Povećana	YB-1	Promoviše proliferaciju ćelija
<i>MALAT1</i>	Povećana	SR, PC2, hnRNP C	Promoviše proliferaciju ćelija, migraciju i invaziju
<i>HOTAIR</i>	Povećana	PRC2, LSD1	Promoviše proliferaciju ćelija, invaziju i metastaze
<i>H19</i>	Povećana	miR-675, c-MYC, p53	Suprimira apoptozu Promoviše rast ćelija
<i>RGMBAS1</i>	Povećana	RGMB	Promoviše metastaze ćelija
<i>PVT1</i>	Povećana		Promoviše ćelijsku proliferaciju, migraciju i invaziju
<i>GHSROS</i>	Povećana		Promoviše ćelijsku migraciju
<i>NKX2-AS1</i>	Povećana	EZH2, UTX	Promoviše rast ćelija Reguliše oblik ćelija
<i>BCYRN1</i>	Povećana	c-MYC	Promoviše ćelijsku pokretljivost, migraciju i invaziju
<i>DLX6-AS1</i>	Povećana	DLX6	Karcinogeneza
<i>AFAP1-AS1</i>	Povećana	Actin filament integrity	Promoviše metastaze kancerskih ćelija
<i>SOX2-OT</i>	Povećana	PRC2	Promoviše ćelijsku proliferaciju
<i>CARLo-5</i>	Povećana		Promoviše proliferaciju ćelija, invaziju i metastaze
<i>Lnc_bc060912</i>	Povećana	PARP1, NPM1	Suprimira apoptozu ćelija

* Prilagođeno prema Wei i Zhou, 2016

Tabela 8. Duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija povećana kod karcinoma pluća* (2)

Duga nekodirajućaRNK	Ekspresija	Ključni faktori	Funkcije
MVIH	Povećana		Promoviše ćelijsku proliferaciju i invaziju
HNF1A-AS1	Povećana	DNMT1	Promoviše proliferaciju tumora i metastaze
CCAT2	Povećana		Promoviše proliferaciju ćelija i invaziju
LUADT1	Povećana	SUZ12, p27, LUAD	Reguliše ćelijski ciklus
ZXF1	Povećana		Promoviše invaziju ćelija i metastaze
ANRIL	Povećana	PRC2	Povezana sa TNM stadijumom i veličinom tumora
SCAL1	Povećana	Nrf-2	Medijator zaštite od oksidativnog stresa
NRG1	Povećana		Karcinogeneza
DQ786227	Povećana		Medijator zaštite od oksidativnog stresa
LOC728228	Povećana		Medijator zaštite od oksidativnog stresa

* Prilagođeno prema Wei i Zhou, 2016

Tabela 9. Duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija smanjena kod karcinoma pluća

Duga nekodirajuća RNK	Ekspresija	Ključni faktori	Funkcije
<i>GAS5</i>	Smanjena	p53, E2F1, miR-21	Indukuje apoptozu Rezistencija na lekove
<i>GAS6-AS1</i>	Smanjena		Suprimira metastaze
<i>PANDAR</i>	Smanjena	p53, NF-YA, Bcl-2	Blokira proliferaciju ćelija
<i>HMlincRNA717</i>	Smanjena		Povezana sa metastazama u limfnim čvorovima
<i>MEG3</i>	Smanjena	P53	Suprimira proliferaciju ćelija Indukuje apoptozu
<i>TUG1</i>	Smanjena	P53, PRC2	Suprimira proliferaciju ćelija
<i>SPRY4-IT1</i>	Smanjena	PRC2	Indukuje apoptozu Suprimira proliferaciju ćelija
<i>BANCR</i>	Smanjena		Suprimira proliferaciju ćelija Indukuje apoptozu
<i>AK126698</i>	Smanjena	Wnt pathway	Medijator rezistencije na cisplatinu

* Prilagođeno iz Wei i Zhou, 2016

1.10 GAS5 i karcinom pluća

Tokom otkrivanja različitih faktora koji mogu da učestvuju u nastanku i razvoju karcinoma uvek je vladalo mišljenje da kodirajuće RNK, odgovorne za kodiranje određenih proteina, imaju veći značaj od nekodirajućih RNK. U moru otkrivenih dugih nekodirajućih RNK, GAS5 (engl. growth arrest-specific transcript 5) predstavlja jednu od najčešće pominjanih i istraživanih u grupi tumor-supresivnih dugih nekodirajućih RNK.

GAS5 dobila je svoje ime po tome što je otkrivena/identifikovana u cDNK biblioteci a njena uloga je tada povezana sa rastom ćelija sisara. Naime, ekspresija GAS5 se povećavala pri zaustavljanju rasta ćelija sisara (151). Kao njena pozicija, identifikovan je 1q25 lokus na hromozomu 1, a sastoji se iz 12 egzona čiji rezultat mogu biti dve duge nekodirajuće RNK – GAS5a i GAS5b. Broj GAS5 transkripata raste kada dođe do prestanka rasta ćelije, što se u eksperimentalnim sistemima postiže „izgladnjivanjem“ ili tretmanom rapamicinom (152–154).

Translaciju GAS5 kontroliše mTOR put, a klasifikovana je kao 5'-oligopiramidin RNK (152,155). Naučnici su pokušali da objasne ulogu GAS5 u kontroli rasta ćelije i došli do zaključka, na eksperimentima sa T ćelijskim linijama, da povećana ekspresija GAS5 dovodi do apoptoze i smanjenog broja ćelija u S fazi, a blokiranje („utišavanje“) GAS5 dovodi do obrnutih rezultata (155,156). Zbog samog značaja karcinoma u oboljevanju, kao i visokog mortaliteta od karcinoma, istraživanja su usmerena ka otkrivanju funkcionalnih uloga GAS5 u bolestima ove vrste. Prvo su pronašli, što je bilo i očekivano imajući u vidu nekontrolisani rast tumora, da je ekspresija GAS5 smanjena kod pacijenata sa solidnim tumorima. Ekspresija GAS5 bila je u značajnoj negativnoj korelaciji sa veličinom tumora, stadijumom bolesti, i prognozom pacijenta (157–159). Kada je u pitanju karcinom dojke, GAS5 je povezan sa kontrolom apoptoze i njegova ekspresija je smanjena u ovoj bolesti (160). Kada je u pitanju tumor želuca, smanjena ekspresija GAS5 povezana je sa povećanom proliferacijom ćelija i lošom prognozom (159). Polimorfizam duge nekodirajuće RNK GAS5 povezan je sa rizikom od hepatocelularnog karcinoma (161). GAS5 je čak povezan sa pojavom metastaza i prognozom kod kolorektalnog karcinoma (162).

Povezanost GAS5 i karcinoma dojke je jedna od prvih povezanosti koja je istraživana i dokazana. Pre 10 godina naučnici su dokazali da je broj transkripata GAS5 kod karcinoma dojke značajno smanjen u poređenju sa normalnim tkivom dojke, kao i da povećanje ekspresije GAS5 može da

dovede do zaustavljanja rasta i apoptoze u ćelijama ljudskog karcinoma dojke. Niski nivoi ekspresije GAS5 povezani su i sa lošijim ishodom kod pacijenata sa karcinomom pluća, što je ukazalo da GAS5 može imati ulogu i u supresiji rasta tumora (160). Kada je u pitanju interakcija sa terapijom, ovakve studije su podvukle ulogu GAS5-nezavisnih lekova kao što je imatinib ili kombinovane terapije (tradicionalna hemoterapija i dvostruki PI3K/mTOR inhibitor) koja bi mogla da poboljša odgovor ćelije i povрати normalnu ekspresiju GAS5 – stimulišući apoptozu u karcinomu.

Terapija karcinoma prostate uglavnom se bazira na uskraćivanju/blokiranju androgenih hormona, što ima za cilj inhibiciju rasta ćelija i uvođenje u apoptozu. Nažalost, posle određenog vremena karcinom prostate nastavlja da se razvija kao androgen nezavisni karcinom, te su novi pristupi terapiji neophodni. Funkcionalne studije pokazale su da GAS5 može da promoviše apoptozu u ćelijama karcinoma prostate, a pronađena je i pozitivna korelacija između ekspresije GAS5 na ćelijskom nivou i raširenosti ćelijske smrti (163). Na osnovu ovih istraživanja postavljena je hipoteza da bi kombinacija povećanja ekspresije ćelijskog GAS5 i tradicionalne hemoterapije mogla značajno da unapredi lečenje karcinoma prostate. Nažalost, kasnija istraživanja pokazala su da je interakcija između GAS5, mTOR, tradicionalne hemoterapije i karcinoma prostate dosta kompleksnija i dalja unapređenja ovog pristupa su neophodna (164).

Od otkrića GAS5 i prvih istraživanja u vezi sa njenom povezanošću sa karcinomom dojke, veliki broj istraživanja pokušao je da pronađe i objasni vezu između ove duge nekodirajuće RNK i drugih tumora. **Tabela 10** prikazuje ulogu GAS5 u različitim karcinomima.

Istraživanja u vezi sa ekspresijom i biološkom funkcijom GAS5 u karcinomu pluća takođe su pokazala interesantne rezultate. Slično prethodnim zaključcima, ekspresija GAS5 bila je smanjena u tumorskom tkivu i povezana sa lošijim kliničkim i patohistološkim karakteristikama pacijenta i tumora. U ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća GAS5 predstavlja nezamenljiv faktor koji utiče na prestanak rasta i apoptozu. Još jednu zanimljivost predstavlja eksperiment sa demetilirajućim agensom 5-aza-2-deoxy-cytidine čija je upotreba pokazala da je upravo epigenetska modifikacija povezana sa transkripcionom inaktivacijom GAS5 (158). Još jedan značajan faktor pominje se u vezi između GAS5 i karcinoma pluća. Inhibitori tirozin kinaze receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) smatraju se za prvu liniju lečenja nesitnoćelijskog karcinoma pluća u kasnom stadijumu kod pacijenata koji imaju mutaciju ovog receptora – što

dovodi do dužeg preživljavanja u ovoj grupi pacijenata. GAS5 je izabran kao ciljna duga nekodirajuća RNK koja bi mogla da bude povezana sa rezistencijom na inhibitore EGFR tirozin kinaze (165). In vitro istraživanja pokazala su da bi povećanje ekspresije GAS5 moglo da prevaziđe ovu rezistenciju.

Veća ekspresija GAS5 uočena je i u krvi pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća, u odnosu na zdravu populaciju (151,158). U svojoj visokocitiranoj studiji, Liang et al (2016) pokazali su da je nivo GAS5 u plazmi pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća statistički značajno niži u odnosu na kontrole. Takođe, ekspresija GAS5 značajno je bila niža kod pacijenata u III i IV stadijumu bolesti u odnosu na I i II stadijum. U istraživanju ovih autora, nivo GAS5 dao je prilično dobre rezultate i u diskriminaciji između pacijenata i kontrola, kao i između pacijenata u različitim stadijumima bolesti, što je podvuklo ulogu GAS5 kao dijagnostičkog biomarkera, sa boljim karakteristikama od CEA (151).

Značaj nesitnoćelijskog karcinoma pluća u obolevanju i mortalitetu muškaraca i žena širom sveta, kao i problemi u vezi sa ranim otkrivanjem ovog karcinoma, adekvatnim stejdžingom koji utiče na terapiju i prognozu bolesti, zahtevaju detaljnija ispitivanja duge nekodirajuće RNK GAS5 i njene uloge u ovom karcinomu. Imajući u vidu broj novoobolelih svake godine u celom svetu, postoji ogromna potreba za novim metodama prevencije, skrininga i ranog otkrivanja karcinoma pluća (18).

Tabela 10. Uloga GAS5 u različitim karcinomima (prilagođeno iz Ma et. al 2005).

Tip tumora	Niska ekspresija GAS5	Mehanizam regulacije
Karcinom dojke	Lošija prognoza, povećana proliferacija ćelija, onemogućena apoptoza	Deluje kao ribopresor glukokortikoidnih receptora
Karcinom prostate	Onemogućena apoptoza, onemogućena inhibitorna uloga mTOR, povećala proliferacija	Sprečava stvaranja kompleksa androgen/androgenski receptor za ciljane DNK
Karcinom pluća	Viši TNM stadijum, veći tumor, lošija diferencijacija, povećana proliferacija, smanjena apoptoza	Putevi povezani i nepovezani sa p53
Mezoteliom pleure	Smanjena dužina ćelijskog ciklusa, povećani odgovor glukokortikoidnih gena	Deluje kao „mamac“ za glukokortikoidni receptor
Karcinom renalnih ćelija	Povećana proliferacija, smanjena apoptoza, promocija stvaranja metastaza	/
Karcinom pankreasa	Povećana proliferacija, smanjena apoptoza	Delimično preko negativne regulacije CDK6 ekspresije
Karcinom bešike	Povećana proliferacija	Delimično preko negativne regulacije CDK6 ekspresije
Karcinom želuca	Veći tumor, viši stadijum bolesti, povećana proliferacija	Delimično preko vezivanja za YBX1 i regulacije ekspresije p21
Kolorektalni karcinom	Veći tumor, niži histološki gradus, viši TNM stadijum, lošija prognoza	/
Karcinom jetre	Veći tumor, metastaze u limfnim čvorovima, viši klinički stadijum, lošija prognoza	/
Karcinom cerviksa	Viši stadijum, vaskularna invazija i metastaze u limfnim čvorovima, povećana proliferacija i metastaze	/

2 Ciljevi istraživanja

- 1) Ispitati postojanje razlike u nivou ekspresije duge nekodirajuće RNK GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća u odnosu na zdravu populaciju.
- 2) Ispitati postojanje razlike u nivou ekspresije duge nekodirajuće RNK GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća zavisno od zavisno od podtipa nesitnoćelijskog karcinoma pluća.
- 3) Ispitati postojanje razlike u nivou duge ekspresije nekodirajuće RNK GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća zavisno od stadijuma bolesti.

3 Metodologija istraživanja

Istraživanje je sprovedeno kao kliničko-laboratorijska studija preseka u okviru koje su ispitanici podeljeni na eksperimentalnu i kontrolnu grupu. Klinički deo istraživanja je sproveden u Klinici za onkologiju Kliničko-bolničkog centra „Bežanijska kosa“ u periodu između novembra 2017. godine i februara 2018. godine. Laboratorijski deo istraživanja sproveden je u u periodu između marta 2018. godine i maja 2018. godine u laboratoriji za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu. Studija je sprovedena u skladu sa načelima Helsinške deklaracije, a svi učesnici su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji. Odobrena je od strane nadležnog Etičkog komiteta KBC Bežanijske Kose i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

3.1 Klinički deo istraživanja

Svi pacijenti su prošli standardne dijagnostičke procedure pre nego što je rađena bilo kakva intervencija. Pacijenti su nadalje klasifikovani prema podacima koji su se nalazili u konzilijarnim prikazima i odlukama istih. Pacijenti koji su pripadali I i II stadijumu TNM klasifikacije, nakon operativnog lečenja, u slučaju potrebe ponovo su klasifikovani (patoanatomski stejdžing). Pacijenti III i IV kliničkog stadijuma su klasifikovani na osnovu konzilijarnih prikaza koji su uključivali primenjenu dijagnostiku i ph verifikaciju tumora (klinički stejdžing). Kod pacijenata III i IV stadijuma bolesti analizirano je i prisustvo EGFR mutacija. Uključeni su samo novo dijagnostikovani pacijenti, to jest pacijenti koji nisu primali nikakvu onkolosku terapiju. Svim pacijentima je uzet uzorak venske krvi u količini od 15 ml i u roku od 2h uzorak je transportovan u frižideru do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde ja dalje obrađivan. Uzorak krvi je uzet pre bilo kakve intervencije.

3.2 Laboratorijske deo istraživanja

3.2.1 Priprema plazme

Za svakog pacijenta i zdravu kontrolu uzorci krvi su prikupljeni u epruvete od 9 ml sa EDTA (antikoagulantne epruvete) koje su čuvane na 4°C dok nisu transportovane do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Plazma je odvajana u roku od 4 sada od

uzimanja uzorka korišćenjem protokola za centrifugiranje u dve faze. **Tabela 11.** prikazuje korake u pripremi uzoraka.

Tabela 11. Protokol za pripremu uzoraka

Koraci u pripremi uzoraka
Centrifugiranje uzorka 10 min/1900 rcf/+4°C
Prebacivanje uzoraka na led i odvajanje plazme
Plazma alikvotirana po 1,5 ml u manje tube
Centrifugiranje 10 min/16 000 rcf/+4°C kako bi se uklonile preostale ćelije
Pažljivo odvajanje supernatanta i alikvotiranje po 500 µl u nove tube
Uzorci plazme čuvani u zamrzivaču na -80°C do izolacije RNK

3.2.2 Izolacija RNK iz plazme

Za izolaciju RNK iz plazme pacijenata korišćen je miRNeasz Serum/Plasma Kit (Qiagen, Nemačka) primenom modifikovanog protokola. Zapremina početnog materijala povećana je na 500 µl u skladu sa preporukama Ekstracelularnog RNK Konzorcijuma za komunikaciju Nacionalnih instituta za zdravlje u Sjedinjenim Američkim Državama (166). Konačni odnos zapremina između plazme, Qiazol LR i hloroforma je držan konstantno 1:5:1, a dodatni koraci ispiranja urađeni su korišćenjem RPE pufera i 80% etanola. Na kraju, dupla elucija je urađena korišćenjem 30 µl RNase-FREE vode. Konačna količina izolovane RNK bila je 200-750 ng na 500 µl plazme. **Tabela 12** prikazuje korake u izolaciji RNK.

Tabela 12. Protokol za izolaciju RNK (1)

Koraci u izolaciji RNK (1)

Uzorci u potpunosti otopljeni na sobnoj temperaturi

Na 500 µl plazme dodati 2,5 ml QIAzol i vorteksovati 5 – 10 sekundi

Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta dodato 500 µl hloroforma

Uzorci snažno mučkani 15 sekundi i inkubirani na sobnoj temperaturi 3 minuta

Uzorak centrifugiran 20 min/4500 rcf/+4°C

Gornja, vodena faza, prebačena u novu tubu i dodato 100% etanola (1,5 volumena u odnosu na volumen vodene faze) i dobro promešano provlačenjem kroz nastavak pipete gore-dole

Celokupan uzorak prebačen na kolonicu koja je prethodno montirana na vakuum maifold (QIAvac 24 Plus, Qiagen, Nemačka)

Uključen vakuum i sačekano dok celokupni uzorak prođe kroz kolonicu

Kolonicu skinuta sa manifolda i stavljena u tubu, a zatim dodato 700 µl RWT pufera

Centrifugirano 30 sec/8000 rcf/+20°C

Eluat odbačen, na kolonicu dodato 500 µl RPE pufera i inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi

Centrifugiranje 1 min/10000 rcf/+20°C

Eluat odbačen i ponovo ponovljen postupak elucije

Na kolonicu dodato 500 µl 80% etanol (napravljen sa „RNase free“ vodom) i inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi

Centrifugirano 2 min/10000 rcf/+20°C

Tabela 12. Protokol za izolaciju RNK (2)

Koraci u izolaciji RNK (2)

Eluat odbačen i ponovljen još jednom postupak pranja etanolom

Kolonica prebačena u novu tubu i prazna kolonica centrifugirana uz otvoren poklopac, 5 min/13000 rcf/+20°C

Eluat odbačen i kolonica ostavljena da se suši na vazduhu

Kolonica prebačena u novu tubu i RNK eluirana u 30 µl „RNase free“ vode

Inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirano 1 min/13000 rcf/+20°C

Eluat vraćen na kolonicu i ponovljen postupak elucije

Koncentracija i čistoća RNK određena merenjem na spektrofotometru

3.2.3 Kvantitativna reverzna transkripcija

Reakcijom reverzne transkripcije (RT), vrši se sinteza komplementarne DNK (cDNK).

Ukupna RNK (400 ng) je reverzno transkribovana u cDNK upotrebom RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). **Tabela 13** prikazuje protokol za reverznu transkripciju.

Tabela 13. Protokol za reverznu transkripciju

Koraci u reverznoj transkripciji

Napravljena smeša totalne RNK izolovane iz plazme i „random-hexamer“ prajmera (100 pmol) u volumenu od 11 µl i inkubirano 5 minuta na 70°C

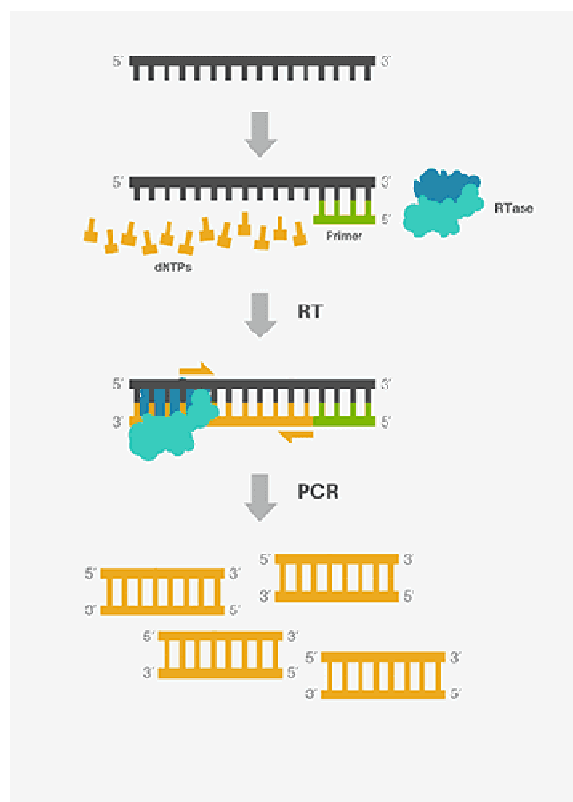
Ohlađeno na ledu (1-2 minuta)

Dodata smeša koja sadži 4 µl 5x RT-puferu, 2 µl dNTP (10 mM) i 40 U Revert-Aid® M-MuLV reverzne transkriptaze (Thermo Scientific)

Smešu finalnog volumena 20 µl, inkubirana 15 min/25°C a zatim 1 h/42°C

Reakcija reverzne transkripcije se zaustavlja inkubacijom na 70°C u trajanju od 10 min

Slika 20. grafički prikazuje proces reverzne transkripcije.



Slika 20. Reverzna transkripcija
(izvor: www.thermofisher.com)

3.2.4 Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije *GAS5* gena primenom „real-time“ PCR (qPCR) metode

Kvantitativni PCR (qPCR) metod omogućava preciznu kvantifikaciju PCR produkata u svakom ciklusu PCR reakcije, odnosno u realnom vremenu. Određuje se ciklus u kome fluorescentni signal poreklom od PCR produkta značajno prevazilazi „bazalni“ nivo koji se detektuje u početnim ciklusima PCR reakcije, tzv. Ct ili „threshold cycle“. Vrednost Ct je direktno proporcionalna količini ciljane PCR sekvence, pa se na osnovu njegove vrednosti može odrediti nivo ekspresije gena od interesa. Relativnu ekspresiju *GAS5* gena kod pacijenata određena je u odnosu na ekspresiju *GAPDH* gena kao endogene kontrole, i primenom komparativne ddCt metode (167). Relativna količina (RQ) *GAS5* gena, normalizovanog u odnosu na endogenu kontrolu i relativna u odnosu na kalibrator je;

$$RQ = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$$ddCt = dCt_{\text{uzorka}} - dCt_{\text{kalibratora}} = (Ct_{GAS5} - Ct_{GAPDH}) - (Ct_{GAS5 \text{ kalibrator}} - Ct_{GAPDH \text{ kalibrator}})$$

Kao kalibrator, u ovoj studiji korišćene su zdrave kontrole, tj. $dCt_{\text{zdrave kontrole (medijana)}}$.

Ekspresija *GAS5* gena je rađena qPCR metodom na 7900 HT real-time PCR aparatu (Applied Biosystems, USA) upetrebom TaqMan® hemije.

PCR reakcija kvantifikacije *GAS5* gena je bila finalnog volumena 10 µl i sadržavala je 1 µl cDNK, 1x TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems), TaqMan® gene Expression Assay za *GAS5* (Hs03464472_m1), odnosno za *GAPDH* (Hs99999905_m1). Sve reakcije su puštane u duplikatu. Termalni profil reakcije bio je: Aktivacija Taq polimeraze na 95°C/10 min, praćena sa 50 ciklusa denaturacije na 95°C/15 sec i anilinga na 60°C/1 min.

3.3 Statistička obrada

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih korišćeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi (n,%)
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, percentili)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike:

- Parametarski (t test, ANOVA)
- Neparametarski (Hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test, Friedman test, Wilcoxon test, Cochran Q test).

Naknadna, međugrupna poređenja rađena su pomoću Tukey (za parametarska) i Bonferroni testa (neparametarska obeležja posmatranja).

Izbor testa za testiranje razlike zavisio je od tipa podataka i raspodele. Parametarski metodi korišćeni su u situaciji gde je raspodela bila normalna, dok su neparametarski korišćeni u situaciji gde raspodela nije normalna. Normalnost raspodele ispitivana je na osnovu deskriptivnih parametara, testova normalnosti raspodele (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilks testa) i grafičkim metodama (histogram, boxplot, QQ plot).

Dijagnostička vrednost testa ispitivana je pomoću Receiver Operating Characteristics (ROC) krive. Cut-off vrednost je određivana pomoću Youden-ovog indeksa i predstavlja tačku u kojoj je najbolji odnos senzitivnosti i specifičnosti. Za ispitivani dijagnostički test određivana je cut-off vrednost, senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednosti.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

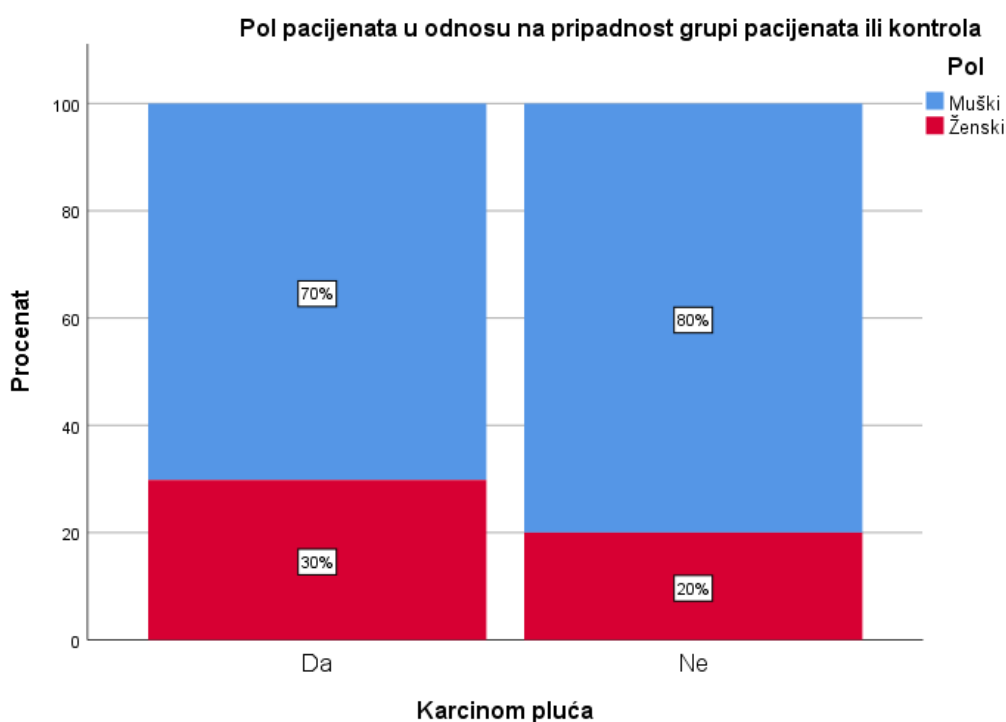
Svi podaci obrađeni su u SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) softverskom paketu i R 3.4.2 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.) (168).

4 Rezultati istraživanja

4.1 Opšte karakteristike uzorka

U studiji je učestvovalo 72 ispitanika, od kojih je 57 imalo potvrđenu dijagnozu karcinoma pluća, dok je 15 bilo u kontrolnoj grupi. Detaljni podaci o učesnicima u studiji prikazani su u *Tabeli 14*.

Najveći broj učesnika obe grupe bio je muškog pola (72%) dok je manji broj učesnika bio ženskog pola (28%). *Slika 21*. prikazuje distribuciju učesnika studije po polu.



Slika 21. Distribucija učesnika u studiji po polu

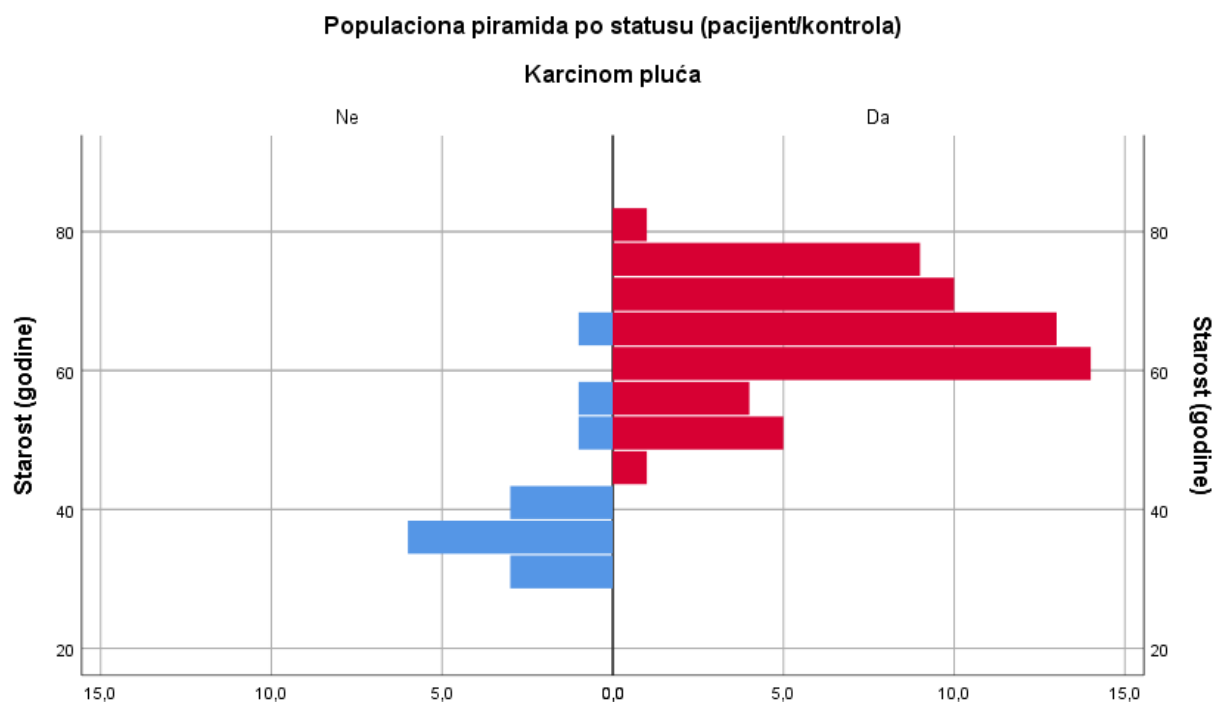
Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji učesnika studije po polu između ove dve grupe.

Tabela 14. Opšte karakteristike učesnika u studiji

	[Svi] N=72	Kontrola N=15	Pacijenti N=57	p
Pol				0,534 ^a
Muški	52 (72,22%)	12 (80,00%)	40 (70,18%)	
Ženski	20 (27,78%)	3 (20,00%)	17 (29,82%)	
Starost (godine)	62,50 (31,00-81,00)	38,00 (31,00-67,00)	65,00 (45,00-81,00)	<0,001 ^b
Pušenje				<0,001 ^a
Da	54 (75,00%)	2 (13,33%)	52 (91,23%)	
Ne	18 (25,00%)	13 (86,67%)	5 (8,77%)	

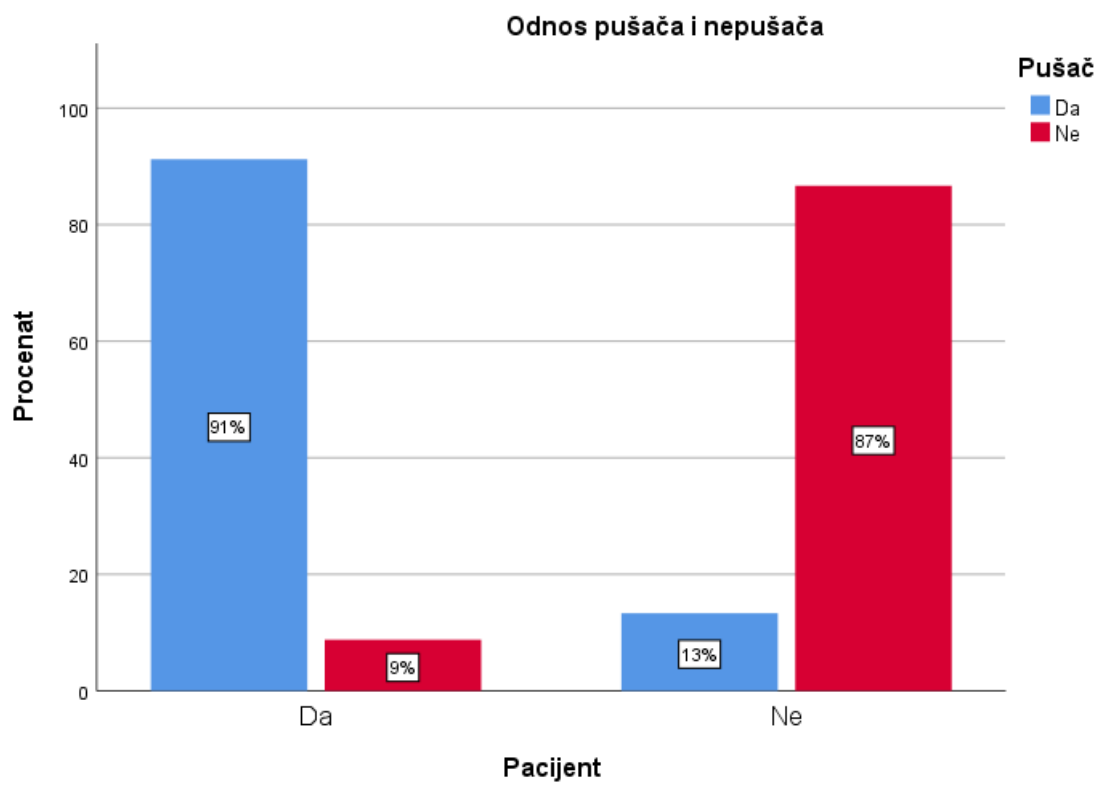
^a Fišerov test tačne verovatnoće; ^b Studentov t test

Starost učesnika u studiji bila je između 31 i 81 godine, sa medijanom za sve učesnike od 62 godine. Pacijenti su bili stariji, sa medijanom od 65 godina, zdravi su imali medijanu od 38 godina. Ova razlika između pacijenata i kontrolne grupe je statistički značajna ($p < 0,001$, Mann-Whitney U test). **Slika 22.** prikazuje populacionu piramidu učesnika, tj. distribuciju učesnika u studiji po godinama starosti, u odnosu na status pacijenta ili kontrole.



Slika 22. Distribucija učesnika u studiji po godinama

Najveći procenat pacijenata (91%) bili su pušači, dok su samo dva učesnika u grupi kontrola bili pušači (13%). I ova razlika između pacijenata i kontrola bila je statistički značajna ($p < 0,001$, Fisher exact test). **Slika 23.** prikazuje odnos pušača i nepušača u studiji.

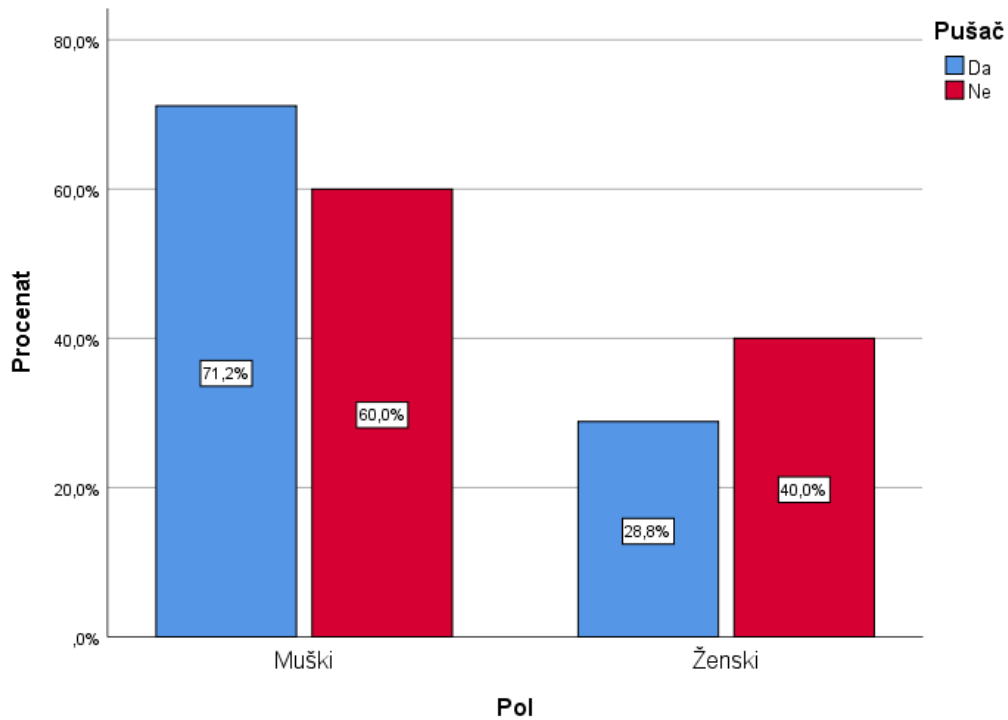


Slika 23. Odnos pušača i nepušača u studiji

4.2 Opšte karakteristike pacijenata

U daljem tekstu analizirane su karakteristike samo grupe pacijenata ukupno i prema polu.

Tabela 15 prikazuje karakteristike pacijenata koji su učestvovali u ovoj studiji ukupno i po polu. U grupi od 57 pacijenata, 40 je bilo muškog, dok je 17 bilo ženskog pola. **Slika 24** prikazuje odnos pušača i nepušača prema polu. Nije bilo statistički značajne razlike između muškaraca i žena u vezi sa pušačkim statusom.

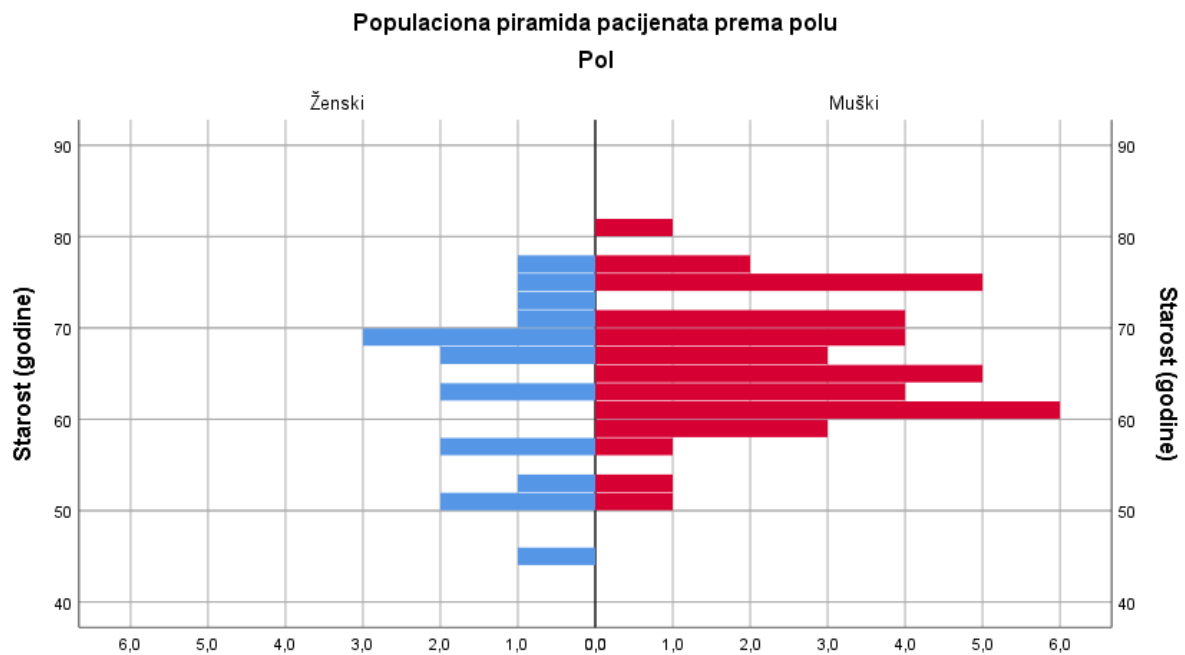


Slika 24. Odnos pušača i nepušača u okviru pacijenata prema polu

Tabela 15. Karakteristike pacijenata ukupno i po polu

	[Svi] N=57	Muški N=40	Ženski N=17	P
Starost (godine)	65,00 (45,00-81,00)	65,00 (50,00-81,00)	66,00 (45,00-77,00)	0,432 ^a
Pušenje				0,629 ^b
Da	52 (91,23%)	37 (92,50%)	15 (88,24%)	
Ne	5 (8,77%)	3 (7,50%)	2 (11,76%)	
Dijametar tumora (mm)	55,00 (19,00-110,00)	46,50 (19,00-110,00)	60,00 (20,00-100,00)	0,160 ^a
Stadijum bolesti				0,403 ^c
I	16 (28,07%)	12 (30,00%)	4 (23,53%)	
II	12 (21,05%)	6 (15,00%)	6 (35,29%)	
III	15 (26,32%)	12 (30,00%)	3 (17,65%)	
IV	14 (24,56%)	10 (25,00%)	4 (23,53%)	
GAS5 ekspresija	0,65 (0,00-3,76)	0,58 (0,02-3,76)	0,97 (0,00-3,19)	0,360 ^a

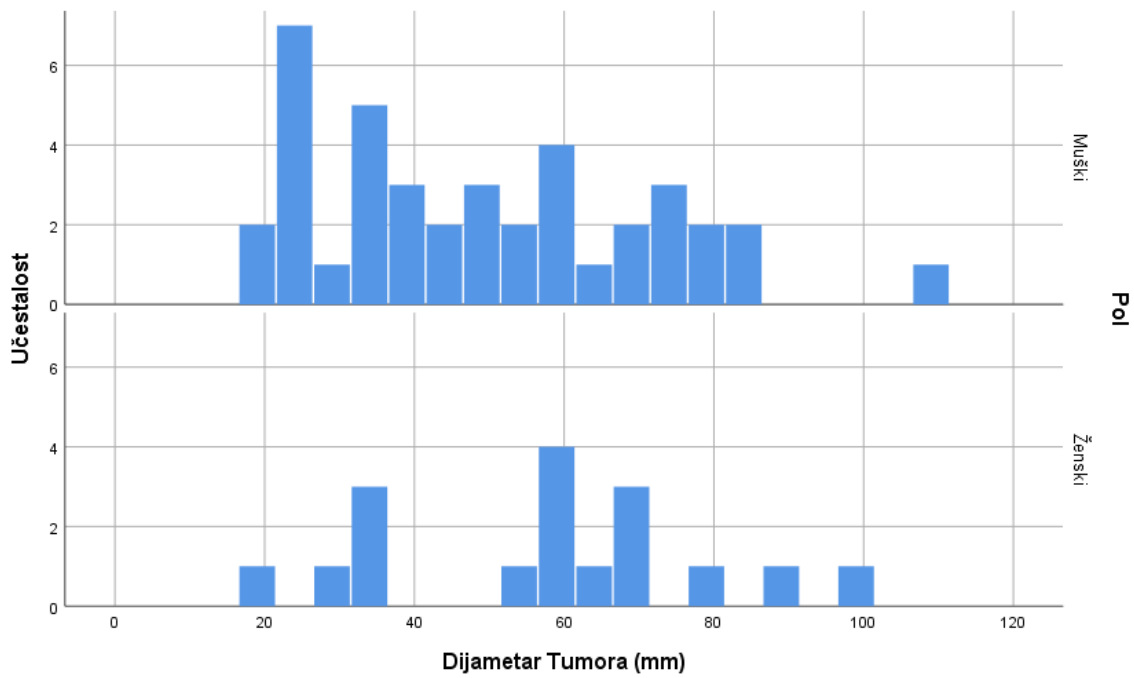
^a Mann-Whitney U test; ^b Fisherov test tačne verovatnoće; ^c χ^2 test



Slika 25. Distribucija starosti pacijenata prema polu

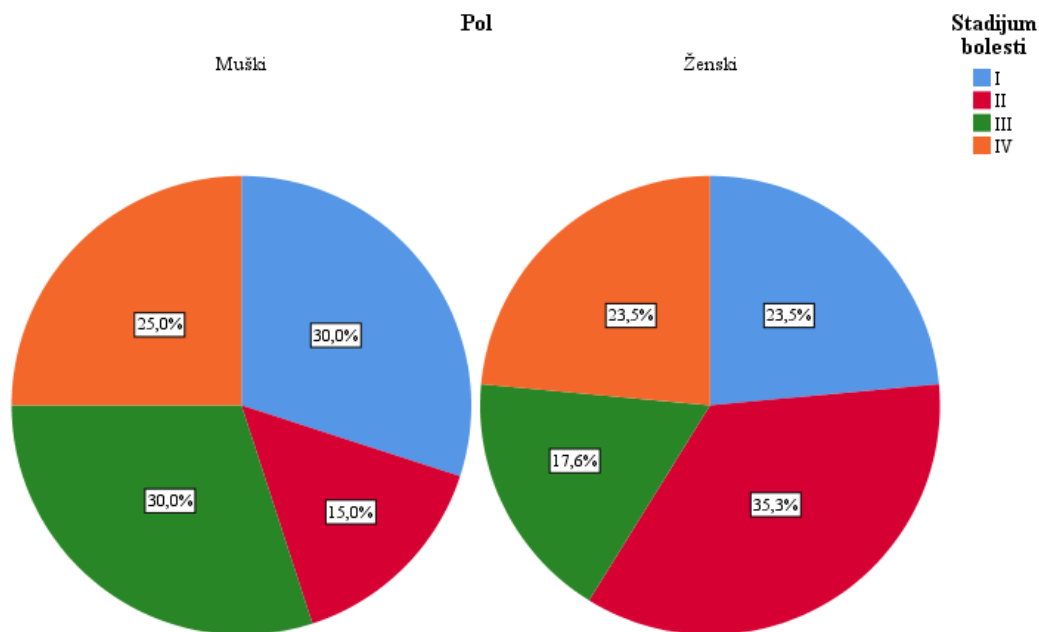
Slika 25 prikazuje starost pacijenata prema polu. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti pacijenata prema polu.

Slika 26 prikazuje učestalost dijametara tumora prema polu. Dijametar tumora imao je medijanu od 55 mm, kod muškaraca je bio nešto manji (46 mm), dok je kod žena bio nešto veći (60 mm). Ova razlika nije bila statistički značajna.



Slika 26. Dijametar tumora prema polu

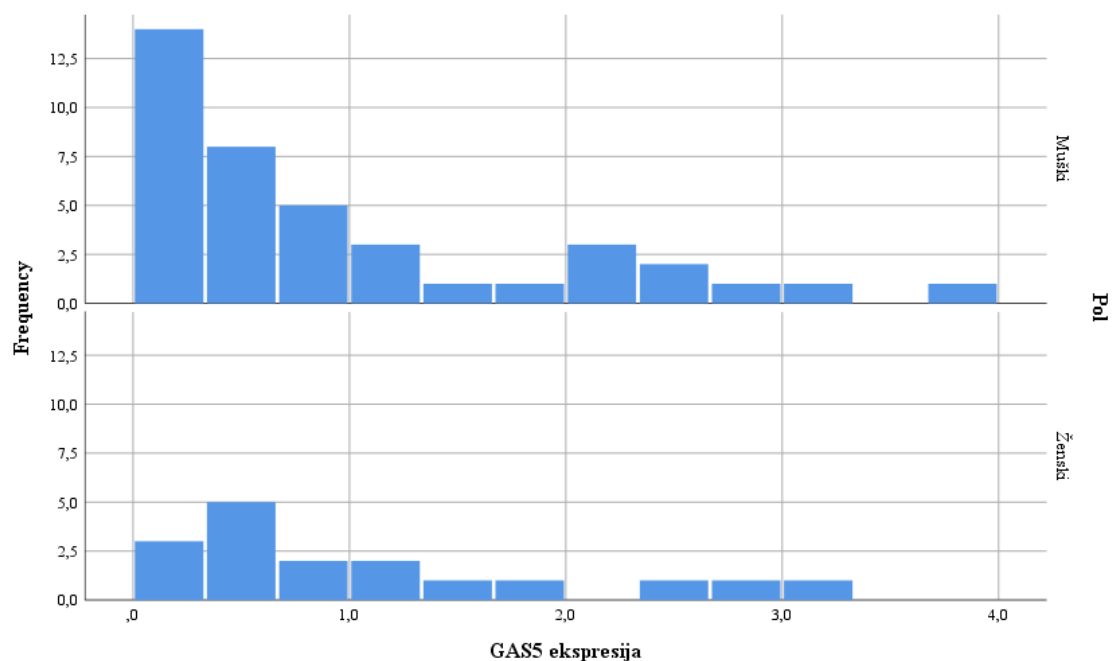
Najveći broj pacijenata imao je dijagnozu adenokarcinoma pluća i skvamocelularnog karcinoma pluća, i u vezi sa histopatološkim nalazom nije bilo statistički značane razlike između muškaraca i žena. Statistički značajne razlike između muškaraca i žena nije bilo ni u vezi sa stadijumom bolesti, s obzirom da je otprilike isti procenat (između 20 i 25%) pacijenata bio u svakom od četiri stadijuma bolesti. **Slika 27** prikazuje stadijum bolesti prema polu pacijenata.



Slika 27. Stadijum bolesti u odnosu na pol

4.2.1 GAS5 ekspresija u odnosu na pol pacijenata

Vrednost ekspresije GAS5 bila je 0.65 ukupno. Kod muškaraca je medijana ekspresije bila 0.58, dok je kod žena bila nešto viša, i to 0.97. Ova razlika između muškaraca i žena nije bila statistički značajna ($p = 0,360$, Mann-Whitney U test) (*Slika 28*).



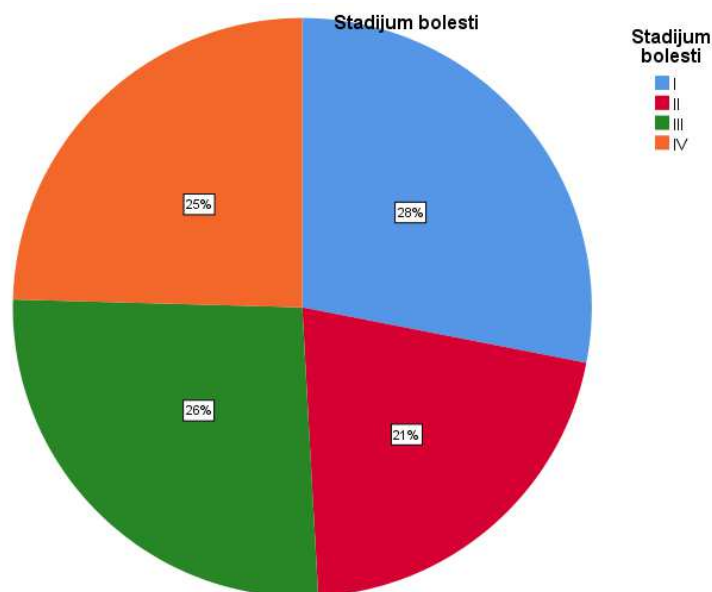
Slika 28. GAS5 ekspresija među pacijentima prema polu

4.3 Stadijum bolesti

Tabela 16 prikazuje karakteristike pacijenata u odnosu na stadijum bolesti.

Najveći broj pacijenata (16) bio je u I stadijumu bolesti, a najmanji broj u drugom stadijumu.

Slika 29 prikazuje distribuciju pacijenata po stadijumima bolesti.



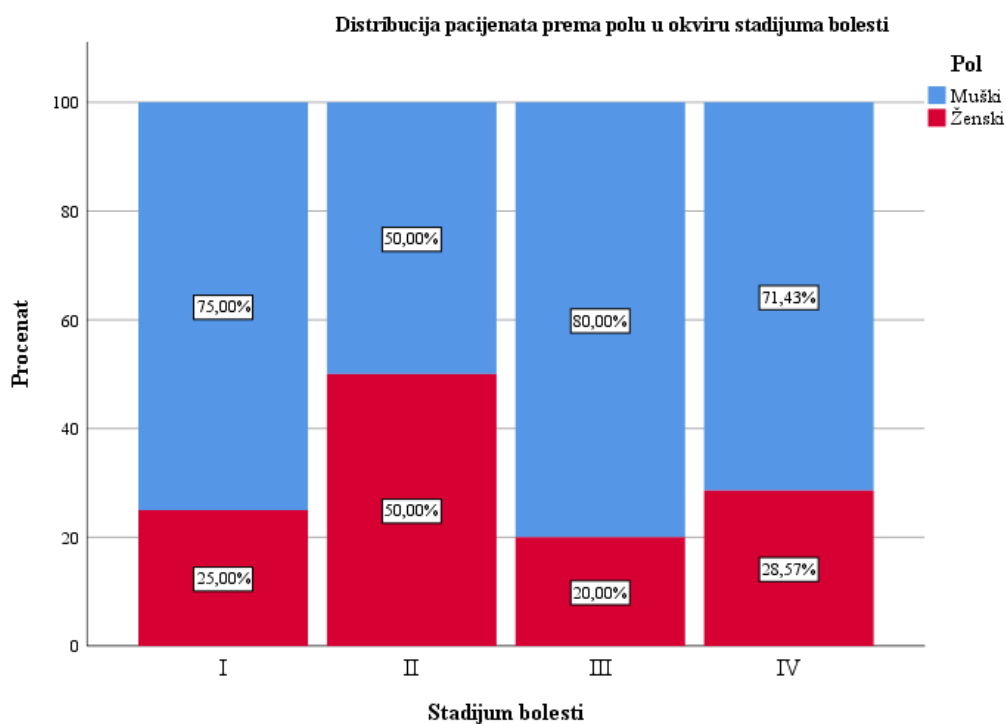
Slika 29. Distribucija pacijenata po stadijumima bolesti

U III stadijumu bolesti je odnos muškaraca i žena bio najviše u korist muškaraca, dok je u II stadijumu bio najviše u korist žena (50%). *Slika 30* prikazuje distribuciju pacijenata prema polu u okviru stadijuma bolesti.

Tabela 16. Karakteristike pacijenata ukupno i u odnosu na stadijum bolesti.

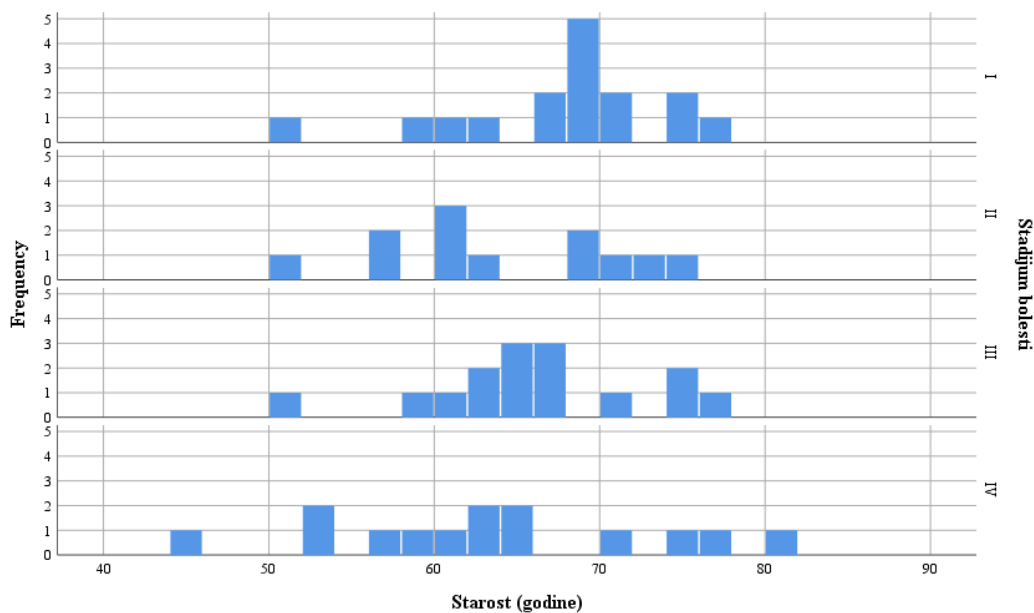
	[Svi]				p
	I stadijum N=16	II stadijum N=12	III stadijum N=15	IV stadijum N=14	
Pol:					0.403 ^a
Muški	40 (70.18%)	6 (50.00%)	12 (80.00%)	10 (71.43%)	
Ženski	17 (29.82%)	6 (50.00%)	3 (20.00%)	4 (28.57%)	
Starost (godine)	65.00 (7.80)	63.33 (7.33)	65.67 (7.05)	63.07 (10.05)	0.413 ^b
Pušenje:					0.531 ^c
Da	52 (91.23%)	12 (100.00%)	14 (93.33%)	13 (92.86%)	
Ne	5 (8.77%)	0 (0.00%)	1 (6.67%)	1 (7.14%)	
Dijametar tu. (mm)	55.00 (32.00- 68.00)	56.50 (41.50- 67.25)	63.00 (57.50- 73.50)	60.00 (48.75- 82.50)	<0.001

^a χ^2 test; ^b Mann-Whitney U test



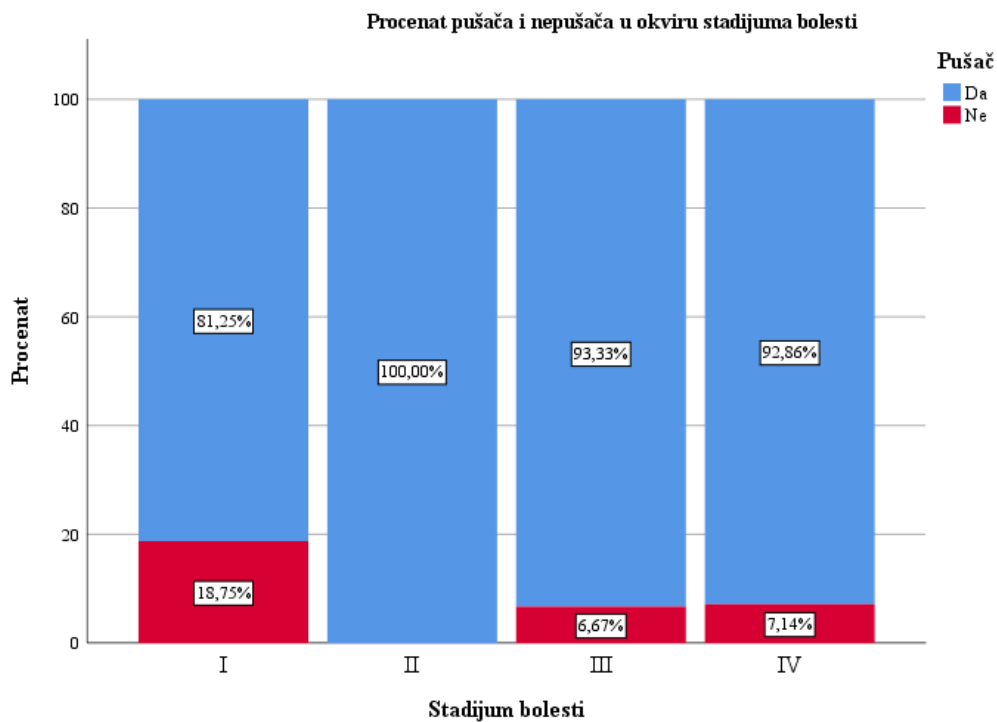
Slika 30. Distribucija pacijenata prema polu u okviru stadijuna bolesti

Nije bilo statistički značajne razlike u starosti pacijenata različitih stadijuna. *Slika 31* prikazuje distribuciju starosti pacijenata prema stadijumu bolesti.



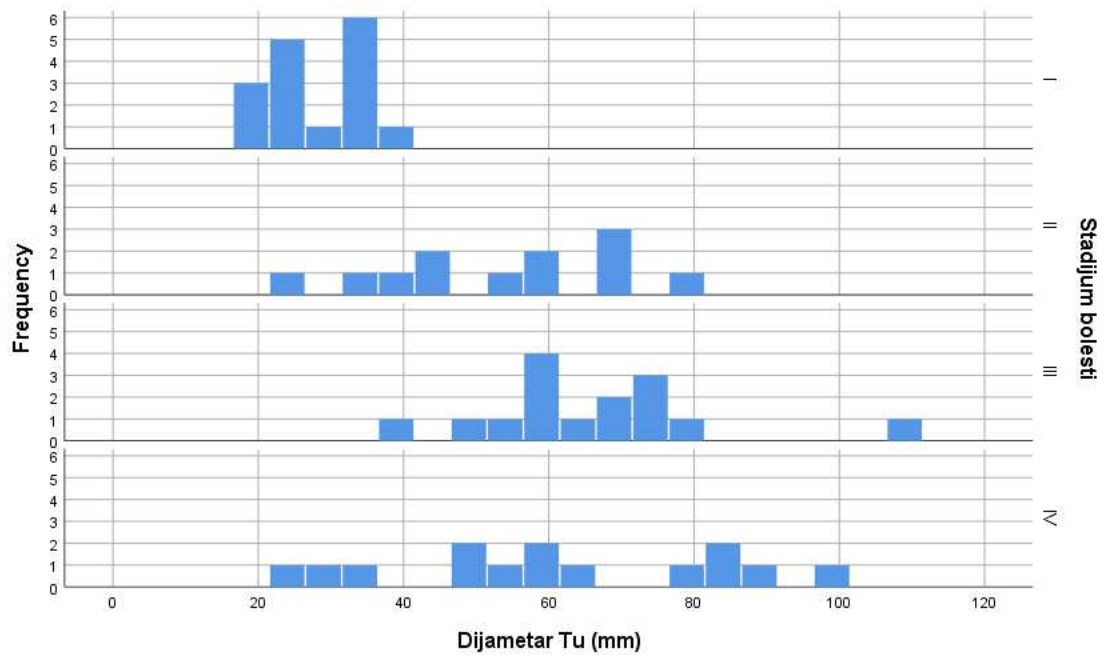
Slika 31. Distribucija starosti pacijenata prema stadijumu bolesti

U svim stadijumima bilo je najviše pušača, preko 90% ukupno. **Slika 32** prikazuje pušački status u okviru stadijuma bolesti kod pacijenata.



Slika 32. Pušački status u okviru stadijuma bolesti kod pacijenata

Dijametar tumora razlikovao se statistički značajno između različitih stadijuma, tako da je najmanji bio u I stadijumu bolesti, a najveći u III i IV stadijumu. **Slika 33** prikazuje distribuciju dijametara tumora u odnosu na stadijum bolesti.



Slika 33. Distribucija dijametara tumora u odnosu na stadijum bolesti

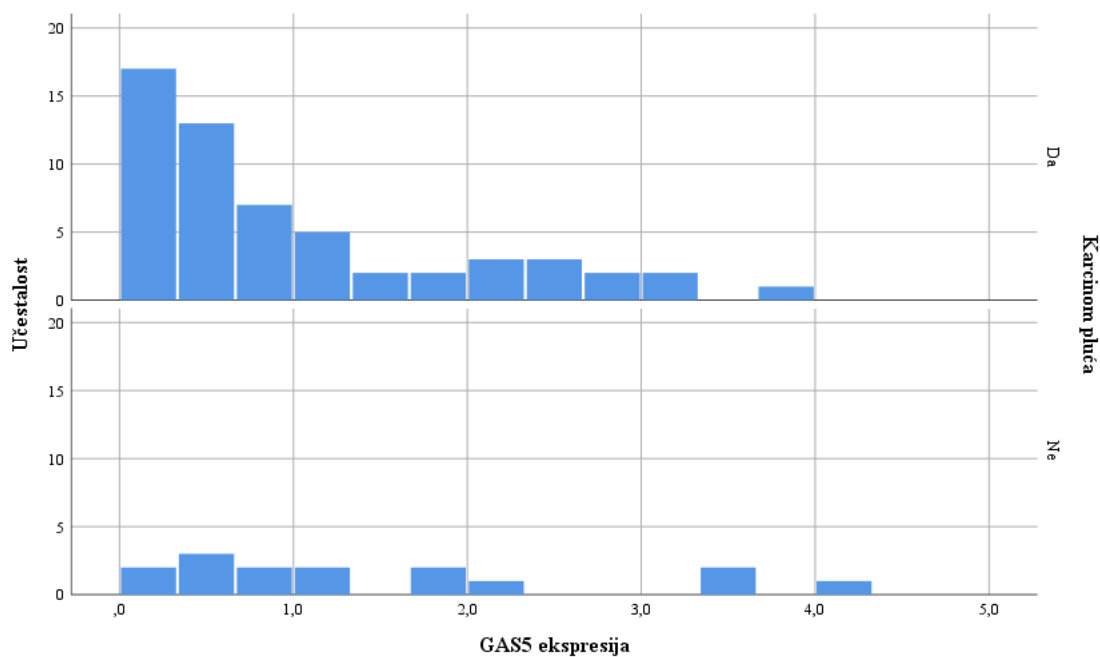
4.4 GAS5 Ekspresija

Tabela 17 prikazuje GAS5 ekspresiju u odnosu na zdravu i obolelu populaciju. GAS5 ekspresija bila je veća u grupi kontrola u odnosu na grupu obolelih. Ova razlika između pacijenata i kontrola bila je na granici statističke značajnosti ($p = 0.081$).

Tabela 17. Gas5 ekspresija ukupno i u zavisnosti od pripadnosti grupi pacijenata ili kontrola

kontrola	
GAS5	
[Svi]	0,67 (0,19-1,70)
N=73	
Ne	1,00 (0,57-2,07)
N=15	
Da	0,65 (0,16-1,39)
N=58	
P *	0,081

* Studentov t test



Slika 34. Učestalost nivoa ekspresije GAS5 kod pacijenata i kontrola

Slika 34. prikazuje učestalosti nivoa ekspresije GAS5 kod zdravih i obolelih. Kod obolelih se češće viđaju niži nivoi ekspresije GAS5 nego kod kontrolne grupe, iako se u najvećem delu spektra GAS5 ekspresije ove dve grupe prepliću, što ukazuje na nizak značaj GAS5 u diskriminaciji između njih.

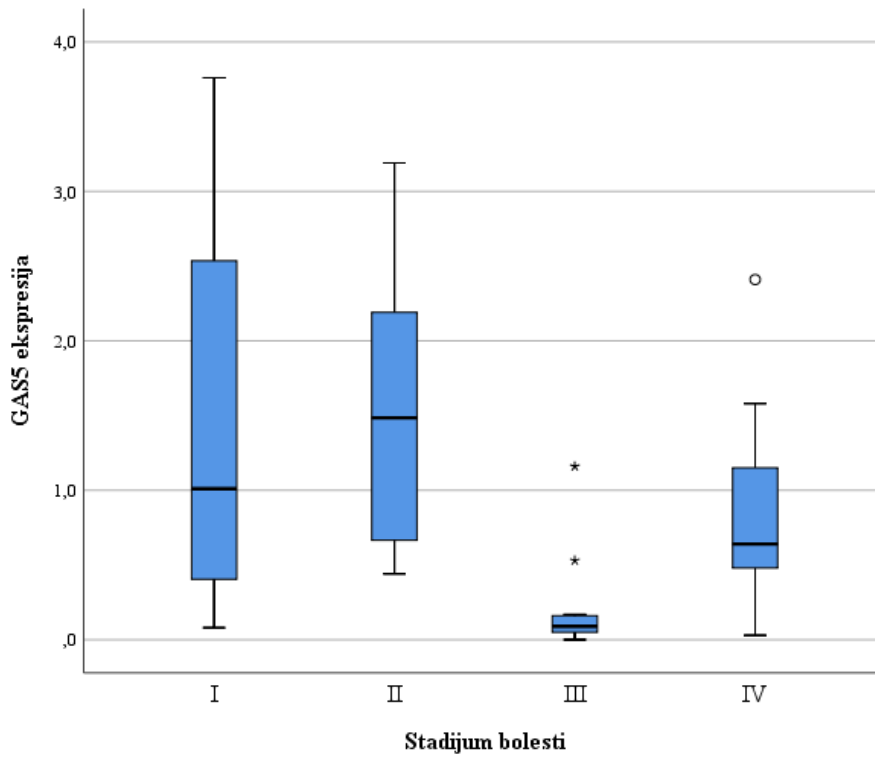
Tabela 18 prikazuje ekspresiju GAS5 u odnosu na stadijum bolesti kod pacijenata sa karcinomom pluća. Najveća ekspresija uočena je kod pacijenata II stadijuma bolesti, a najniža kod pacijenata III stadijuma bolesti. Postoji statistički značajna razlika u GAS5 ekspresiji između pacijenata različitih stadijuma bolesti ($p < 0,001$).

Tabela 18. GAS5 ekspresija u odnosu na stadijum bolesti kod pacijenata

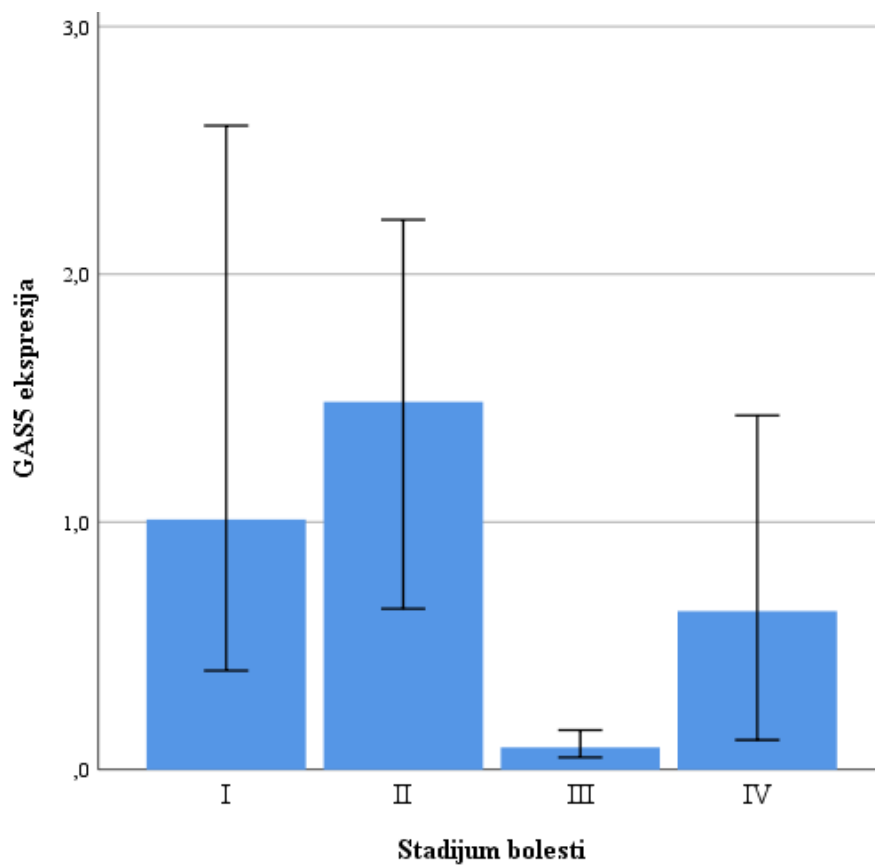
	GAS5
[Svi] N=57	0,65 (0,16-1,43)
I stadijum N=16	1,01 (0,41-2,50)
II stadijum N=12	1,48 (0,67-2,18)
III stadijum N=15	0,09 (0,05-0,16)
IV stadijum N=14	0,64 (0,49-1,11)
p *	<0,001

* Kruskal Wallis test

Slika 35 prikazuje razliku između GAS5 ekspresije kroz četiri stadijuma bolesti.



Slika 35. GAS5 ekspresija u četiri stadijuma bolesti



Slika 35a. GAS5 ekspresija u četiri stadijuma bolesti

Najveći pad ekspresije GAS5 vidi se u III stadijumu bolesti koji se statistički značajno razlikuje od I ($p < 0.001$), II ($p < 0.001$) i IV stadijuma ($p = 0.0037$). Statistički značajne razlike nisu uočene između I i II kao ni između I i IV stadijuma bolesti, ali statistički značajna razlike u GAS5 ekspresiji postoji između II i IV stadijuma bolesti ($p = 0.033$).

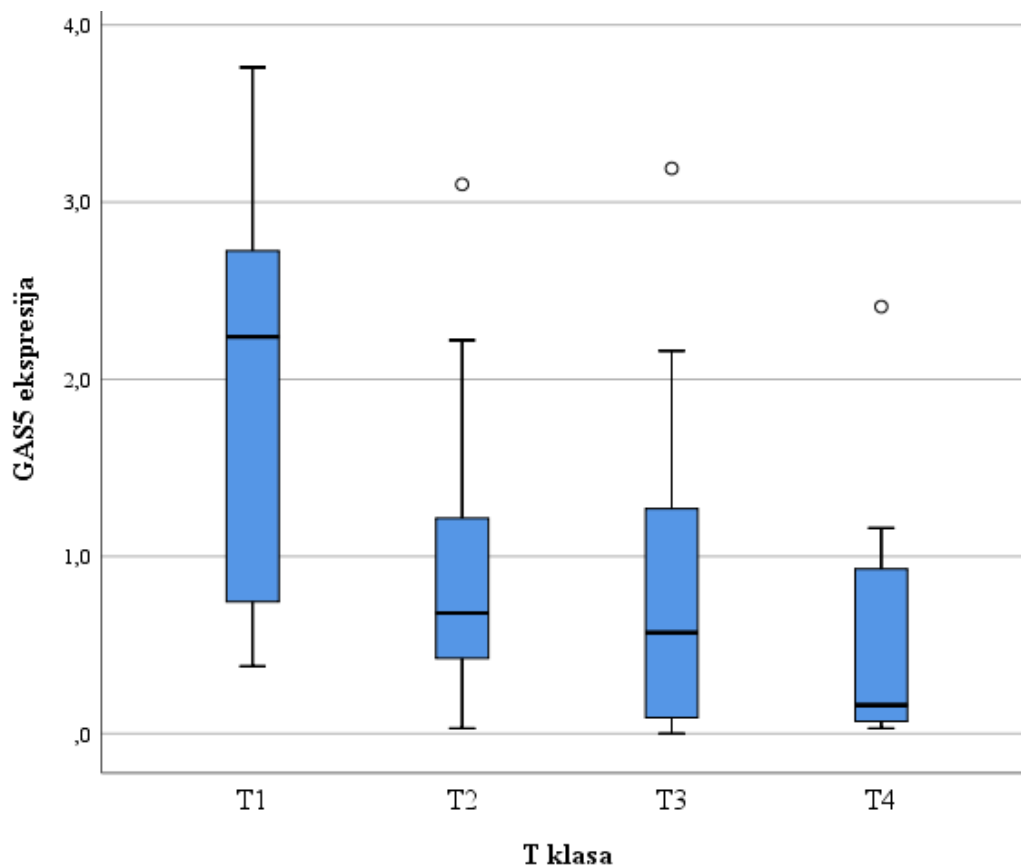
Tabela 19. prikazuje ekspresiju GAS5 u odnosu na T klasu TNM klasifikacije bolesti kod pacijenata. Najveća ekspresija uočena je kod pacijenata T1 stadijuma, a najniža kod pacijenata T4 stadijuma. Postoji statistički značajna razlika u GAS5 ekspresiji između pacijenata različitih T stadijuma bolesti ($p < 0.012$).

Tabela 19. GAS5 ekspresija u odnosu na T stadijum bolesti kod pacijenata

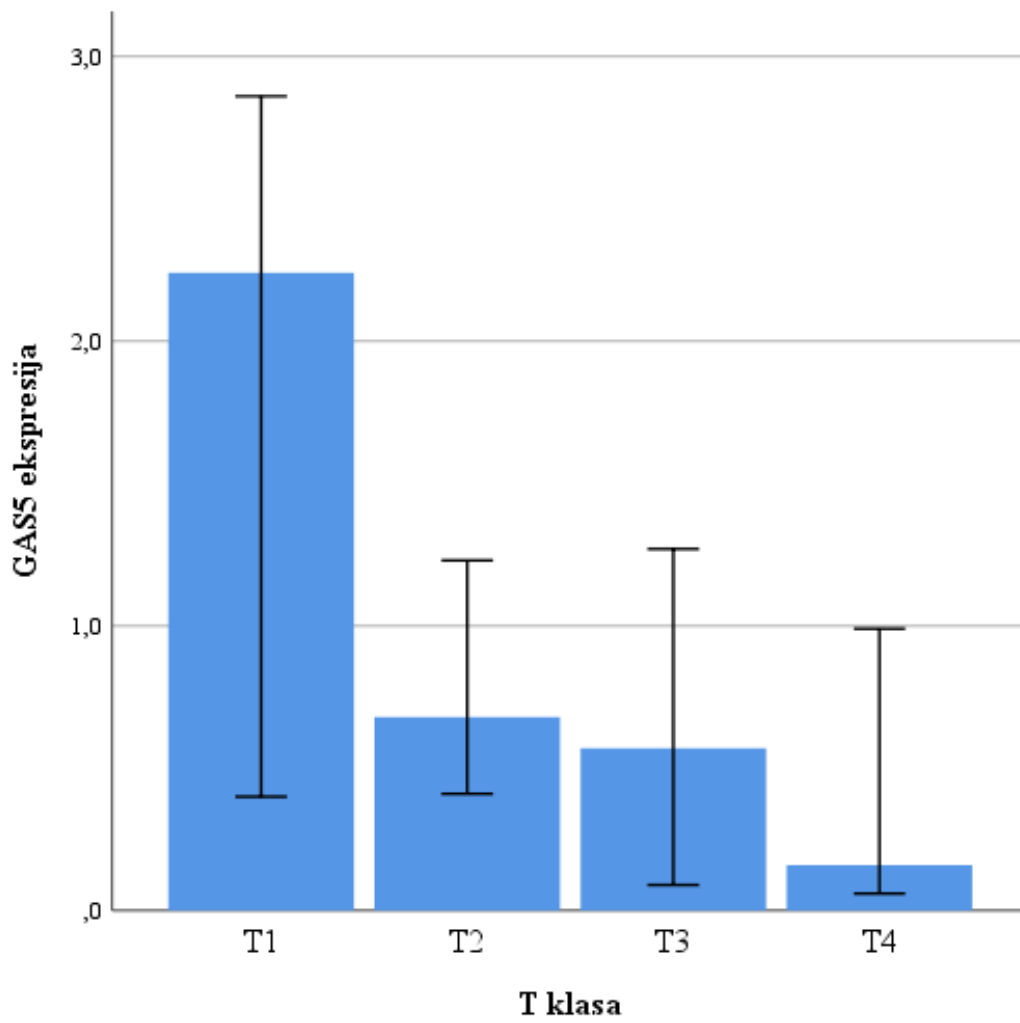
	GAS5
[Svi]	0,65 (0,16-1,43)
N=57	
T1	2,24 (0,74-2,73)
N=11	
T2	0,68 (0,42-1,21)
N=15	
T3	0,57 (0,09-1,27)
N=17	
T4	0,16 (0,08-0,86)
N=14	
p *	0,012

* Kruskal Wallis test

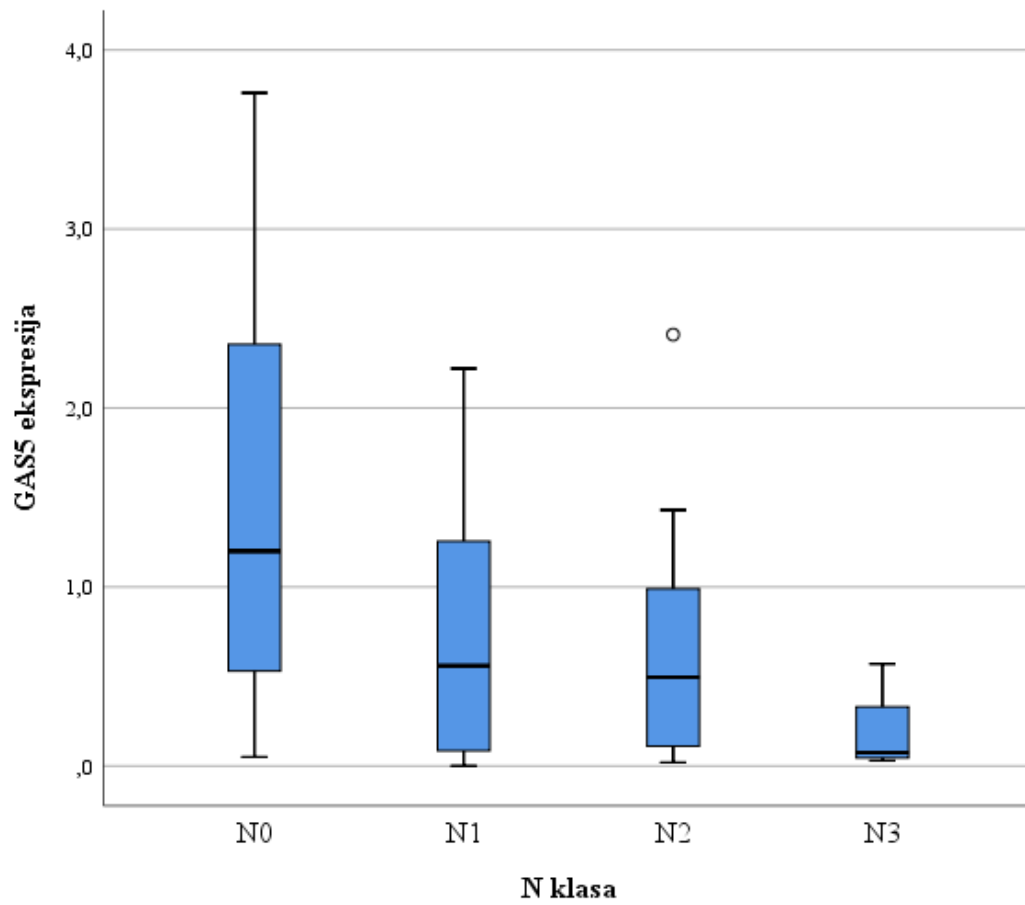
Slika 36 prikazuje nivoe GAS5 ekspresije između grupa pacijenata na osnovu T klasifikacije. T1 klasa se statistički značajno razlikuje od svih ostalih klasa (T2, T3 i T4), dok između T2 i T3 klase, kao i između T3 i T4 klase ne postoji statistički značajna razlike. Statistički značajna razlika uočena je i između T2 i T4 klase bolesti.



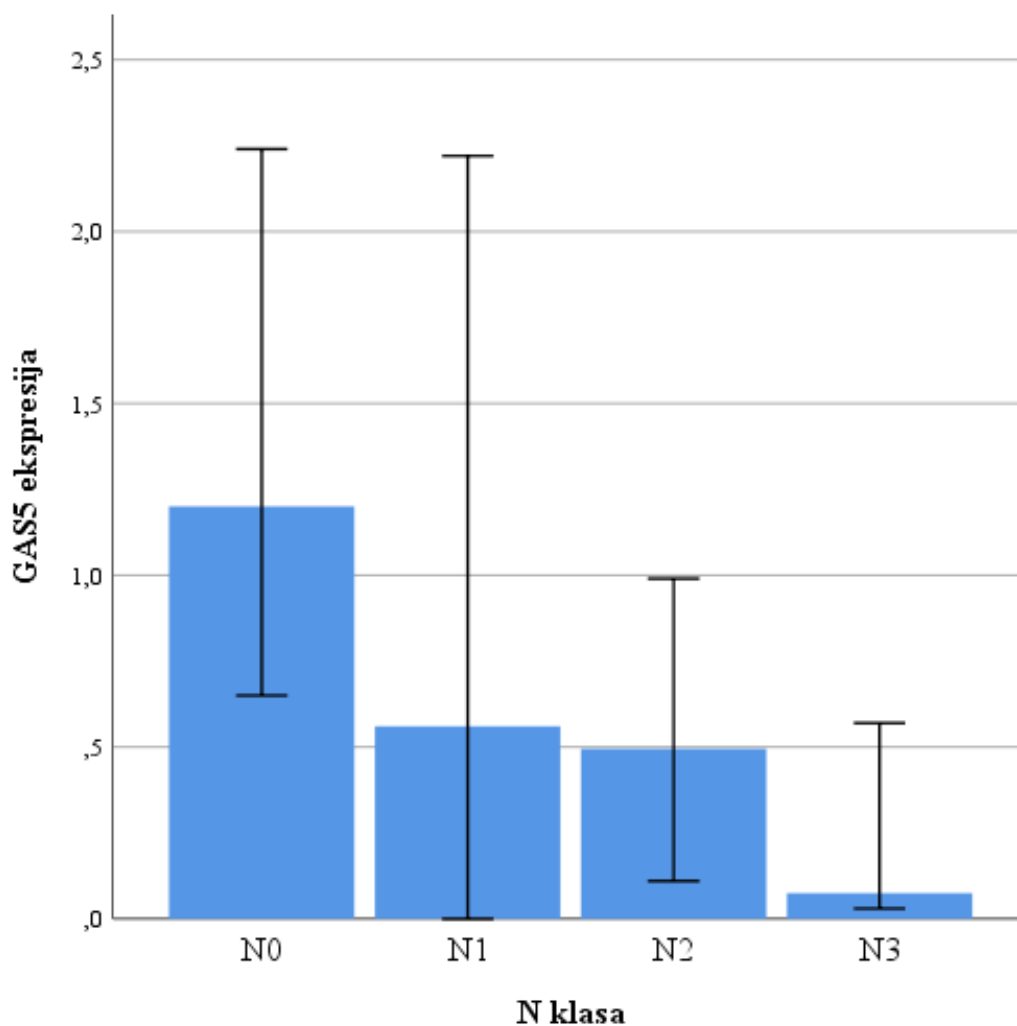
Slika 36. GAS5 ekspresija u zavisnosti od T klase



Slika 36a. GAS5 ekspresija u zavisnosti od T klase



Slika 37. GAS5 ekspresija u zavisnosti od N klase



Slika 37a. GAS5 ekspresija u zavisnosti od N klase

Slika 37 prikazuje ekspresiju GAS5 u odnosu na N klasu TNM klasifikacije bolesti kod pacijenata. N0 klasa se statistički značajno razlikuje od N2 i N3 klase, dok između ostalih grupa nije bilo statistički značajne razlike.

Tabela 20. prikazuje ekspresiju GAS5 u odnosu na N klasu TNM klasifikacije bolesti kod pacijenata. Najveća ekspresija uočena je kod pacijenata N0 stadijuma, a najniža kod pacijenata N3 stadijuma. Postoji statistički značajna razlika u GAS5 ekspresiji između pacijenata različitih N stadijuma bolesti ($p < 0,006$).

Tabela 20. GAS5 ekspresija u odnosu na N stadijum bolesti kod pacijenata

	GAS5
[Svi] N=57	0,65 (0,00-3,76)
N0 N=27	1,20 (0,05-3,76)
N1 N=8	0,56 (0,00-2,22)
N2 N=18	0,50 (0,02-2,41)
N3 N=4	0,08 (0,03-0,57)
p *	0,006

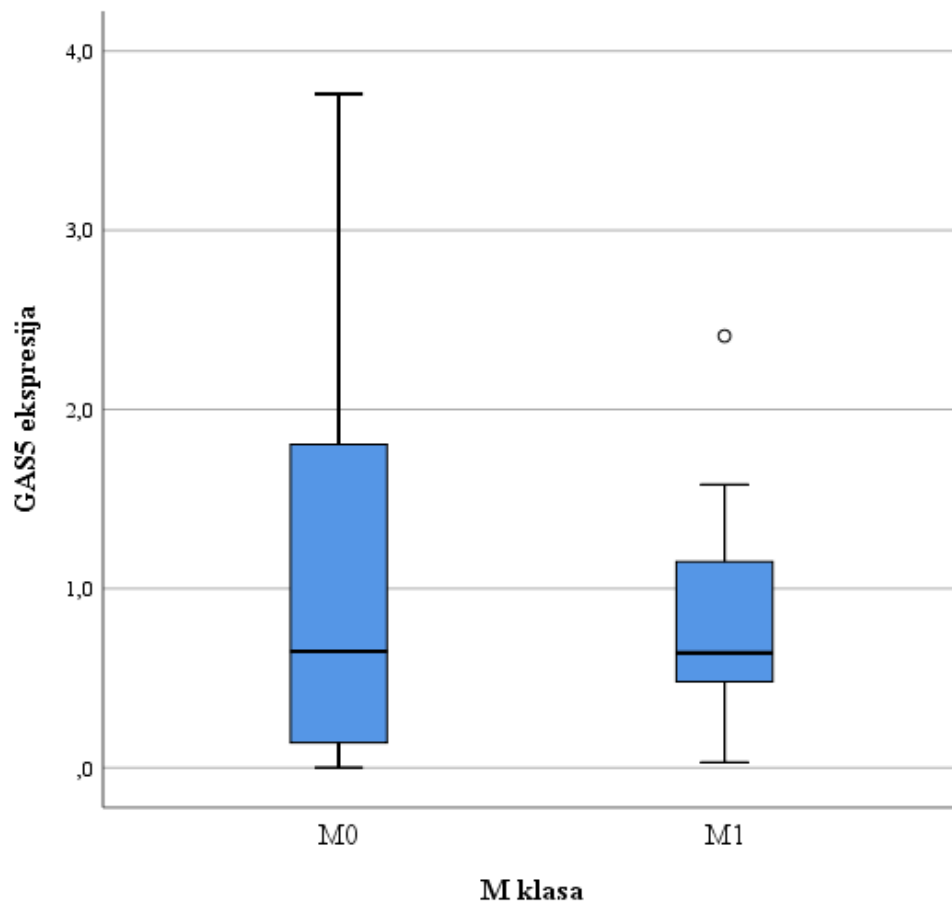
* Kruskal Wallis test

Tabela 21. GAS5 ekspresija u odnosu na M stadijum bolesti kod pacijenata

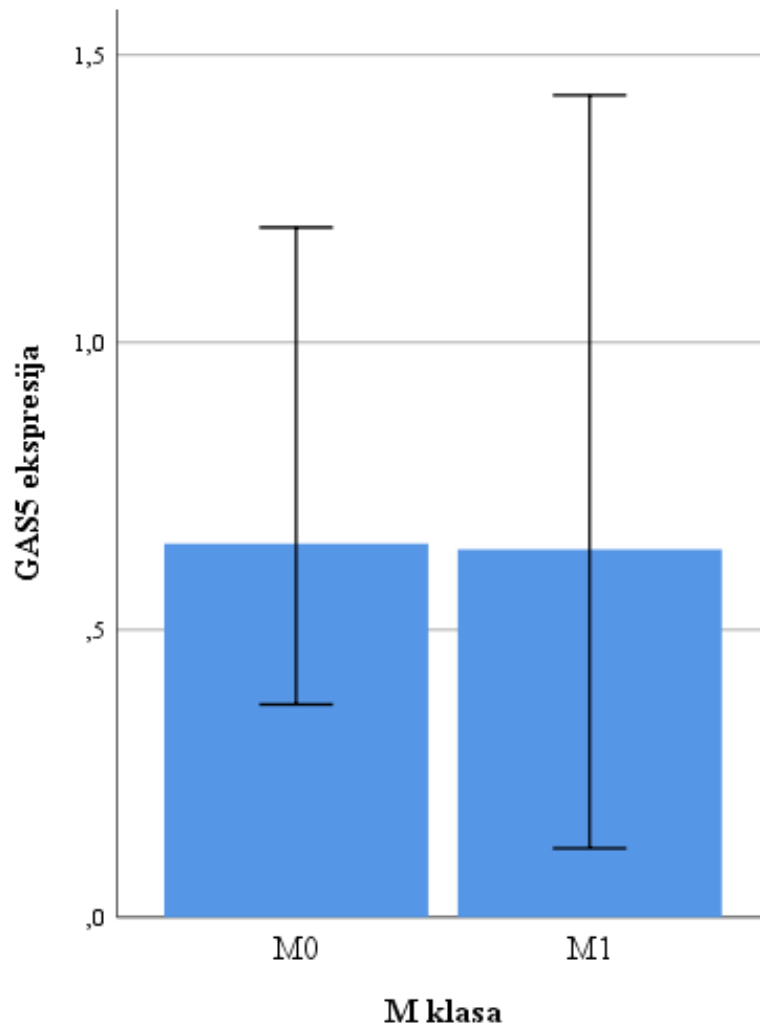
	GAS5
[Svi] N=57	0.65 (0.16-1.43)
M0 N=43	0.65 (0.14-1.80)
M1 N=14	0.64 (0.49-1.11)
p*	0.911

*Mann-Whitney U test

Tabela 21. prikazuje GAS5 ekspresiju u odnosu na M stadijum bolesti kod pacijenata. Nije bilo statistički značajne razlike u GAS5 ekspresiji između pacijenata M0 i M1 stadijuma.



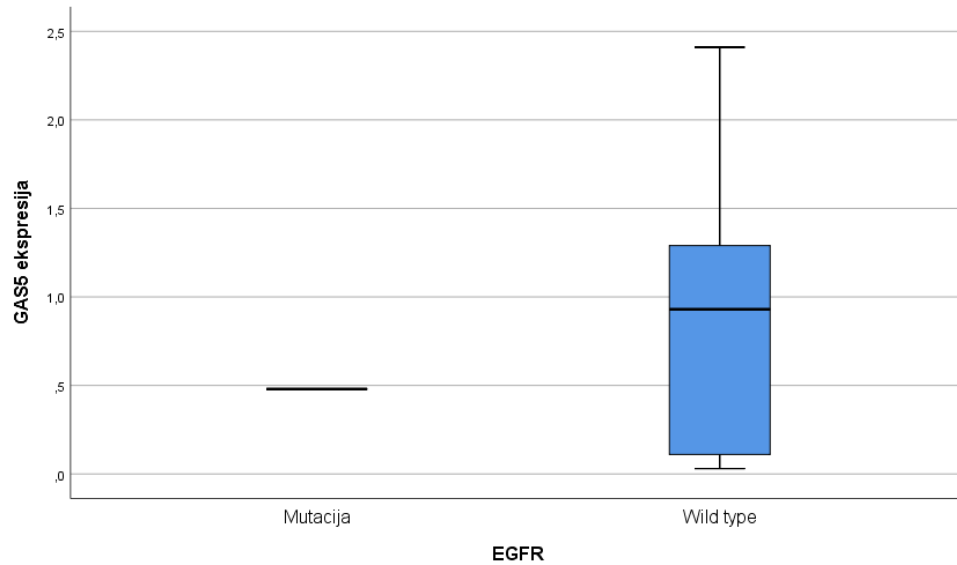
Slika 38. GAS5 ekspresija u zavisnosti od M klase



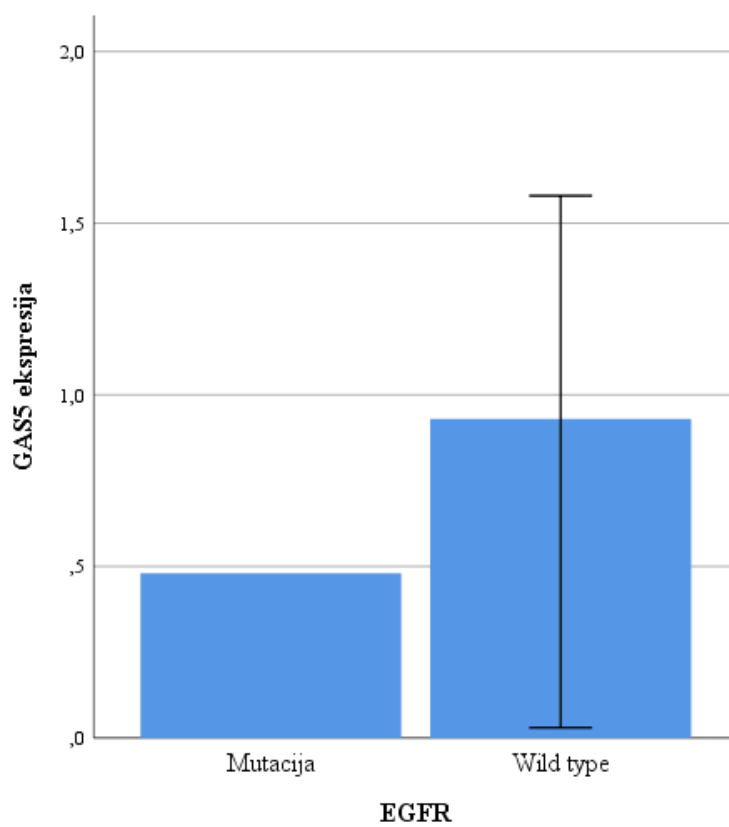
Slika 38a. GAS5 ekspresija u zavisnosti od M klase

Slika 38 prikazuje GAS5 ekspresiju kod grupa pacijenata na osnovu M klasifikacije. Nije uočena statistički značajna razlika u GAS5 ekspresiji između M0 i M1 klase pacijenata.

Slika 39 prikazuje GAS5 ekspresiju kod pacijenata u odnosu na EGFR status. GAS5 ekspresija kod pacijenta sa EGFR mutacijom bila je 0,48 dok je medijana kod „wild type“ pacijenata bila 0,93.

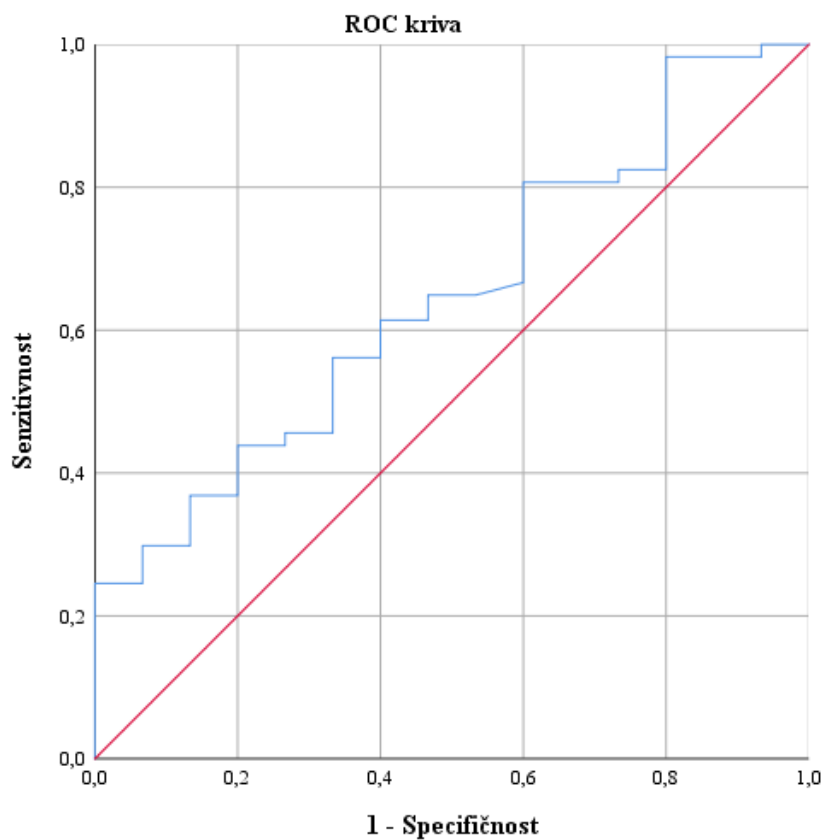


Slika 39. GAS5 ekspresija u odnosu na EGFR status



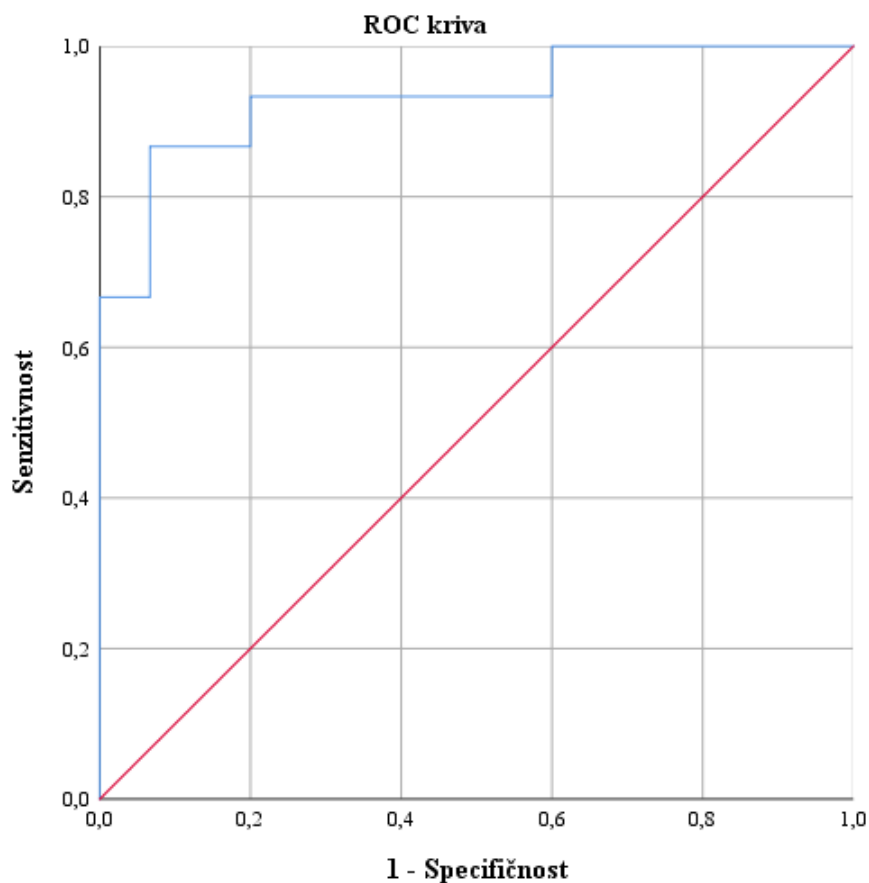
Slika 39a. GAS5 ekspresija u odnosu na EGFR status

4.5 Diskriminatorsna vrednost GAS5 ekspresije



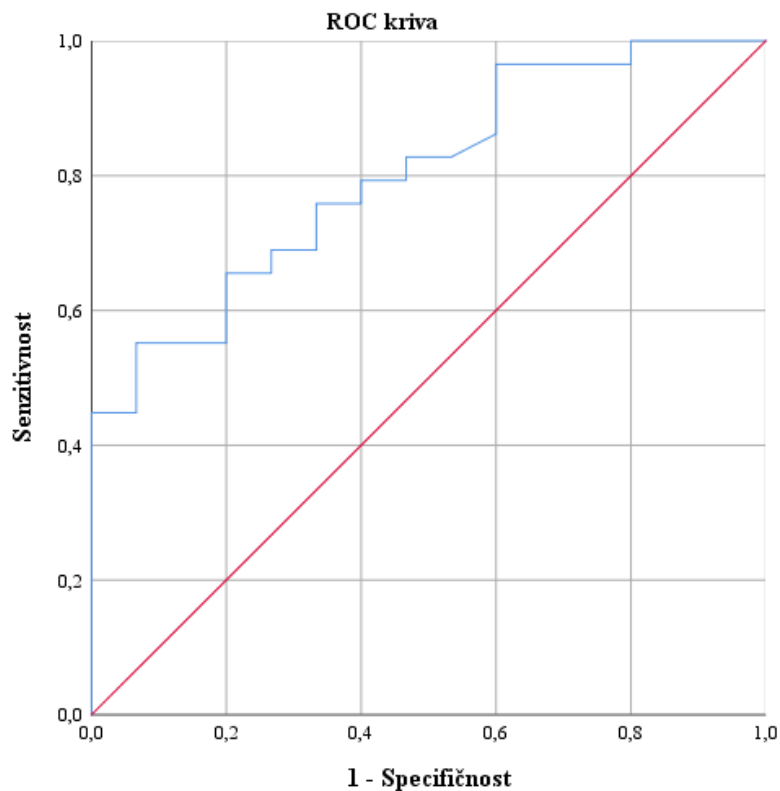
Slika 40. ROC kriva pacijenti-kontrole

Slika 40 prikazuje ROC krivu koja je korišćena za računanje mogućnosti GAS5 ekspresije da diskriminiše između pacijenata sa tumorom pluća i zdravih kontrola. U našoj studiji vrednost površine ispod krive (area under the curve – AUC) je bila 0,65 (95% CI: 0,50 – 0,79, $p = 0,81$), sa optimalnom senzitivnošću i specifičnošću od 45% i 73%, redom.



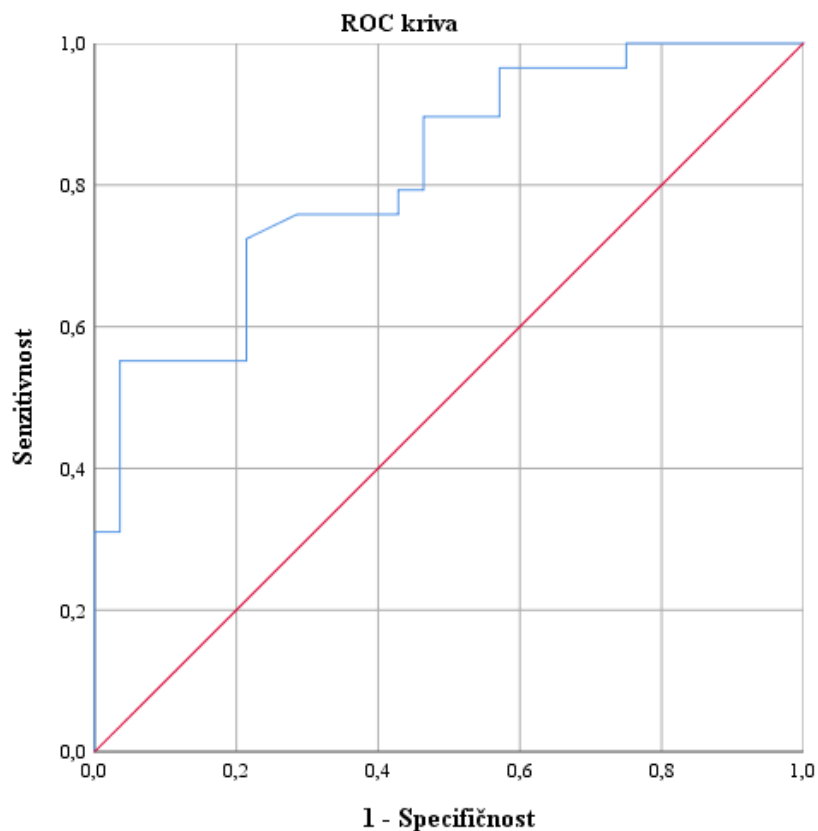
Slika 41. ROC kriva kontrole-III stadijum bolesti

Slika 41 prikazuje ROC krivu koja je korišćena za računanje mogućnosti GAS5 ekspresije da diskriminiše između pacijenata sa tumorom pluća u III stadijumu bolesti i zdravih kontrola. U našoj studiji vrednost površine ispod krive (area under the curve – AUC) je bila 0,93 (95% CI: 0,84 – 1,024; $p < 0.001$), sa optimalnom senzitivnošću i specifičnošću od 87% i 93%, redom.



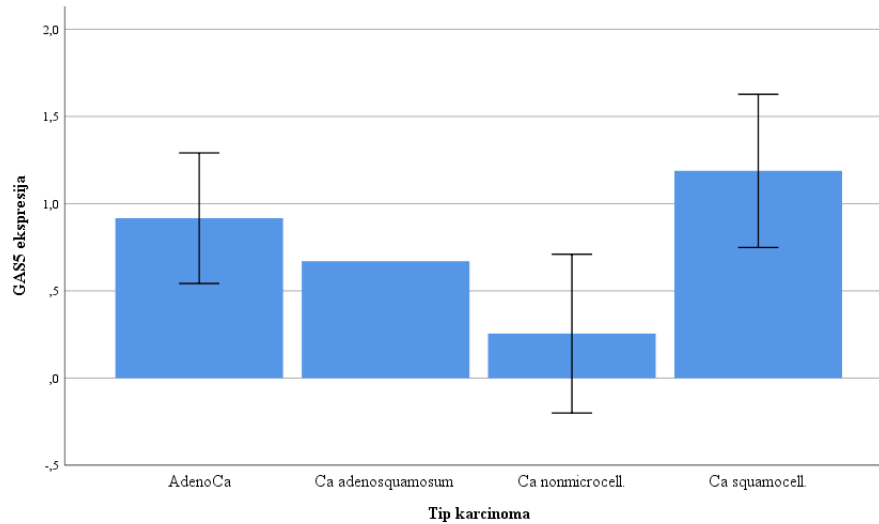
Slika 42. ROC kriva kontrole-III stadijum bolesti

Slika 42 prikazuje ROC krivu u slučaju kombinovanja pacijenata u III i IV stadijumu bolesti u poređenju sa kontrolnom grupom. GAS5 ekspresija je pokazala značajnu prediktivnu vrednost sa AUC od 0,82 (85% CI: 0,67 – 0,93; $p = 0.001$), uz senzitivnost od 53% i specifičnost od 79%.



Slika 43. ROC kriva kontrole-III i IV stadijum bolesti

Na kraju, ispitivali smo da li GAS5 ekspresija može da pomogne u diskriminaciji između pacijenata I i II stadijuma bolesti (kombinovano) i pacijenata u III i IV stadijumu bolesti (kombinovano). ***Slika 43*** prikazuje ROC krivu u ovom slučaju, gde je AUC 0,82 (95% CI: 0,71 – 0,92; $p < 0.001$) uz senzitivnost od 73% i specifičnost od 79%.



Slika 44. GAS5 ekspresija u odnosu na tip karcinoma

Konačno, ispitivali smo da li se GAS5 ekspresija značajno razlikuje između pacijenata sa različitim tipovima karcinoma pluća. ***Slika 44*** prikazuje GAS5 ekspresiju u odnosu na tip karcinoma. Nije bilo statistički značajne razlike u GAS5 ekspresiji u odnosu na tip ovog maligniteta ($p = 0,412$).

5 Diskusija

Sa razvojem novih tehnologija i pristupa analizi genetskog materijala dugih nekodirajućih RNK se otkriva njihova disregulacija (povećana ili smanjena ekspresija) u nesitnoćelijskom karcinomu pluća. Pojedine nekodirajuće RNK povezane su sa različitim stadijumima u ovom karcinomu, pojedine se specifično ekspresuju kod određenog tipa karcinoma pluća, a pojedine se povezuju sa otpornošću na lekove. Zbog ovih saznanja, neophodno je dobro proučiti ulogu nekodirajućih RNK u patogenezi i lečenju ove bolesti. Najveći problem koji je potrebno rešiti jeste relativno mali broj dugih nekodirajućih RNK koje su opisane i dobro proučene, kao i nejasnoće u vezi sa njihovim ulogama.

Veliki broj pitanja je i dalje otvoren: na koji način duge nekodirajuće RNK regulišu nishodne puteve; da li možemo koristiti duge nekodirajuće RNK kao prediktivni parametar za rizik od karcinoma pluća, ili kao rani dijagnostički marker, ili kao prognostički marker; na koji način duge nekodirajuće RNK utiču na rezistenciju na lekove; da li je moguće iskoristiti duge nekodirajuće RNK kao lekove i na koji način je moguće dopremiti ih do target tkiva?

Na nivou naše studije, uočeno je da oboleli pacijenti nisu imali značajno nižu ekspresiju GAS5 u odnosu na kontrolnu grupu. Slična studija pokazala je da su pacijenti u I stadijumu bolesti imali značajno nižu ekspresiju od zdrave populacije (169). Razlika u GAS5 ekspresiji između obolelih pacijenata i kontrolne grupe nije bila značajna čak ni kada smo pacijente u I stadijumu bolesti podelili na one u IA i IB stadijumu. Jedno objašnjenje možda leži u malim grupama pacijenata u određenom stadijumu bolesti, dok postoji i mogućnost da je razlika koju su uočili Tan i saradnici 2017 god. (169) u tumorskom tkivu nije jednaka razlici koju je moguće detektovati kada se GAS5 meri u plazmi periferne krvi. Zbog toga bi bilo od izuzetne važnosti uraditi studije na većem broju pacijenata u ranim stadijumima nesitnoćelijskog karcinoma pluća.

GAS5 se pokazao kao dobar parametar za određivanje različitosti između zdravih pacijenata i pacijenata u III stadijumu bolesti ($p < 0,001$). Jedine dve studije koje su se bavile analizom cirkulišućeg GAS5 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća pokazale su da ekspresija opada sa rastućim TNM stadijumom bolesti (151,170). Naša studija je pokazala slične rezultate, najveći pad viđen je u trećem stadijumu bolesti, što je značajna prediktivna činjenica.

Ovom „tečnom biopsijom” je pokazano da GAS5 je imao dobre rezultate i kao indikator veličine tumora, s obzirom da su pacijenti sa tumorima većim od 3 cm imali značajno manju ekspresiju od pacijenata sa tumorima manjim od 3 cm. Ova tumor-supresorska karakteristika GAS5 je prepoznata u postojećoj literaturi (158,171). Naša studija pokazuje da GAS5 ekspresija opada kako raste T stadijum bolesti. Na dalje, pacijenti sa nesitnoćelijskim tumorom pluća i sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima imali su značajno nižu ekspresiju GAS5 u poređenju sa pacijentima bez metastaza. Sve zajedno, ovi rezultati nivoa plazmatskog GAS5 su značajnog potencijala signifikantnosti za određivanje raširenosti ove neoplazme.

Nedavni eksperimenti in vitro pokazali su da supresija GAS5 omogućava povećanu migraciju ćelija i invaziju, što na vrlo specifičan način omogućava progresiju nesitnoćelijskog karcinoma pluća (172). Ista studija je pokazala još značajniji rezultat, a to je da GAS5 ekspresiju kontroliše homolog fosfataze i tenzina (PTEN – Phosphatase and Tensin homolog), tumor-supresorski protein. Na taj način je potvrđeno postojanje ose GAS5/miR-205/PTEN (172). GAS5 ima ključnu ulogu u supresiji proliferacije, migracije i invazije mehanizmom inhibicije miR-205. miR-205 inhibiše PTEN ekspresiju tako što se uključuje u regulaciju translacije PTEN-a. Na ovaj način, regulacija PTEN puteva signalizacije mogla bi da bude put ka razvoju novih usko targetiranih terapija za nesitnoćelijski karcinom pluća (172).

Lečenje karcinoma pluća je individualno, usklađeno u odnosu na starosnu dob, komorbiditet, vrstu i stadijum karcinoma i preference pacijenata. Novinu u individualizovanom lečenju predstavljaju biološke terapije, imunoterapije i „target“ terapije za nesitnoćelijski karcinom pluća koje su razvijene metodama genetike i molekularne medicine. Ove tehnike su dovele do novog polja precizne medicine zasnovanog na jedinstvenim molekulskim karakteristikama pojedinačnog pacijenta i specifičnostima karcinoma. Međutim, standardno lečenje koje uključuje hirurgiju, hemioterapiju i zračenje, i dalje je najčešća opcija lečenja za stadijume karcinoma pluća I, II i III. Najznačajnije inovacije su uglavnom vezane za pacijente u IV stadijumu karcinoma pluća (tj. stadijumu diseminovane maligne bolesti) (173)

Najadekvanije lečenje je preduslovljeno tačnim histopatološkom verifikacijom tipa tumora pluća i određivanjem stadijuma bolesti. Naša studija pokazala je kako GAS5 ekspresija može pomoći u diskriminaciji pacijenata u različitim stadijumima bolesti i time pomoći u stejdžingu bolesti, što ima velikog uticaja na izbor terapije i prognozu bolesti.

Stadijum I(Ai B) uključuje T1aN0M0, T1bN0M0, i T2aN0M0 kategorije prema 8. TNM klasifikaciji. U našoj studiji je I stadijum bolesti karakterisao najmanji pad ekspresije GAS5, kao i slaba mogućnost ovog potencijalnog biomarkera da diskriminiše između zdravih i obolelih pacijenata ove faze bolesti. Treba istaći da je GAS5 ipak dosta zavisio od veličine tumora, te može pomoći u proceni veličine tumora.

Hirurgija je metod lečenja za prvi stadijum ovog maligniteta. Smatra se najoptimalnijim lečenjem ukoliko su svi preoperativni uslovi koji uključuju procenu operabilnosti i resektabilnosti za obavljanje intervencije ispunjeni. Suštinski, ukoliko je operacija bila radikalna nema mesta primeni adjuvantne terapije.

Pacijenti kojima je plućna funkcija limitirana u takvoj meri da se operativno lečenje ne može sprovesti su kandidati za druge modalitete lečenja, pre svega za hemioterapiju a petogodišnje preživljavanje kod ovako tretiranih pacijenata u I stadijumu bolesti je između 10 i 25%.

Pacijenti koji, iz nekog razloga, nisu radikalno operisani (pozitivan rub resekcije) zahtevaju ili reesekciju ili primenu hemioterapije i/ili primenu zračne terapije. Adjuvantna hemioterapija se indikuje i kod pacijenata gde postoji patoanatomski nalaz slabo diferentovanog tipa tumora, tumora većeg od 4cm i zahvaćenosti viseralne pleure, prisutne vaskularne invazije, ili je nodalni status nepoznat (169).

Stadijum II(Ai B) uključuje T2bN0M0, T1aN1M0, T1bN1M0, T1bN1M0, T2aN1M0, T2bN1M0, i T3N1M0 kategorije prema 8. reviziji TNM klasifikacije. GAS5 ekspresija nije se značajno razlikovala između I i II stadijuma bolesti, te nije očekivano da može pomoći u diskriminaciji ove dve grupe pacijenata. Alii rezultati pokazuju da je najveća ekspresija uočena u ovom stadijumu.

Hirurška resekcija je metoda izbora i u drugom stadijumu karcinoma pluća, osim kada nije indikovana zbog prisutnih komorbiditeta ili ograničene plućne funkcije. Adjuvantna hemioterapija posle radikalnih operacija pacijenata II kliničkog stadijuma je indikovana jer je ukupno preživljavanje duže (174–176). Adjuvanta radioterapija nije indikovana u ovom stadijumu izuzev kod nekompletnih resekcija tumora zida grudnog koša. Kod nekompletnih resekcija potrebno je nastaviti dalje lečenje ili dodatnom resekcijom sa hemioterapijom ili hemioradioterapija i potom hemiterapija.

Pacijenti čija je bolest klasifikovana u T1-T2N1 ili T3N0 a operacijom nije bila moguća potpuna disekcija medijastinalnih limfnih čvorova, kada je bilo prisutno ekstrakapsularno

širenje i margine su bile blizu tumora nastavljaju dalje lečenje hemioradioterapijom a potom hemioterapijom.

U **III stadijumu** postoje T1aN2M0, T1bN2M0, T2aN2M0, T3N1M0, T3N2M0, i T4N1M0 kategorije prema 8. reviziji TNM klasifikacije.

GAS5 je u našoj studiji pokazao odličnu diskriminaciju između zdravih i pacijenata sa rakom pluća u III stadijumu bolesti, sa senzitivnošću od 87% i specifičnošću od 93%.

Hirurška resekcija, hemioterapija, radioterapija, imunoterapija kao i kombinacija ovih modaliteta može da pretstavlja optimalni terapijski pristup u lečenju ovih pacijenata.

Petogodišnje preživljavanje u stadijumu IIIA kreće se od 10-25%.

Pacijenti koji imaju ekstenzivnije zahvaćene medijastinalne limfne čvorovima (N2 ili N3) nisu pogodni za hiruršku resekciju, već su najpre kandidati za kombinovanu hemio i radioterapiju, ili pak imunoterapiju. Kombinacije hemioterapeutika na bazi cisplatine su optimalno rešenje, a karboplatina je najbolja alternativa kod pacijenata kojima je cisplatina kontraindikovana. Zračenje se sprovodi u više frakcija sa ukupnom dozom od 60 greja.

Adjuvantna hemoterapija ili hirurška resekcija, prema dosadašnjim ispitivanjima ne utiču značajno na preživaljavanje pacijenata koji su inicijalno lečeni kombinacijom hemioterapije i zračenja (177).

Velika randomizovana studija koju je sprovela Evropska organizacija za istraživanje i lečenje karcinoma (EORTC) uporedila je hirurško lečenje sa zračnom terapijom nakon inicijalne hemoterapije. U ovoj studiji nije uočena značajna razlika u dužini preživljavanja između dva modaliteta lečenja u podgrupi N2, stadijuma IIIA.

Pacijenti u N1 podgrupi, bez ekstenzivnog zahvatanja limfnih čvorova, iako u IIIA stadijumu bolesti, bolji su kandidati za hirurško lečenje, jer se može postići zadovoljavajuća resekcija nakon inicijalne hemioterapije, a dvogodišnje preživljavanje kod ovako lečenih pacijenata je i do 70%.

Pacijenti u stadijumu IIIA (T3N1) koji su kandidati za inicijalnu hiruršku resekciju trebalo bi da dobiju i adjuvantnu hemioterapiju nakon operacije. Kod pacijenata sa pozitivnim nalazom u graničnim zonama, zračenje se može pridodati istovremeno sa hemoterapijom.

Adjuvantna radioterapija se razmatra i za pacijente sa ekstenzivnijim zahvatom medijastinalnih limfnih čvorova. Inicijalno je nekoliko retrospektivnih studija ukazalo da

postoji benefit od adjuvantne radioterapije, ali su prospektivne studije inicijalno dale oprečne rezultate, a njihova metaanaliza nije potvrdila značajnije efekte na preživljavanje (178).

Stadijumu III B pripadaju oboleli sa T4, bilo kojim N i T, N3, M0. Resekcija je indikovana u kliničkom statusu T4N0M0 kod odabranih pacijenata. Pacijenti ovog stadijuma, prema novoj klasifikaciji, nisu operabilni tako da je osnovni vid lečenja hemioterapija sa ili bez radioterapije. Konkurentna hemoradioterapija se primenjuje kod obolelih u dobrom opštem stanju

40% pacijenta se dijagnostikuje u momentu kada je bolest u **IV kliničkom stadijumu**.

Oboleli sa onkogenim drajver mutacijama za koje su razvijeni efikasni biološki lekovi (oko 20% NSCLC) imaju značajno duže preživljavanje. Ostali pacijenti sa NSCLC koji su dobrog opšteg stanja poslednjih godina dobili su šansu za lečenje raznim modalitetima, platinskim dubletom, imunoterapijom ili kombinacijom oba; među njima je doduše manji procenat onih koji odlično reaguju pre svega na imunoterapiju, samu ili u kombinaciji sa platinskim dubletom, pa imaju dugotrajno preživljavanje. Palijativna radioterapija se uključuje u kontroli pojedinih simptoma lokalnog rasta primarnog tumora ili simptoma metastaza bolesti.

Hirurgija se primenjuje u slučaju solitarnih metastaza u mozgu koje se mogu odstraniti. Stereotaksična radioetrapija može takodje biti indikovana kod postojanja meta promena u CNS. Kada postoji resektabilan karcinom pluća sa jednom metastazom u jednom nadbubregu moguće je hirurško lečenje(172).

6 Zaključci

1. GAS5 ekspresija je statistički značajno niža kod pacijenata sa tumorima većim od 3 cm, što ukazuje na potencijal ekspresije GAS5 da ukaže na veličinu tumora. Time se uočava njen dijagnostički značaj.

2. Ekspresija GAS5 opada sa stadijumom bolesti, s tim što je najniža ekspresija uočena kod pacijenata u III stadijumu bolesti, u odnosu na zdrave pacijente, ali i pacijente I, II ili IV stadijuma bolesti.

3. GAS5 ekspresija progredijentno opada sa T stadijumom bolesti, tako da je najveća kod T1 stadijuma, a najniža kod T4 stadijuma. Na sličan način GAS5 ekspresija opada u odnosu na N stadijum bolesti, te je ekspresija najviša kod N0 stadijuma, a sa invazijom limfnih čvorova GAS5 ekspresija opada.

4. GAS5 ekspresija se pokazala kao pouzdan indikator uočavanja razlike između kontrolne grupe i pacijenata u III stadijumu bolesti (kada je ekspresija najmanja) sa optimalnom senzitivnošću i specifičnošću od 87% i 93%, redom.

5. GAS5 ekspresija je pokazala značajnu prediktivnu vrednost za uočavanje razlike između zdravih pacijenata i pacijenata u kasnom stadijumu bolesti, uz senzitivnost od 53% i specifičnost od 79%.

6. Ovom "tečnom biopsijom" možemo da uočimo razliku između pacijenata u ranim stadijumima bolesti (I i II) i kasnim stadijumima bolesti (III i IV), i to uz senzitivnost od 73% i specifičnost od 79%.

7. GAS5 ekspresija se nije pokazala kao dobar indikator koji pouzdano diskriminiše zdravu populaciju od pacijenata I ili II stadijuma bolesti, te rezultati naše studije ne podržavaju njegovu upotrebu kao prediktoru za rano otkrivanje nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Izračunata je senzitivnost od 45% i specifičnost od 73%.

8. Ekspresija GAS5 smanjena je kod pacijenata sa nesitnoćelijskim tumorom pluća u odnosu na zdravu kontrolnu grupu.

9. Ovom "tečnom biopsijom" određivanje ekspresije ove vrste RNK bi mogla, na osnovu ovog a i daljeg ispitivanja, se primenjivati u otkrivanju nesitnoćelijskog karcinoma pluća u populaciji sa visokim rizikom od oboljevanja od ove bolesti. Takođe, otvaraju se vrata za dalja proučavanja za ispitivanje prognoze i terapije u zavisnosti od nivoa ekspresije ove plazma RNK.

Literatura

1. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011;117(5):1097–102.
2. Witschi H. A short history of lung cancer. *Toxicol Sci*. 2001;
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;
4. Society AC. *Cancer Facts and Figures 2008*. ACS Publ. 2008;
5. Knežević T, Ivanović I. *Health Statistical Yearbook of Republic of Serbia 2018, Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2018*. Inst za javno Zdr Srb Dr Milan Jovanović Batut", Institut-Batut, Beogr. 2019;
6. Miljuš D, Vukičević A, Živković S, Mickovski-Katalina N, Rakočević I, Plavšić S. *Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2015*. Beogr Inst za javno Zdr Srb. 2017;
7. United States Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress A Report of the Surgeon General*. A Rep Surg Gen. 2014;
8. World Health Organization. *WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco*. Most. 2011.
9. Osman A, Kowitt SD, Ranney LM, Heck C, Goldstein AO. Trends and racial disparities in mono, dual, and poly use of tobacco products among youth. *Nicotine Tob Res*. 2018;
10. Cruz CS Dela, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):605–44.
11. Hajek P, Phillips-Waller A, Przulj D, Pesola F, Smith KM, Bisal N, et al. A

- randomized trial of E-cigarettes versus nicotine-replacement therapy. *N Engl J Med.* 2019;
12. King BA, Graffunder C. The Tobacco Control Vaccine: a population-based framework for preventing tobacco-related disease and death. *Tob Control.* 2018;27(2):123–4.
 13. Nolan MB, Kemper KE, Glynn TJ, Hurt RD, Hays JT. Tobacco Dependence Treatment Grants: A Collaborative Approach to the Implementation of WHO Tobacco Control Initiatives. *J Environ Public Health.* 2018;
 14. Gallaway MS, Glover-Kudon R, Momin B, Puckett M, Lunsford NB, Ragan KR, et al. Smoking cessation attitudes and practices among cancer survivors – United States, 2015. *J Cancer Surviv.* 2019;
 15. Jassem J. ES20.01 Tobacco Cessation After Cancer Diagnosis: Declaration from IASLC. *J Thorac Oncol.* 2019;
 16. Moyer VA. Screening for lung cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2014;
 17. Wang Y, Midthun DE, Wampfler JA, Deng B, Stoddard SM, Zhang S, et al. Trends in the proportion of patients with lung cancer meeting screening criteria. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;
 18. Balata H, Fong KM, Hendriks LE, Lam S, Ostroff JS, Peled N, et al. Prevention and Early Detection for NSCLC: Advances in Thoracic Oncology 2018. *Journal of Thoracic Oncology.* 2019.
 19. De Koning H, Van Der Aalst C, Ten Haaf K, Oudkerk M. PL02.05 Effects of Volume CT Lung Cancer Screening: Mortality Results of the NELSON Randomised-Controlled Population Based Trial. *J Thorac Oncol.* 2018;

20. Travis WD, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. International Agency for Research on Cancer; 2015.
21. Giménez A, Franquet T, Prats R, Estrada P, Villalba J, Bagué S. Unusual primary lung tumors: A radiologic-pathologic overview. *Radiographics*. 2002.
22. Wood DE. Benign lung tumors: Introduction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;15(3):287–8.
23. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*. 2005;
24. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. In: *The Lancet*. 2011.
25. American Cancer Society. Lung Cancer (Non-Small Cell) What is non-small cell lung cancer ? American Cancer Society. 2016;
26. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: Diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;
27. Feng SH, Yang ST. The new 8th tnm staging system of lung cancer and its potential imaging interpretation pitfalls and limitations with ct image demonstrations. *Diagnostic and Interventional Radiology*. 2019.
28. Van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DKM. Small-cell lung cancer. In: *The Lancet*. 2011.
29. Milašinović D, Jovanović D, Tomić I, Rančić M, Radosavljević D. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje karcinoma pluća. Beograd; 2012.
30. Gonzalez G, Crombet T, Torres F, Catala M, Alfonso L, Osorio M, et al. Epidermal

- growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol.* 2003;14(3):461–6.
31. Biederer J, Ohno Y, Hatabu H, Schiebler ML, van Beek EJR, Vogel-Claussen J, et al. Screening for lung cancer: Does MRI have a role? *Eur J Radiol.* 2017;86:353–60.
 32. Purandare NC, Rangarajan V. Imaging of lung cancer: Implications on staging and management. *Indian J Radiol Imaging [Internet].* 25(2):109–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25969634>
 33. Mirsadraee S. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol.* 2012;
 34. Port JL, Andrade RS, Levin MA, Korst RJ, Lee PC, Becker DE, et al. Positron emission tomographic scanning in the diagnosis and staging of non-small cell lung cancer 2 cm in size or less. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;
 35. Khan A, Hashim Z, Gupta M, Lal H, Agarwal A, Nath A. Rigid bronchoscopic interventions for central airway obstruction - An observational study. *Lung India.* 2020;
 36. Qian K, Krinsky WS, Sarkar SA, Deng Y. The Efficiency of Electromagnetic Navigation Bronchoscopy and Virtual Bronchoscopic Navigation. *Ann Thorac Surg.* 2020;
 37. Cattaneo SM, Park BJ, Wilton AS, Seshan VE, Bains MS, Downey RJ, et al. Use of Video-Assisted Thoracic Surgery for Lobectomy in the Elderly Results in Fewer Complications. *Ann Thorac Surg.* 2008;
 38. Sunam GS, Oncel M, Yildiran H. Video-Assisted Mediastinoscopic Lymphadenectomy for Mediastinal Lymph Nodes. *Annals of Thoracic Surgery.* 2016.

39. Kuzdzał J, Warmus J, Grochowski Z. Optimal mediastinal staging in non-small cell lung cancer: What is the role of TEMPLA and VAMLA? *Lung Cancer*. 2014.
40. 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;
41. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours - 8th edition*. Union for International Cancer Control. 2017.
42. Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Vansteenkiste JF, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015 Dec;10(12):1675–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709477>
43. Kay FU, Kandathil A, Batra K, Saboo SS, Abbara S, Rajiah P. Revisions to the Tumor, Node, Metastasis staging of lung cancer (8 th edition): Rationale, radiologic findings and clinical implications. *World J Radiol* [Internet]. 2017;9(6):269. Available from: <http://www.wjgnet.com/1949-8470/full/v9/i6/269.htm>
44. Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: A review of the current evidence. *Chest*. 2003;
45. Toloza EM, Harpole L, Detterbeck F, McCrory DC. Invasive staging of non-small cell lung cancer: A review of the current evidence. *Chest*. 2003.
46. Eberhardt WEE, Mitchell A, Crowley J, Kondo H, Kim YT, Turrisi A, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the M descriptors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of*

- Thoracic Oncology. 2015.
47. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: Review of the changes and clinical implications. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2018.
 48. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. *Medical Clinics of North America*. 2019.
 49. Fischer B, Lassen U, Mortensen J, Larsen S, Loft A, Bertelsen A, et al. Preoperative staging of lung cancer with combined PET-CT. *N Engl J Med*. 2009;
 50. Ohno Y, Koyama H, Dinkel J. Lung cancer. In: *Medical Radiology*. 2018.
 51. Pope WB. Brain metastases: neuroimaging. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 2018.
 52. Marom EM, McAdams HP, Erasmus JJ, Goodman PC, Culhane DK, Coleman RE, et al. Staging non-small cell lung cancer with whole-body PET. *Radiology*. 1999;
 53. Bédard B, Abdelnour-Berchtold E, Perneger T, Licker MJ, Stefani A, Krull M, et al. Comparison of postoperative complications between segmentectomy and lobectomy by video-assisted thoracic surgery: A multicenter study. *J Cardiothorac Surg*. 2019;
 54. Skrzypczak PJ, Roszak M, Kasprzyk M, Kopczyńska A, Gabryel P, Dyszkiewicz W. Pneumonectomy – Permanent injury or still effective method of treatment? Early and long-term results and quality of life after pneumonectomy due to non-small cell lung cancer. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Pol*. 2019;
 55. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):703–40.
 56. Yip PY, Yu B, Cooper WA, Selinger CI, Ng CC, Kennedy CW, et al. Patterns of DNA mutations and ALK rearrangement in resected node negative lung adenocarcinoma. *J*

- Thorac Oncol. 2013;
57. Sequist L V., Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol.* 2011;
 58. Liu P, Morrison C, Wang L, Xiong D, Vedell P, Cui P, et al. Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing. *Carcinogenesis.* 2012;
 59. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell.* 2012;
 60. Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, Won JK, et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res.* 2012;
 61. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med.* 2012;
 62. Hammerman PS, Voet D, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;
 63. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011;
 64. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2003.
 65. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and

- distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2008;
66. Rodenhuis S, Slebos RJC. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. In: Cancer Research. 1992.
 67. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature. 2008;
 68. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, et al. Mutational analysis of the EGFR gene in lung cancer with acquired resistance to gefitinib. J Clin Oncol. 2006;
 69. Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis of 22 studies. Lung Cancer. 2010;
 70. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst. 2005;
 71. Tam IYS, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MCM, Ho KK, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. Clin Cancer Res. 2006;
 72. Schmid K, Oehl N, Wrba F, Pirker R, Pirker C, Filipits M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. Clin Cancer Res. 2009;
 73. Subramanian J, Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. The Lancet Oncology. 2008.

74. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res.* 2012;
75. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004;
76. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2008;
77. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2012;
78. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. In: *Endocrine-Related Cancer.* 2001.
79. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol cell Biol.* 2001;2(2):127–37.
80. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* (80-). 2004;
81. Greulich H, Chen T-H, Feng W, Jänne PA, Alvarez J V, Zappaterra M, et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and-resistant EGFR mutants. *PLoS Med.* 2005;2(11).

82. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2005;
83. Yoshida K, Yatabe Y, Park JY, Shimizu J, Horio Y, Matsuo K, et al. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;
84. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009.
85. Marchetti A, Ardizzoni A, Papotti M, Crinò L, Rossi G, Gridelli C, et al. Recommendations for the analysis of ALK gene rearrangements in non-small-cell lung cancer: A consensus of the Italian association of medical oncology and the Italian society of pathology and cytopathology. *J Thorac Oncol.* 2013;
86. Wu JY, Wu SG, Yang CH, Gow CH, Chang YL, Yu CJ, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res.* 2008;
87. Ohtsuka K, Ohnishi H, Fujiwara M, Kishino T, Matsushima S, Furuyashiki G, et al. Abnormalities of epidermal growth factor in lung squamous-cell carcinomas, adenosquamous carcinomas, and large-cell carcinomas: Tyrosine kinase domain mutations are not rare in tumors with an adenocarcinoma component. *Cancer.* 2007;
88. Tran TN, Selinger CI, Kohonen-Corish MRJ, McCaughan BC, Kennedy CW, O'Toole SA, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2013;
89. Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, Mermel C, Cho J, Sharifnia T, et al. Inhibitor-sensitive fgfr1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2011;

90. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;
91. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 2011;
92. Falchook GS, Long G V., Kurzrock R, Kim KB, Arkenau TH, Brown MP, et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2012;
93. Sadiq AA, Salgia R. MET As a possible target for non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013.
94. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;
95. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2009;
96. Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2009;
97. Go H, Jeon YK, Park HJ, Sung SW, Seo JW, Chung DH. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;
98. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Joon OP, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3

- signaling. *Science* (80-). 2007;
99. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006.
 100. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*. 2001;
 101. Tsurutani J, West KA, Sayyah J, Gills JJ, Dennis PA. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway but not the MEK/ERK pathway attenuates laminin-mediated small cell lung cancer cellular survival and resistance to imatinib mesylate or chemotherapy. *Cancer Res*. 2005;
 102. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489–501.
 103. Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: A new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;
 104. Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, O'Toole S, Yip PY, Wright GM, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: A multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2013;
 105. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;
 106. Wong DWS, Leung ELH, So KKT, Tam IYS, Sihoe ADL, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*. 2009;

107. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 2009;
108. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2011;
109. Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, Wong KK, Chirieac LR, Lindeman NI, et al. Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2013;
110. Tiseo M, Gelsomino F, Boggiani D, Bortesi B, Bartolotti M, Bozzetti C, et al. EGFR and EML4-ALK gene mutations in NSCLC: A case report of erlotinib-resistant patient with both concomitant mutations. *Lung Cancer*. 2011;
111. Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;
112. Wells SA, Santoro M. Targeting the RET pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;
113. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993.
114. Raso MG, Wistuba II. Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. In: *Journal of Thoracic Oncology*. 2007.
115. Wistuba II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;

116. Jin G, Kim MJ, Jeon HS, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. 2010;
117. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res*. 2003;4(1):12.
118. Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, Fyfe MN, Campan M, Siegmund KD, et al. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2011;6(6).
119. Brzezińska E, Dutkowska A, Antczak A. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(1):309–25.
120. Zochbauer-Muller S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist*. 2002;7(5):451–7.
121. Licchesi JDF, Westra WH, Hooker CM, Herman JG. Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2570–8.
122. Chung J-H, Lee HJ, Kim B, Cho N-Y, Kang GH. DNA methylation profile during multistage progression of pulmonary adenocarcinomas. *Virchows Arch*. 2011;459(2):201–11.
123. Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Manegold C, et al. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation on survival of non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine. *Lung Cancer*. 2007;56(1):115–23.
124. Toyooka S, Mitsudomi T, Soh J, Aokage K, Yamane M, Oto T, et al. Molecular oncology of lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;59(8):527.

125. Belinsky SA. Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(9):1481–7.
126. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, et al. Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2005;50(1):43–9.
127. Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, Dote H, Ouchida M, Hanabata T, et al. Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers. *Int J cancer*. 2005;113(1):59–66.
128. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, et al. Promoter methylation of DAL-1/4.1 B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin cancer Res*. 2005;11(8):2954–61.
129. Kim H, Kwon YM, Kim JS, Lee H, Park J-H, Shim YM, et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2363–70.
130. Toyooka S, Suzuki M, Tsuda T, Toyooka KO, Maruyama R, Tsukuda K, et al. Dose effect of smoking on aberrant methylation in non-small cell lung cancers. *Int J cancer*. 2004;110(3):462–4.
131. Kim D-H, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, et al. p16INK4a and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2001;61(8):3419–24.
132. Buckingham L, Penfield Faber L, Kim A, Liptay M, Barger C, Basu S, et al. PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients. *Int J cancer*. 2010;126(7):1630–9.
133. Anisowicz A, Huang H, Braunschweiger KI, Liu Z, Giese H, Wang H, et al. A high-throughput and sensitive method to measure global DNA methylation: application in

- lung cancer. *BMC Cancer*. 2008;8(1):222.
134. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148–59.
 135. Bartling B, Hofmann H-S, Boettger T, Hansen G, Burdach S, Silber R-E, et al. Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung cancer*. 2005;49(2):145–54.
 136. Suzuki H, Ouchida M, Yamamoto H, Yano M, Toyooka S, Aoe M, et al. Decreased expression of the SIN3A gene, a candidate tumor suppressor located at the prevalent allelic loss region 15q23 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;59(1):24–31.
 137. Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin cancer Res*. 2012;31(1):54.
 138. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: The PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2006.
 139. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*. 2010;
 140. Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, et al. LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*. 2011;
 141. Pauli A, Rinn JL, Schier AF. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nature Reviews Genetics*. 2011.
 142. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs.

- Cell. 2009.
143. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;
 144. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends in Cell Biology*. 2011.
 145. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular Cancer*. 2011.
 146. Wei MM, Zhou GB. Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer. *Genomics, Proteomics Bioinforma* [Internet]. 2016;14(5):280–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.007>
 147. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nature Reviews Genetics*. 2009.
 148. Wan Y, Kertesz M, Spitale RC, Segal E, Chang HY. Understanding the transcriptome through RNA structure. *Nature Reviews Genetics*. 2011.
 149. Zamaratski E, Pradeepkumar PI, Chattopadhyaya J. A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2001.
 150. Li CH, Chen Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: Progress and prospects. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2013;45(8):1895–910. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.030>
 - 151.
 152. Mourtada-Maarabouni M, Hasan AM, Farzaneh F, Williams GT. Inhibition of human T-cell proliferation by mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists requires

- noncoding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *Mol Pharmacol.* 2010;78(1):19–28.
153. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 1988;54(6):787–93.
154. Coccia EM, Cicala C, Charlesworth A, Ciccarelli C, Rossi GB, Philipson L, et al. Regulation and expression of a growth arrest-specific gene (gas5) during growth, differentiation, and development. *Mol Cell Biol.* 1992;12(8):3514–21.
155. Smith CM, Steitz JA. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol.* 1998;18(12):6897–909.
156. Mourtada-Maarabouni M, Hedge VL, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT. Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *J Cell Sci.* 2008;121(7):939–46.
157. Yin D, He X, Zhang E, Kong R, De W, Zhang Z. Long noncoding RNA GAS5 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Med Oncol.* 2014;31(11):253.
158. Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Kong R, Chen F, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Mol Carcinog.* 2015;54(S1):E1–12.
159. Sun M, Jin F yan, Xia R, Kong R, Li J hai, Xu T peng, et al. Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer.* 2014;
160. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer.

- Oncogene. 2009;
161. Tao R, Hu S, Wang S, Zhou X, Zhang Q, Wang C, et al. Association between indel polymorphism in the promoter region of lncRNA GAS5 and the risk of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2015;
 162. Ma C, Shi X, Zhu Q, Li Q, Liu Y, Yao Y, et al. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5): a pivotal tumor suppressor long noncoding RNA in human cancers. *Tumor Biology*. 2016.
 163. Pickard MR, Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis Dis*. 2013;1832(10):1613–23.
 164. Yacqub-Usman K, Pickard MR, Williams GT. Reciprocal regulation of GAS5 lncRNA levels and mTOR inhibitor action in prostate cancer cells. *Prostate*. 2015;75(7):693–705.
 165. Dong S, Qu X, Li W, Zhong X, Li P, Yang S, et al. The long non-coding RNA, GAS5, enhances gefitinib-induced cell death in innate EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma cells with wide-type EGFR via downregulation of the IGF-1R expression. *J Hematol Oncol [Internet]*. 2015;8(1):1–13. Available from: ???
 166. Laurent LC, Abdel-Mageed AB, David Adelson P, Arango J, Balaj L, Breakefield X, et al. Meeting report: Discussions and preliminary findings on extracellular RNA measurement methods from laboratories in the NIH Extracellular RNA Communication Consortium. *J Extracell Vesicles*. 2015;
 167. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;
 168. R Core Team. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical

- computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org/>. 2017;R Foundation for Statistical Computing.
169. Tan Q, Zuo J, Qiu S, Yu Y, Zhou H, Li N, et al. Identification of circulating long non-coding RNA GAS5 as a potential biomarker for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int J Oncol*. 2017;50(5):1729–38.
170. Kamel LM, Atef DM, Mackawy AMH, Shalaby SM, Abdelraheim N. Circulating long non-coding RNA GAS5 and SOX2OT as potential biomarkers for diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. *Biotechnol Appl Biochem*. 2019;
171. Wu Y, Lyu H, Liu H, Shi X, Song Y, Liu B. Downregulation of the long noncoding RNA GAS5-AS1 contributes to tumor metastasis in non-small cell lung cancer. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6(March):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep31093>
172. Dong L, Li G, Li Y, Zhu Z. Upregulation of Long Noncoding RNA GAS5 Inhibits Lung Cancer Cell Proliferation and Metastasis via miR-205/PTEN Axis. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2019;25:2311.
173. Mott TF. Lung Cancer: Management. *FP Essent*. 2018/01/10. 2018;464:27–30.
174. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2004;
175. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, González-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;
176. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine

plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;352(25):2589–97.

177. Yoon SM, Shaikh T, Hallman M. Therapeutic management options for stage III non-small cell lung cancer. *World Journal of Clinical Oncology.* 2017.
178. Pöttgen C, Eberhardt W, Stamatis G, Stuschke M. Definitive radiochemotherapy versus surgery within multimodality treatment in stage III non-small cell lung cancer (NSCLC) - a cumulative meta-analysis of the randomized evidence. *Oncotarget.* 2017.

Spisak tabela

Tabela 1. TNM stejdžing 8. revizija – T deskriptor	18
Tabela 2. TNM stejdžing 8. revizija – N deskriptor.....	20
Tabela 3. TNM stejdžing 8. revizija – M deskriptor	21
Tabela 4. Stadijumi ne-sitnoćelijskog tumora pluća prema 8. reviziji TNM klasifikacije	23
Tabela 5. Uperedni prikaz karakteristika tradicionalne otvorene (torakotomije) i VATS minimalno invazivne operacije.	25
Tabela 6. Identifikovane nekodirajuće RNK i njihova povezanost sa različitim tumorima* (1) 38	
Tabela 6. Identifikovane nekodirajuće RNK i njihova povezanost sa različitim tumorima* (2) 39	
Tabela 7. Duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija povećana kod karcinoma pluća* (1)	40
Tabela 8. Duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija povećana kod karcinoma pluća* (2)	41
Tabela 9. Duge nekodirajuće RNK čija je ekspresija smanjena kod karcinoma pluća	42
Tabela 10. Uloga GAS5 u različitim karcinomima (prilagođeno iz Ma et. al 2005).....	46
Tabela 11. Protokol za pripremu uzoraka	49
Tabela 12. Protokol za izolaciju RNK (1).....	50
Tabela 12. Protokol za izolaciju RNK (2).....	50
Tabela 13. Protokol za reverznu transkripciju	51
Tabela 14. Opšte karakteristike učesnika u studiji	56
Tabela 15. Karakteristike pacijenata ukupno i po polu.....	60
Tabela 16. Karakteristike pacijenata ukupno i u odnosu na stadijum bolesti.	65
Tabela 17. Gas5 ekspresija ukupno i u zavisnosti od pripadnosti grupi pacijenata ili kontrola 69	
Tabela 18. GAS5 ekspresija u odnosu na stadijum bolesti kod pacijenata	70
Tabela 19. GAS5 ekspresija u odnosu na T stadijum bolesti kod pacijenata.....	72
Tabela 20. GAS5 ekspresija u odnosu na N stadijum bolesti kod pacijenata	77
Tabela 21. GAS5 ekspresija u odnosu na M stadijum bolesti kod pacijenata	77

Spisak slika

Slika 1. Primarni uzrok smrti od tumora kod muškaraca	3
Slika 2. Primarni uzrok smrti od tumora kod žena.....	3
Slika 3. Rang uzroka smrti (stopa na 100.000 stanovnika) po MKB 10 grupama, Srbija, 2018. godina	4
Slika 4. Standardizovana incidencija i mortalitet od karcinoma na 100.000 stanovnika, centralna Srbija, 1990-2015. godina	5
Slika 5. Standardizovane stope mortaliteta od vodećih lokalizacija karcinoma na 100.000 stanovnika, muškarci, centralna Srbija, 1990-2015. godina	5
Slika 6. Standardizovane stope mortaliteta od vodećih lokalizacija karcinoma na 100.000 stanovnika, žene, centralna Srbija, 1990-2015. godina.....	6
Slika 7. Vodeće lokalizacije u umiranju od malignih tumora kod muškaraca, centralna Srbija, 2015	6
Slika 8. Vodeće lokalizacije u umiranju od malignih tumora kod žena, centralna Srbija, 2015.	7
Slika 9. Maligni tumor bronhija i pluća po starosnim grupama, ukupno i po polu, 2018. godina	8
Slika 10. Udeo muškaraca i žena u umiranju od malignih tumora bronhija i pluća po starosnim grupama, 2018. godina	8
Slika 11. Adenokarcinom pluća	8
Slika 12. Skvamocelularni karcinom pluća.....	9
Slika 13. Sitnoćelijski karcinom pluća.....	10
Slika 14. Radiografija pacijenta sa karcinomom pluća	12
Slika 15. Kompjuterizovana tomografija grudnog koša pacijenta sa karcinomom pluća	13
Slika 16. Magnetna rezonanca grudnog koša pacijenta sa karcinomom pluća	14
Slika 17. Scintigrafija skeleta (izvor: www.wikipedia.org)	15
Slika 18. Tipovi dugih nekodirajućih RNK	35
Slika 19. Uloge i putevi delovanja dugih nekodirajućih RNK.....	36
Slika 20. Reverzna transkripcija (izvor: www.thermofisher.com).....	52
Slika 21. Distribucija učesnika u studiji po polu.....	55
Slika 22. Distribucija učesnika u studiji po godinama	57
Slika 23. Odnos pušača i nepušača u studiji.....	58
Slika 24. Odnos pušača i nepušača u okviru pacijenata prema polu.....	59
Slika 25. Distribucija starosti pacijenata prema polu	61
Slika 26. Dijametar tumora prema polu	62
Slika 27. Stadijum bolesti u odnosu na pol	63
Slika 28. GAS5 ekspresija među pacijentima prema polu	63
Slika 29. Distribucija pacijenata po stadijumima bolesti	64
Slika 30. Distribucija pacijenata prema polu u okviru stadijuma bolesti.....	66
Slika 31. Distribucija starosti pacijenata prema stadijumu bolesti.....	66
Slika 32. Pušački status u okviru stadijuma bolesti kod pacijenata	67
Slika 33. Distribucija dijametara tumora u odnosu na stadijum bolesti.....	68
Slika 34. Učestalost nivoa ekspresije GAS5 kod pacijenata i kontrola	69
Slika 35. GAS5 ekspresija u četiri stadijuma bolesti	71
Slika 35a. GAS5 ekspresija u četiri stadijuma bolesti	71
Slika 36. GAS5 ekspresija u zavisnosti od T klase	73
Slika 36a. GAS5 ekspresija u zavisnosti od T klase	74
Slika 37. GAS5 ekspresija u zavisnosti od N klase.....	75
Slika 37a. GAS5 ekspresija u zavisnosti od N klase.....	76
Slika 38. GAS5 ekspresija u zavisnosti od M klase.....	78

Slika 38a. GAS5 ekspresija u zavisnosti od M klase	79
Slika 39. GAS5 ekspresija u odnosu na EGFR status	80
Slika 39a. GAS5 ekspresija u odnosu na EGFR status	80
Slika 40. ROC kriva pacijenti-kontrole.....	81
Slika 41. ROC kriva kontrole-III stadijum bolesti	82
Slika 42. ROC kriva kontrole-III stadijum bolesti	83
Slika 43. ROC kriva kontrole-III i IV stadijum bolesti.....	84
Slika 44. GAS5 ekspresija u odnosu na tip karcinoma	85

Spisak skraćenica

AJCC	American Joint Committee on Cancer
cDNK	Komplementarna DNK
CT/KT	Kompjuterizovana tomografija
EBUS	Endobronhijalni ultrazvuk
EGFR	Epidermal growth factor receptor – Receptor epidermalnog faktora rasta
ENDS	Electronic nicotine delivery systems
GAS5	Growth arrest-specific transcript 5
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
KBC	Kliničko bolnički centar
lncRNA	Long non-coding RNA – Duga nekodirajuća RNK
MKB	Međunarodna klasifikacija bolesti
MR	Magnetna rezonanca
mRNK	Messenger RNK
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma – nesitnoćelijski karcinom pluća
PET	Pozitron emisiona tomografija
qPCR	Kvantitativni PCR
RQ	Relativna količina
RT	Reverzna transkriptaza
SAD	Sjedinjene Američke Države
SCLC	Small cell lung carcinoma – sitnoćelijski karcinom pluća
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TEMLA	Transcervikalna ekstenzivna medijastinoskopska limfadenektomija
TNM	Tumor-Nodus-Metastaza sistem za stejdžing
USPSTF	U.S. Preventive Services Task Force
VAMLA	Video asistirana medijastinoskopska limfadenektomija
VATS	Video-asistirana torakoskopija
VOC	Volatile organic compounds

Biografija autora

Rodjena 12.02.1964. god. Djurakovac, Peć.

Osnovnu školu i Matematičku gimnaziju završila u Beogradu.

Medicinski fakultet u Prištini završila sa prosečnom ocenom 8.75 (osam sedamdeset pet).

Specijalizaciju iz grudne hirurgije završila i položila 2000. god. sa odličnom ocenom - Medicinski fakultet u Beogradu.

Magistrirala 2010. god. sa temom „Uzroci nastanka bronhopleuralnih fistula i njihov klinički značaj” – Medicinski fakultet Beograd.

Od 1991. do 2000. god radila na odeljenju grudne hirurgije KC Priština.

Od 2000. do 2010. god bila u stalnom radnom odnosu na odeljenju grudne hirurgije KBC Bežanijska Kosa.

Trenutno radi na Klinici za grudnu hirurgiju VMA.

Autor i koautor oko trideset naučnih radova.

Prilog 1.

7 Izjava o autorstvu

Potpisana dr Nataša Vešović _____

broj upisa _____

Izjavljujem


da je doktorska disertacija pod naslovom

Dijagnostički i prognostički značaj nivoa duge nekodijarajuće RNK Gas5 u plazmi pacijenta obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 23.11.2020. godine

Potpis doktoranda



Prilog 2.

8 Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nataša Vešović

Broj upisa _____

Studijski program pulmologija

Naslov rada Dijagnostički i prognostički značaj nivoa duge nekodijarajuće RNK Gas5 u plazmi pacijenta obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća

Mentor prof dr Dragana Jovanović

Potpisani _____

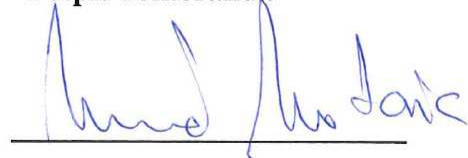
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 23.11.2020. godine

Potpis doktoranda



Prilog 3.

9 Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dijagnostički i prognostički značaj nivoa duge nekodijarajuće RNK Gas5 u plazmi pacijenta obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

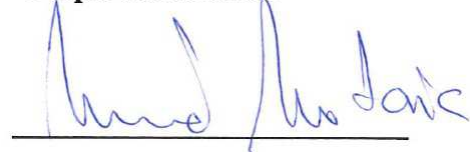
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 23.11.2020. godine

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

