

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena Ostojić

**Prognostičko značenje izraženosti
proteina NEDD9 u transbronhalnim
bioptatima u bolesnika s
karcinomom pluća**

DOKTORSKI RAD



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jelena Ostojić

**Prognostičko značenje izraženosti
proteina NEDD9 u transbronhalnim
bioptatima u bolesnika s
karcinomom pluća**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sven Seiwert

Svome mentoru prof. dr. sc. Svenu Seiwertu toplo zahvaljujem na ukazanom povjerenju, beskrajnom strpljenju i svesrdnoj pomoći bez kojih uspješan završetak ovog rada ne bi bio moguć.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Karcinom pluća..... | 1 |
| 1.1.1. Definicija..... | 1 |
| 1.1.2. Epidemiologija | 1 |
| 1.1.3. Etiologija | 2 |
| 1.1.4. Patologija..... | 5 |
| 1.1.5. Stadiji proširenosti bolesti | 15 |
| 1.1.6. Klinička slika..... | 18 |
| 1.1.7. Dijagnostički postupci..... | 19 |
| 1.1.8. Liječenje karcinoma pluća | 20 |
| 1.1.8.1. Imunoterapija nesitnostaničnog karcinoma pluća..... | 22 |
| 1.2. Molekularni mehanizmi karcinoma pluća | 23 |
| 1.2.1. Genetske promjene | 23 |
| 1.2.2. Onkogeni i signalni putevi stimulacije rasta | 24 |
| 1.2.2.1. Signalni put receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR)..... | 24 |
| 1.2.2.2. Signalni put RAS/RAF/MEK/MAPK/MYC | 25 |
| 1.2.2.3. Signalni put PI3K/AKT | 26 |
| 1.2.2.4. NKX2-1 (TTF1) – tkivno specifični onkogen | 26 |
| 1.2.2.5. Fuzijske bjelančevine ALK | 27 |
| 1.2.2.6. Amplifikacija FGFR1 | 28 |
| 1.2.3. Tumorsko-supresorski geni i putevi inhibicije tumorskog rasta | 28 |
| 1.2.3.1. Tumorsko-supresorska bjelančevina p53 | 28 |
| 1.2.3.2. Signalni put CDKN2A/RB | 29 |
| 1.2.3.3. Tumorsko-supresorski geni kromosoma 3p..... | 29 |

| | |
|---|-----|
| 1.2.3.4. Signalni put LKB1 | 29 |
| 1.2.4. Epigenetske promjene | 29 |
| 1.2.4.1. Regulacija posredovana mikroribonukleinskim kiselinama (miRNA)..... | 30 |
| 1.2.4.2. Signalni putevi Notch, Hedgehog i Wnt..... | 30 |
| 1.3. Epitelno-mezenhimska tranzicija: raskrižje razvoja i maligne transformacije..... | 32 |
| 1.3.1. Bjelančevina NEDD9 | 33 |
| 1.3.1.1. NEDD9 u glioblastomu | 35 |
| 1.3.1.2. NEDD9 u melanomu | 35 |
| 1.3.1.3. NEDD9 u karcinomu dojke | 36 |
| 1.3.1.4. NEDD9 u karcinomu želuca i kolorektalnom karcinomu | 36 |
| 1.3.1.5. NEDD9 u karcinomu pluća | 37 |
| 2. HIPOTEZA..... | 38 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... | 39 |
| 3.1. Opći cilj istraživanja | 39 |
| 3.2. Specifični ciljevi | 39 |
| 4. MATERIJAL I METODE..... | 40 |
| 4.1. Materijal..... | 40 |
| 4.2. Metode | 40 |
| 4.2.1. Statističke metode | 41 |
| 5. REZULTATI..... | 43 |
| 6. RASPRAVA..... | 71 |
| 7. ZAKLJUČCI..... | 80 |
| 8. SAŽETAK..... | 81 |
| 9. SUMMARY | 82 |
| 10. LITERATURA..... | 83 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 103 |

1. UVOD

1.1. Karcinom pluća

1.1.1. Definicija

Karcinom pluća objedinjuje zloćudne tumore nastale iz epitelnih stanica bronha, bronhiola i alveola i predstavlja najčešće sjelo maligne bolesti kod muškaraca, a među ženama je na visokom trećem mjestu.¹ Najčešći je uzrok smrti među svim malignim bolestima.²

1.1.2. Epidemiologija

Karcinom pluća je svjetski javnozdravstveni problem epidemijskih razmjera. Među četiri najčešća maligna tumora koji obuhvaćaju čak 42% svih neoplazmi, karcinom pluća je učestalošću ispred karcinoma kolorektuma, ženske dojke i prostate. Godine 2012. je u svijetu dijagnosticiran kod 1.8 milijuna novih bolesnika (12.9% ukupne incidencije malignih tumora). Najviša incidencija bilježi se u zemljama Srednje i Istočne Europe te Istočnoj Aziji: Mađarska ima najvišu stopu incidencije od 51.6 na 100.000 stanovnika, slijede ju Srbija, Južna Koreja, SAD na osmom, a Kina na 14. mjestu.² Prema posljednjim procjenama iz 2012. godine, karcinom pluća je najčešći tumor muške populacije zahvaćajući 1.2 milijuna ljudi (16.7% ukupnog broja muškaraca oboljelih od malignih neoplazmi). Incidencija je niža kod žena uz nešto drugačiju zemljopisnu distribuciju kao odraz rasprostranjenosti pušenja: najviša je incidencija u Sjevernoj Americi (33.8) i Sjevernoj Europi (23.7). Kako je već spomenuto, najčešći je uzrok smrti među malignim bolestima: godine 2012. od karcinoma pluća je u svijetu umrlo 1.59 milijuna ljudi.³

Učestalost adenokarcinoma u odnosu na ostale tipove karcinoma pluća kontinuirano se povećava, posebice od 2000. godine do danas,⁴ čak i u nepušačkoj populaciji.⁵

Između 1990. i 2011. godine u Velikoj Britaniji zabilježeno je smanjenje incidencije karcinoma pluća kod muškaraca, dok se incidencija kod žena paralelno s proširenom navikom pušenja povećava, te je tijekom protekla dva desetljeća omjer incidencije po spolu s 3:1 dramatično smanjen na 3:2. Također, tijekom prethodna dva desetljeća zabilježen je pad mortaliteta među muškarcima s 85 na 100.000 1990. godine na 46 na 100.000 2011., a kod žena je blago porastao s 29 na 30 na 100.000.⁶

U Hrvatskoj je prema posljednjim podacima Registra za rak pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo za 2013. godinu među novootkrivenim malignim tumorima karcinom pluća kod muškaraca bio na prvom mjestu (19% svih slučajeva), a kod žena na drugom (8% novootkrivenih tumora), odmah nakon karcinoma dojke. Pritom karcinom pluća postaje najčešći tumor muškaraca nakon 40. godine života, a kod žena doseže drugo mjesto nakon 50. godine života.⁷

1.1.3. Etiologija

Etiologija karcinoma pluća je vrlo složena, no pušenje cigareta je svakako najvažniji rizični čimbenik. U Sjedinjenim Američkim Državama oko 80% smrti od karcinoma pluća izravno je povezano s pušenjem cigareta. Također, incidencija karcinoma pluća diljem svijeta odražava rasprostranjenost navike pušenja. Primjerice, nedavni iznimni porast broja pušača u Kini doprinijet će značajno svjetskoj prevalenciji karcinoma pluća u 21. stoljeću: ondje je dnevna potrošnja cigareta porasla s jedne tijekom 1952. godine preko četiri dnevno popušene cigarete 1972. na deset 1992. godine, a danas je trend pušenja poprimio razmjere slične najvećima ikad zabilježenim u razvijenim zemljama. U Kini je već zabilježen porast broja oboljelih od karcinoma pluća, a ne treba zaboraviti da tu zemlju nastanjuje čak 19% svjetske populacije.⁸ Pretpostavlja se da će Kinezi 2050. godine činiti trećinu svjetskih pušača uz tri milijuna smrtnih ishoda godišnje uzrokovanih pušenjem.⁹

Brzi porast incidencije karcinoma pluća tijekom posljednjih stotinu godina paralelan je s razvojem duhanske industrije i kreiranjem cigareta s filterima, različitim udjelima katrana i širokim rasponom okusa: primjerice, u SAD je odobreno čak 599 duhanskih aditiva.

Među više od 7000 kemijskih spojeva u duhanskom dimu potvrđeno je sedamdesetak potentnih karcinogena¹⁰, među njima nitrozamin 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (tzv. NNK) i niz policikličkih aromatskih ugljikovodika, primjerice 3,4-benzpiren, koji induciraju nastanak mutacija K-ras protoonkogeno i p53 tumorskog supresorskog gena. Njima je u eksperimentalnim uvjetima kod miševa moguće izazvati primarni plućni adenokarcinom.¹¹

U šesnaestom stoljeću europski muškarci su počeli pušiti duhan lulama, kasnije cigarama ili ga ušmrkavali, no tek pronalaskom strojeva za izradu cigareta u drugoj polovici devetnaestog stoljeća omogućena je masovna potrošnja duhana. Pušenje cigareta je 1919. godine nadraslo sve druge načine uživanja duhana. Do sredine prošlog stoljeća potrošnja duhana u zapadnom

svijetu je kontinuirano rasla, posebice tijekom svjetskih ratova, te je primjerice 1948. godine duhan uživalo čak 82% Britanaca.¹²

Karcinom pluća je u devetnaestom stoljeću bio iznimno rijetka bolest. U samo 1% svih obdukcijских nalaza malignih tumora 1878. godine na Institutu za patologiju drezdenkog sveučilišta utvrđen je plućni karcinom, ali do 1927. godine ta se brojka povećala na više od 14%.

Franz Lickint je 1929. godine eksperimentalno dokazao da psi izloženi duhanskom dimu obolijevaju od karcinoma pluća, no u Springerovom udžbeniku specijalne patologije 1930. godine pušenje se tek kratko spominje kao moguć, ali nedokazani rizični čimbenik.

1940. godine njemački liječnik F. H. Müller objavio je članak o svezi zlouporabe duhana i karcinoma pluća.¹³ U Njemačkoj je već 1941. u okviru snažne javnozdravstvene kampanje usmjerene protiv pušenja osnovan na Sveučilištu u Jeni Wissenschaftliches Institut zur Erforschung der Tabakgefahren i 1943. je objavljena epidemiološka studija koja je ukazivala na povezanost karcinoma pluća s pušenjem: od 109 oboljelih, samo su troje bili nepušači. Tad je također skovan i pojam pasivnog pušenja. Pedesetih godina Richard Doll i A. Bradford Hill u časopisu *British Medical Journal*¹⁴ i Cuyler Hammond i Ernest Wynder u časopisu *JAMA*¹⁵ dokazali su povezanost pušenja s nastankom karcinoma pluća, što je 1964. godine i epidemiološki potvrđeno objavom studije pod pokroviteljstvom administracije J. F. Kennedyja. Rezultati višegodišnje analize više od 7000 znanstvenih članaka koji su ukazivali na viši smrtni rizik pušača, rizik od karcinoma pluća, ali i kroničnog bronhitisa i emfizema, koronarne bolesti, također i povećan rizik u trudnoći, objavljeni su u svim medijima te su tako postali dostupni javnosti (*The Reports of the Surgeon General*).¹⁶ Oglašavanje u medijima duhanskim kompanijama je u Sjedinjenim Američkim Državama zabranjeno 1969. godine.

Pušenje cigareta odgovorno je za nastanak 80-90% najčešćih tipova karcinoma pluća: adenokarcinoma, karcinoma pločastih stanica te sitnostaničnog karcinoma.¹⁷

Aktivni pušači imaju 15-30 puta veći rizik obolijevanja od karcinoma pluća od nepušača, pri čemu je rizik proporcionalan ukupnoj izloženosti duhanskom dimu. Kumulativni rizik od karcinoma pluća ovisi o dobi u kojoj je pušenje započelo (kod osoba koje su počele pušiti prije petnaeste godine dvostruko je veći), broju dnevno popušanih cigareta i ukupnoj duljini pušenja: iako je rizik u linearnom odnosu s količinom popušanih cigareta, eksponencijalno se povećava s duljinom pušenja. S druge strane, prestankom pušenja rizik se s vremenom značajno i

progresivno smanjuje, no nikad se sasvim ne izjednačava s rizikom nepušača čime se može objasniti podatak da se u SAD gotovo 50% plućnih karcinoma javlja kod bivših pušača.

Ukupna izloženost pušenju izražava se tzv. pušačkim godinama (*engl. pack/years*), odnosno kvocijentom umnoška broja dnevno popušanih cigareta i godina pušenja s brojem 20 (koji odgovara broju cigareta u kutiji). Tako primjerice osoba koja puši 20 cigareta dnevno tijekom 30 godina puši 30 pušačkih godina i ima 20-60 puta veći rizik za obolijevanje od karcinoma pluća.

Znatno je teže objektivizirati okolišnu izloženost duhanskom dimu, no temeljem kohortnih studija pretpostavlja se da tzv. pasivno pušenje uzrokuje četvrtinu plućnih karcinoma. U Sjedinjenim Američkim Državama svaki su peti odrasli i svako drugo dijete izloženi duhanskom dimu u okolišu.

Među plućnim bolestima koje povećavaju rizik od karcinoma pluća najčešće se spominju kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB), idiopatska plućna fibroza, azbestoza i ostale pneumokonioze te tuberkuloza.^{18,19,20,21}

Povezanost kronične opstruktivne plućne bolesti i karcinoma pluća dokazana je brojnim epidemiološkim studijama. Pušači koji boluju od KOPB-a imaju dvostruko do čak peterostruko povećan rizik za karcinom pluća u odnosu na pušače s urednom plućnom funkcijom. Kako protuupalno liječenje KOPB-a utječe na razvoj maligne bolesti zasad nije poznato. S druge strane, moguće je da KOPB nije neovisni rizični čimbenik za karcinom, već samo jedna od često pridruženih bolesti sa zajedničkim rizičnim čimbenikom.

Također, pridružena kronična opstruktivna plućna bolest pogoršava prognozu karcinoma pluća.²²

Dugotrajnoj izloženosti radonu, inertnom plinu koji nastaje raspadom urana u tlu i vodi pripisuje se u Sjedinjenim Američkim Državama godišnje 20.000 smrtnih ishoda karcinoma pluća (nakon pušenja na drugom je mjestu među rizičnim čimbenicima). Također, nedvojbeno je dokazana povezanost karcinoma pluća s ekspozicijom azbestu ovisna o dozi, pri čemu je uobičajeno razdoblje latencije oko tri desetljeća, slično kao i za mezoteliom.^{23,24}

Među potencijalne karcinogene ubrajaju se i nikal, kobalt, kadmij i krom, arsen, cink, sulfatni spojevi u zraku te svakako ranije spomenuti policiklički ugljikovodici u ispušnim plinovima motornih vozila, ionizirajuće zračenje.²⁵

Podaci o učincima nedostatnog dnevnog unosa voća i povrća, odnosno mikronutrijenata poput retinoida, karotenoida ili vitamina C i D potječu iz brojnih studija, no nisu nedvojbeno dokazani.^{26,27}

Inverzna korelacija rizika od karcinoma pluća i nedovoljnog dnevnog unosa folne kiseline najznačajnije je izražena uz pridruženi kronični etilizam i pušenje te isto obiteljsku anamnezu karcinoma pluća. Deficit folata povezan je s koronarnom, cerebrovaskularnom bolešću i malignim tumorima. U uvjetima hipometilacije i manjkavog popravka DNA manjak folata odgovoran je za oštećenja DNA u mitotski aktivnim stanicama.²⁸

Genetska osnova predispozicije za obolijevanje od karcinoma pluća proučavana je ekstenzivno, i dosad je identificiran niz polimorfizama gena čiji produkti sudjeluju u reguliranju metabolizma karcinogena duhanskog dima, supresiji novonastalih mutacija i popravku DNA, no njihovo je funkcijsko značenje u nastanku karcinoma još uvijek nejasno. Nedavno su identificirana tri različita lokusa povezana s karcinomom pluća: 5p15.33, 6p21 i 15q24-25.1 tzv. GWA studijama (*engl. Genome-Wide Association Studies*). Kromosomska regija 15q25 sadrži gene koji kodiraju podjedinice nikotinskog receptora i sudjeluju u nastanku nikotinske ovisnosti. S druge strane, produkt regije 5p15.33 povezan je s povišenim rizikom za brojne maligne tumore, također i adenokarcinom pluća, i tek je slabo uvjetovan pušenjem. Regije 6q23-25 i 13q31.3 odnedavno su također povezane s rizikom karcinoma pluća, posebice u ljudi koji nikad nisu pušili.²⁹ Za sagledavanje cjelovitog kompleksnog procesa nastanka karcinoma bronha i pluća nužno je međutim uvažiti postojanje brojnih, međusobno različitih molekularnih puteva, djelovanje okolišnih čimbenika – posebice kod nepušača, zemljopisne i spolne različitosti, dob pojave tumora, promjenjivu penetraciju različitih gena te mehanizme popravka nastalih oštećenja.

1.1.4. Patologija

Više od 99% malignih tumora pluća su karcinomi. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2004. godine karcinom pluća se dijelio na dvije velike skupine tumora: sitnostanične (*eng. small cell lung cancer, SCLC*) i nesitnostanične (*engl. non-small cell lung cancer, NSCLC*), pri čemu su nesitnostanični karcinomi obuhvaćali adenokarcinom, karcinom pločastih stanica i velikostanični karcinom te podskupinu preostalih, znatno rjeđe zastupljenih tumora.

Iako je ranije najčešći histološki tip karcinoma pluća bio pločasti karcinom, u zemljama razvijenog svijeta od osamdesetih godina prošloga stoljeća trajno raste incidencija adenokarcinoma koji se češće javlja kod bivših pušača, žena, periferno smješten i dulje je klinički nijem, a danas predstavlja gotovo polovicu svih karcinoma pluća.³⁰ Zbog iznimno širokog patološkog, molekularnog, kliničkog i radiološkog spektra obuhvaćenog terminom adenokarcinoma pluća iz kojeg izvire različita prognoza i odgovor na terapijske protokole nastala je potreba za klinički primjenjivom klasifikacijom adenokarcinoma. Upravo zbog naglaska na kliničku primjenjivost 2011. godine su kao rezultat međunarodne multidisciplinarnе suradnje triju udruženja, IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), ATS (American Thoracic Society) i ERS (European Respiratory Society) donesene preporuke o reklasifikaciji adenokarcinoma pluća koje se ne odnose samo na resecirane tumore, već i uzorke transbronhalnih bioptata i uzoraka obrisaka bronha i bronhalnih aspirata, odnosno transtorakalnih iglenih punkcija za citološku analizu, što je iznimno važno u kontekstu rastućeg broja tumora smeštenih u tzv. intermedijarnoj zoni ili u perifernim regijama pluća (tablice 1 i 2).³¹ Naime, oko 70% karcinoma pluća dijagnosticira se u uzorcima transbronhalnih bioptata i citološkim uzorcima obrisaka četkicom i/ili bronhalnih aspirata.

Novouvedeni su termini adenokarcinoma *in situ* (AIS) i minimalno invazivnog adenokarcinoma (MIA), a dijagnoze bronhioloalveolarnog karcinoma i miješanog podtipa adenokarcinoma se više ne koriste. Termin bronhioloalveolarnog karcinoma (*engl. broncholoalveolar carcinoma, BAC*) uključivao je do tada široki spektar tumora od malenih, solitarnih i neinvazivnih tumora ili adenokarcinoma s minimalnom invazijom čije je petogodišnje preživljenje 100%, pa sve do uznapredovale metastatske bolesti s vrlo lošom prognozom. Kod prijašnjeg miješanog podtipa adenokarcinoma nalaže se semikvantitativna analiza obrazaca tumorskog rasta uz određivanje prevladavajućeg uzorka.

Nespecificiranu dijagnozu nesitnostaničnog karcinoma bi trebalo izbjegavati kad god je to moguće. Nadalje, adenokarcinom ili nesitnostanični karcinom koji nije drugačije specificiran potrebno je testirati na mutacije epidermalnog epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) obzirom na visoku prediktivnu vrijednost odgovora na liječenje inhibitorima tirozinske kinaze. Osim toga, bolesnici s adenokarcinomom kandidati su za liječenje pemetreksedom ili bevazicumabom koji nisu indicirani u liječenju karcinoma pločastih stanica zbog nedostatne učinkovitosti pemetrekse, odnosno opasnosti od životno ugrožavajućih krvarenja uz bevazicumab, monoklonsko protutijelo na čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF).

Poseban je naglasak na molekularnim, imunohistokemijskim i histokemijskim bojanjima, tj. nedvojbenu određivanju histoloških podtipova adenokarcinoma.

Tablica 1 Reklasifikacija adenokarcinoma pluća u reseciranim uzorcima prema preporukama IASLC/ATS/ERS iz 2011. godine

preinvazivne lezije

- atipična adenomatozna hiperplazija
- adenokarcinom in situ (≤ 3 cm ranijeg BAC)

nemucinozni

mucinozni

miješani nemucinozni/mucinozni

minimalno invazivni adenokarcinom (≤ 3 cm dominantno lepidičkog rasta, < 5 mm invazije)

- nemucinozni
 - mucinozni
 - miješani nemucinozni/mucinozni
-

invazivni adenokarcinom

- dominantno lepidički (raniji nemucinozni BAC, > 5 mm invazije)
 - dominantno acinarni
 - dominantno papilarni
 - dominantno mikropapilarni
 - dominantno solidni s produkcijom sluzi
-

inačice invazivnog adenokarcinoma

- invazivni mucinozni adenokarcinom (raniji mucinozni BAC)
 - koloidni
 - fetalni (niskog i visokog stupnja)
 - enterički
-

Tablica 2 Reklasifikacija adenokarcinoma pluća u transbronhalnim bioptatima ili citološkim uzorcima prema preporukama IASLC/ATS/ERS iz 2011. godine

| klasifikacija prema SZO 2004. god. | klasifikacija prema IASLC/ATS/ERS iz 2011. god. |
|--|---|
| ADENOKARCINOM | jasno prisutni morfološki uzorci adenokarcinoma: |
| <ul style="list-style-type: none"> • miješani podtip • acinarni • papilarni • solidni | adenokarcinom, opisati sve uzorke koje je moguće identificirati (uključujući mikropapilarni uzorak koji nije uključen u podjeli iz 2004.g.) isključivo lepidički rast: napomena da se ne može isključiti invazivna komponenta zbog veličine uzorka |
| bronhioloalveolarni karcinom (nemucinozni) | adenokarcinom s lepidičkim uzorkom (isključivo lepidički rast: napomeni da se ne može isključiti invazivna komponenta zbog veličine uzorka) |
| bronhioloalveolarni karcinom (mucinozni) | mucinozni adenokarcinom (opisati uzorke) |
| fetalni | adenokarcinom s fetalnim uzorkom |
| mucinozni (koloidni) | adenokarcinom s koloidnim uzorkom |
| sa stanicama tipa prstena pečatnjaka | adenokarcinom s: (opisati prisutne uzorke) i stanicama tipa prstena pečatnjaka |
| svijetlostanični | adenokarcinom s:(opisati prisutne uzorke) i svijetlim stanicama |
| bez paralele 2004. – većinom solidni adenokarcinomi | bez morfoloških uzoraka adenokarcinoma (potvrđeno specifičnim protutijelima): NSCLC, vjerojatno adenokarcinom |
| KARCINOM PLOČASTIH STANICA | |
| <ul style="list-style-type: none"> • papilarni • svijetlih stanica • sitnih stanica • bazaloidni | nedvojbeno prisutni morfološki obrasci pločaste diferencijacije: karcinom pločastih stanica |

Tablica 2 Reklasifikacija adenokarcinoma pluća u transbronhalnim bioptatima ili citološkim uzorcima prema preporukama IASLC/ATS/ERS iz 2011. godine

| | |
|--|---|
| bez paralele u podjeli iz 2004. | bez morfoloških obrazaca pločaste diferencijacije (potvrđeno specifičnim protutijelima): NSCLC, vjerojatno karcinom pločastih stanica |
| SITNOSTANIČNI KARCINOM | sitnostanični karcinom |
| VELIKOSTANIČNI KARCINOM | NSCLC, NOS |
| velikostanični neuroendokrini karcinom (LCNEC) | NSCLC s neuroendokrinom (NE) morfologijom (pozitivni NE biljezi), moguć LCNEC |
| velikostanični karcinom s neuroendokrinom morfologijom (LCNEM) | NSCLC s neuroendokrinom (NE) morfologijom (negativni NE biljezi) |
| ADENOSKVAMOZNI KARCINOM | NSCLC sa adeno i pločastom diferencijacijom |
| bez paralele u podjeli iz 2004. | NSCLC, NOS |
| sarkomatoidni karcinom | slabodiferencirani NSCLC sa vretenastim i/ili gigantocelularnim karcinomom |

Temeljem spomenute klasifikacije adenokarcinoma pluća iz 2011. godine triju udruženja IASLC, ATS i ERS, 2015. godine Svjetska zdravstvena organizacija donijela je novu klasifikaciju tumora pluća čije su najvažnije novine u odnosu na prethodnu klasifikaciju iz 2004. godine: široka uporaba imunohistokemijskih metoda za sve, pa i resecirane tumore, naglasak na molekularnom testiranju, usvajanje klasifikacije malih bioptata i citoloških uzoraka iz 2011. godine kao i potpuno novi pristup klasifikaciji adenokarcinoma sukladno preporukama iz 2011. god., ograničavanje dijagnoze velikostaničnog karcinoma samo na resecirane tumore, reklasifikacija pločastih karcinoma u keratinizirajuće, nekeratinizirajuće i bazaloidne tumore, grupiranje neuroendokrinih tumora u zajedničku skupinu te uvrštenje novih vrsta tumora poput tumora podrijetla perifernih vaskularnih endotelnih stanica ili tumora ektopičnog podrijetla.³² Klasifikacija je u cijelosti prikazana tablicom 3.

Tablica 3 Klasifikacija tumora pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine

| Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) | Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) |
|--|---|---|---|
| Epitelni tumori | | Papilom | |
| Adenokarcinom | 8140/3 | Papilom pločastih stanica | 8052/0 |
| Lepidički adenokarcinom | 8250/3 | Egzofitični | 8052/0 |
| Acinarni adenokarcinom | 8551/3 | Invertirani | 8053/0 |
| Papilarni adenokarcinom | 8260/3 | Glandularni | 8260/0 |
| Mikropapilarni adenokarcinom | 8265/3 | Miješani pločasti i glandularni papilom | 8560/0 |
| Solidni adenokarcinom | 8230/3 | Adenom | |
| Invazivni mucinozni adenokarcinom | 8253/3 | Sklerozirajući pneumocitom | 8832/0 |
| Miješani invazivni mucinozni i nemucinozni adenokarcinom | 8254/3 | Alveolarni adenom | 8251/0 |
| Koloidni adenokarcinom | 8480/3 | Papilarni adenom | 8260/0 |
| Fetalni adenokarcinom | 8333/3 | Mucinozni cistadenom | 8470/0 |
| Enterički adenokarcinom | 8144/3 | Adenom mukoznih žlijezda | 8480/0 |

Tablica 3 Klasifikacija tumora pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine

| Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) | Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) |
|---|---|--|---|
| Minimalno invazivni adenokarcinom | | Mezenhimalni tumori | |
| Nemucinozni | 8256/3 | Plućni hamartom | 8992/0 |
| Mucinozni | 8257/3 | Hondrom | 9220/0 |
| Preinvazivne lezije | | Perivaskularni epiteloidni tumori (PEC) | |
| Atipična adenomatozna hiperplazija | 8250/0 | Limfangiomeomatoza | 9174/1 |
| Adenokarcinom in situ | | PEC-om, benigni | 8714/0 |
| Nemucinozni | 8250/2 | Tumor svijetlih stanica | 8005/0 |
| Mucinozni | 8253/2 | PEC-om, maligni | 8714/3 |
| Karcinom pločastih stanica | 8070/3 | Kongenitalni peribronhalni miofibroblastični tumor | 8827/1 |
| Keratinizirajući karcinom pločastih stanica | 8071/3 | Difuzna plućna limfangiomatoza | |

Tablica 3 Klasifikacija tumora pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine

| Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) | Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) |
|---|---|---|---|
| Nekeratinizirajući karcinom pločastih stanica | 8072/3 | Upalni miofibroblastični tumor | 8825/1 |
| Bazaloidni karcinom pločastih stanica | 8083/3 | Epiteloidni hemangioendoteliom | 9133/3 |
| Preinvazivna lezija | | Pleuropulmonalni blastom | 8973/3 |
| Karcinom pločastih stanica in situ | 8070/2 | Sinovijalni sarkom | 9040/3 |
| Neuroendokrini tumori | | Sarkom intime plućne arterije | 9137/3 |
| Sitnostanični karcinom | 8041/3 | Plućni miješani sarkom s EWSR1-CREB1 translokacijom | 8842/3 |
| Miješani sitnostanični karcinom | 8045/3 | Mioepitelni tumori | |
| Velikostanični neuroendokrini karcinom | 8013/3 | Mioepiteliom | 8982/0 |
| Miješani velikostanični neuroendokrini karcinom | 8013/3 | Mioepitelni karcinom | 8982/3 |
| Karcinoidni tumori | | Limfohistiocitni tumori | |

Tablica 3 Klasifikacija tumora pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine

| Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) | Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) |
|--|---|--|---|
| Tipični karcinoidni tumor | 8240/3 | Ekstranodalni MALT-limfomi marginalne zone | 9699/3 |
| Atipični karcinoidni tumor | 8249/3 | Difuzni velikostanični limfom | 9680/3 |
| Preinvzivna lezija | | Limfomatoidna granulomatoza | 9766/1 |
| Difuzna idiopatska plućna neuroendokrina hiperplazija | 8040/0 | Intravaskularni B-stanični limfom velikih stanica | 9712/3 |
| Velikostanični karcinom | 8012/3 | Plućna histiocitoza Langerhansovih stanica | 9751/1 |
| Pleomorfni karcinom | 8022/3 | Erdheim-Chesterova bolest | 9750/1 |
| Karcinom vretenastih stanica | 8032/3 | | |
| Gigantocelularni karcinom | 8031/3 | Tumori ektopičnog podrijetla | |
| Karcinosarkom | 8980/3 | Tumori zametnih stanica | |
| Plućni blastom | 8972/3 | Teratom, zreli | 9080/0 |
| Drugi i neklasificirani karcinomi | | Teratom, nezreli | 9080/1 |
| Karcinom nalik limfoepiteliomu | 8082/3 | Intrapulmonalni timom | 8580/ |
| NUT karcinom | 8023/3 | Melanom | 38270/3 |

Tablica 3 Klasifikacija tumora pluća Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine

| Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) | Histološki tip i podtipovi | Oznaka ICDO (International Classification of Diseases for Oncology) |
|---------------------------------|---|----------------------------|---|
| Tumori tipa žlijezda slinovnica | | Meningeom, NOS | 9530/0 |
| Mukoepidermoidni karcinom | 8430/3 | Metastatski tumori | |
| Adenoid-cistični karcinom | 8200/3 | | |
| Epitelno-mioepitelni karcinom | 8562/3 | | |
| Pleomorfni adenom | 8940/0 | | |

1.1.5. Stadiji proširenosti bolesti

Određivanje stadija karcinoma pluća (*engl. staging*) zajedno s histološkom i/ili citološkom dijagnozom preduvjet je određivanja prognoze bolesti i izbora protokola liječenja. Određivanje stadija bolesti uključuje anatomsku lokalizaciju i određivanje veličine primarnog tumora, zahvaćanja limfnih čvorova te prisustva presadnica (metastaza). Na konačnu odluku o izboru liječenja utječu i opće stanje, tzv. performance status bolesnika određen ECOG ili Karnofsky skalom, pridružene bolesti i osobna želja bolesnika.

Međunarodni staging sustav mijenjao se tijekom vremena paralelno s napretkom radioloških tehnika i terapijskih protokola. Najnovija, osma revizija TNM staging sustava (Tumor node metastasis staging system), važeća je od siječnja 2017. godine. Temeljena je na analizi 94,708 bolesnika s nesitnostaničnim karcinomom pluća dijagnosticiranim u razdoblju od 1999. do 2010. godine, među njima čak 41% Azijata. U odnosu na prethodno izdanje dodatno je naglašena važnost deskriptora veličine tumora te su uvedene nove kategorije stadija IA1, IA2 i IA3 odražavajući različitu prognozu i reklasificirani su stadiji IIIC i IV koji je podijeljen u IVA i IVB.³³

Tablica 4 TNM staging sustav karcinoma pluća, 8. revizija: deskriptori primarnog tumora, regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza

T: primarni tumor

- **Tx** – primarni tumor nije moguće utvrditi ili je tumor dokazan prisutnošću malignih stanica u iskašljaju ili bronhalnom aspiratu, ali nije vizualiziran bronhoskopijom ili slikovnim pretragama
- **T0** – nema dokaza primarnog tumora
- **Tis** – karcinom *in situ*
- **T1** – tumor ≤ 3 cm u najvećem promjeru, okružen plućem ili visceralnom pleurom bez bronhoskopski vidljivog širenja proksimalnije od lobarnog bronha
 - **T1a(mi)** - minimalno invazivni adenokarcinom
 - **T1a** - tumor ≤ 1 cm u najvećem promjeru
 - **T1b** - tumor > 1 cm ali ≤ 2 cm u najvećem promjeru
 - **T1c** – tumor > 2 cm ≤ 3 cm u najvećem promjeru

Tablica 5 TNM staging sustav karcinoma pluća, 8. revizija: deskriptori primarnog tumora, regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza

- **T2** – tumor >3 cm ali ≤5 cm u najvećem promjeru ili s bilo kojom od sljedećih značajki: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine, ali bez širenja na karinu, zahvaća visceralnu pleuru ili uzrokuje atelektazu ili opstruktivni pneumonitis koji se proteže do hilusa zahvaćajući dio pluća ili cijelo pluće
 - **T2a** - tumor >3cm ali ≤4 cm u najvećem promjeru
 - **T2b** - tumor >4 cm ali ≤5cm u najvećem promjeru
- **T3** – tumor >5 cm u najvećem promjeru ali ≤7 cm u najvećem promjeru ili je povezan s odvojenim tumorskim čvorom ili više njih u istom režnju kao primarni tumor ili izravno zahvaća torakalnu stijenku (uključujući parijetalnu pleuru i tumore superiornog sulkusa), frenički živac, parijetalni perikard
- **T4** – tumor >7 cm u najvećem promjeru ili je povezan s odvojenim tumorskim čvorom ili više njih u ipsilateralnom režnju u kojem se ne nalazi primarni tumor ili zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: ošit, medijastinum, velike krvne žile, srce, traheju, povratni živac, jednjak, karinu ili tijelo kralješka

N: regionalni limfni čvorovi

- **Nx** – nije moguće procijeniti zahvaćanje regionalnih limfnih čvorova
- **N0** – bez zahvaćanja limfnih čvorova
- **N1** – ipsilateralni peribronhinalni i/ili ipsilateralni hilarni i intrapulmonalni limfni čvorovi, uključujući izravno širenje
- **N2** – ipsilateralni medijastinalni ili subkarinalni limfni čvorovi
- **N3** – kontralateralni medijastinalni ili hilarni limfni čvorovi; ipsi/kontralateralni skalenski ili supraklavikularni limfni čvorovi

M: metastaze

- **M0** – bez udaljenih metastaza
 - **M1** – udaljene metastaze
 - **M1a** – odvojeni tumorski čvor ili više njih u kontralateralnom režnju; pleuralni ili perikardijalni čvor ili više njih ili maligni pleuralni izljev, perikardijalni izljev
 - **M1b** – pojedinačna metastaza izvan toraksa
 - **M1c** – višestruke metastaze izvan toraksa u jednom ili više organa
-

Tablica 6 TNM staging sustav karcinoma bronha i pluća, 8. revizija: stadiji bolesti

| Okultni karcinom | Tx | N0 | M0 |
|-------------------------|-------------|-------------|-----------|
| Stadij 0 | T1a | N0 | M0 |
| Stadij IA1 | T1a(mi) | N0 | M0 |
| | T1a | N0 | M0 |
| Stadij IA2 | T1b | N0 | M0 |
| Stadij IA3 | T1c | N0 | M0 |
| Stadij IB | T2a | N0 | M0 |
| Stadij IIB | T1a-c | N1 | M0 |
| | T2a | N1 | M0 |
| | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Stadij IIIA | T1a-c | N2 | M0 |
| | T2a-b | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| Stadij IIIB | T1a-c | N3 | M0 |
| | T2a-b | N3 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| Stadij IIIC | T3 | N3 | M0 |
| | T4 | N3 | M0 |
| Stadij IVA | bilo koji T | bilo koji N | M1a |
| | bilo koji T | bilo koji N | M1b |
| Stadij IVB | bilo koji T | bilo koji N | M1c |

Sitnostanični karcinom uobičajeno se klasificirao na ograničenu i proširenu bolest, pri čemu su se pod ograničenom bolešću podrazumijevajli tumori ograničeni na hemitoraks s regionalnim limfnim čvorovima, uključujući ipsilateralne supraklavikularne čvorove koji su veličinom pogodni za jedno radijacijsko polje, no sukladno preporukama IASLC od 2007. godine stadij

bolesti određuje se prema TNM klasifikaciji. Također, kirurško liječenje nalaže klasifikaciju po TNM sustavu.

1.1.6. Klinička slika

Karcinom pluća rijetko se očituje simptomima i znakovima prije uznapredovale bolesti, a samo 7-10% bolesnika otkrije se slučajnim radiološkim nalazom u asimptomatskoj fazi.

Centralno smješteni tumori očituju se za dišni sustav specifičnim znakovima – kašljem i hemoptizama, a mogu uzrokovati piskanje, zaduhu, bol u prsima te smetnje ventilacije i recidivirajuće pneumonije iste lokalizacije koje kod pušača uvijek nalažu dopunsku dijagnostičku obradu i praćenje do potpune radiografske rezolucije. Naknadno se od bolesnika često saznaje podatak o promjeni karaktera kašlja i nekoliko mjeseci prije postavljanja dijagnoze, koji je međutim (iako je tipičan alarmantni znak) ocijenjen kao nevažni “pušački kašalj”. Hemoptiza, s druge strane, redovito dovodi bolesnike na žurni pregled, čak i ako postoje tek oskudne primjese krvi u iskašljaju.

Tumori perifernog smještaja, češće adekokarcinomi, dugo su klinički nijemi. Mogu uzrokovati kašalj i napredujuću zaduhu zbog pleuralnog izljeva, bol zbog infiltracije parijetalne pleure ili torakalne stijenke, mišićnu slabost i ispade osjeta zbog infiltracije brahijalnog plexusa. Često se bolesnici prezentiraju bolovima zbog koštanih metastaza ili promjenama ponašanja zbog metastaza u središnjem živčanom sustavu, posebice kod sitnostaničnog karcinoma.

Znakovi lokalnog širenja tumora uključuju sindrom gornje šuplje vene uslijed kompresije, paralizu povratnog laringealnog živca ili freničkog živca, Hornerov sindrom ili kompresijom srednje trećine jednjaka uzrokovanu disfagiju.

Često se javljaju opći, nespecifični znakovi uznapredovale bolesti: kronični umor, anoreksija, mršavljenje i febrilitet.

Bolesnici se nerijetko po prvi puta prezentiraju paraneoplastičkim sindromom, odnosno sustavnim manifestacijama maligne bolesti koje nisu u svezi s metastatskim rasapom. Među najčešće manifestacije paraneoplastičkog sindroma ubrajaju se normocitna anemija, tromboflebitis, duboka venska tromboza, batićasti prsti, hipertrofična osteoartropatija, sindrom neprimjerenog lučenja antidiuretskog hormona i kaheksija.

1.1.7. Dijagnostički postupci

Pristup bolesniku s nedokazanim karcinomom pluća uključuje iscrpnu anamnezu kojom je potrebno ciljano saznati o eventualnoj pojavi karcinoma bronha i pluća kod bolesnikovih roditelja ili braće i sestara, rizičnim čimbenicima, prijašnjim ili pridruženim plućnim bolestima, tumorima glave i vrata ili ostalih lokalizacija, detalje o sadašnjoj bolesti te potom detaljni klinički pregled i laboratorijsku obradu, konvencionalne Rtg snimke pluća u dvije projekcije, elektrokardiogram i ispitivanje plućne funkcije, kompjutorsku tomografiju (CT) toraksa i gornjeg abdomena s intravenskim kontrastom (ili umjesto CT-a gornjeg abdomena ultrazvučni pregled).

Iako je specifičnost citološke pretrage iskašljaja koja se redovito u dijagnostičkom algoritmu navodi prije ostalih pretraga vrlo visoka, njezina je osjetljivost niska, oko 35%, a u studijama probira među rizičnom populacijom i niža, 10-20%.³⁴ Pretraga je svakako indicirana kod bolesnika sa sumnjom na centralno smještenu neoplazmu koji iskašljavaju. Osjetljivost se znatno poboljšava ponavljanjem pretrage na višekratnim uzorcima.

Tumorski biljezi korisni su u dijagnostici, posebice u praćenju odgovora na terapiju i ranoj detekciji rekurentne bolesti. CYFRA 21-1, fragment citoplazmatskog citokeratina 19 koji se u serumu određuje reakcijom monoklonskih protutijela mišjeg podrijetla na dvije antigenske determinante, specifični je biljeg nemikrocelularnog karcinoma pluća. Fragmenti intermedijarnih filamenata citokeratina su za razliku od originalnih molekula citokeratina topivi u serumu u kojeg se isplavljaju u serum nakon smrti stanica. Vrijednosti su neovisne o pušačkom statusu, a osjetljivost je viša kod tumora pločaste diferencijacije nego kod adenokarcinoma, posebice u III i IV stadiju bolesti.³⁵

CYFRA 21-1 može biti povišena kod benignih plućnih bolesti, primjerice u bolestima plućnog parenhima, tuberkulozi, KOPB-u (iako su pritom vrijednosti najšješće blago povišene), u zatajenju bubrega, karcinomima glave i vrata, jednjaka, želuca, mokraćnog mjehura, cerviksa, endometrija i ovarija.

Neuron-specifična enolaza (NSE) biljeg je sitnostaničnog karcinoma čije su vrijednosti ovisne o proširenosti bolesti i također imaju prognostičku vrijednost.

Bronhoskopija omogućuje pregled larinksa, traheje i bronhalnog stabla s uzimanjem uzoraka bioptata kod lokalizacijom pogodnih lezija ili brisa bronha četkicom i bronhalnog aspirata za citološku analizu. Inspekciji su dostupne lezije u području druge, često i treće generacije

bronha. Indicirana je svakako i kod tumora periferne lokalizacije, iako je u tim slučajevima rjeđe dijagnostička.

Osnovni princip u dijagnostici karcinoma pluća je dobivanje dovoljne količine tkiva za histopatološku i molekularnu dijagnostiku uz minimalni broj procedura, odnosno najmanji rizik za bolesnika. Iako minimalni dostatni volumen tkiva dobivenog biopsijom nije točno definiran, većina patoloških laboratorija procjenjuje 1 mm³ dostatnim za imunohistokemijsku analizu i dodatno određivanje mutacija gena EGFR i ALK (ev. i mutacija gena ROS-1).

Periferne lezije smještajem dostupne transtorakalnoj iglenoj punkciji potrebno je punktirati pod kontrolom CT-a ili ultrazvuka. Kao materijal za dijagnozu može poslužiti i uzorak pleuralnog izljeva, sekundarizma u limfnom čvoru ili primjerice kutane metastaze.

Minimalno invazivni postupci (bronhoskopija, transbronhalna iglena punkcija pod kontrolom endobronhalnog ultrazvuka – EBUS-TBNA centralnih tumora sa zahvaćanjem limfnih čvorova prednjeg i gornjeg medijastinuma, transtorakalna iglena punkcija ili rjeđe iglena punkcija pod kontrolom transezofagealnog ultrazvuka –EUS) metode su prvog izbora za inicijalnu biopsiju. Međutim, nakon nekonkluzivnih rezultata prve biopsije ili nemogućnosti uzimanja dovoljno materijala, u drugom koraku prednost treba dati metodi koja će s većom sigurnošću biti dijagnostička.

Invazivni staging medijastinuma indiciran je kod većine bolesnika s vjerojatnim tumorom stadija IB, II i III osim u slučaju N3 bolesti sa zahvaćanjem supraklavikularnog limfnog čvora kad je biopsija čvora zbog manje invazivnosti metoda izbora.

Rjeđe su potrebne video-asistirana torakalna kirurgija (VATS) ili torakotomija s eksploracijom i biopsijom, odnosno resekcijom tumora. Primarna resekcija je metoda izbora kod bolesnika s vjerojatnim perifernim tumorom stadija IA. Kod potencijalno operabilnih bolesnika potrebno je perthodno učiniti PET (pozitronsku emisijsku tomografiju) radi procjene proširenosti bolesti.

1.1.8. Liječenje karcinoma pluća

Kod bolesnika s tumorom ograničenim na jedan hemitoraks koje je moguće u cijelosti odstraniti kirurško liječenje pruža najveće izgleda za izlječenje. U prva dva stadija bolesti potpuna resekcija je gotovo uvijek moguća. Bolesnici s preoperativno utvrđenom N2 bolešću, odnosno zahvaćanjem ipsilateralnim medijastinalnih limfnih čvorova, načelno imaju potencijalno u cijelosti resektabilan tumor, no ukupno preživljenje im je bez adjuvantnog liječenja slabije u

odnosu na skupinu bolesnika kod kojih je zahvaćanje limfonoda medijastinuma intraoperativni nalaz. Stoga se za IIIA (N2) tumore preporučuje neoadjuvantna kemoterapija prije kirurškog zahvata. Unatoč pokušajima poštjednijih resekcija adenokarcinoma ranog stadija, zbog opasnosti od lokoregionalne rekurencije bolesti zlatni standard kirurškog liječenja je lobektomija s potpunom resekcijom tumorske mase *en bloc*. S druge strane, kod proksimalno lokaliziranih (T3) tumora se uvijek kad je to moguće preporučuje učiniti poštjednu resekciju s nekom od tehnika bronhoplastike ili angioplastike (npr. tzv. *sleeve* lobektomija) kako bi se sačuvala plućna funkcija, a pulmektomija je zahvat drugog izbora. Za inoperabilne bolesnike I i II stadija preporučuje se radikalno zračenje ili kemoradioterapija. Također, za bolesnike IIA-III A stadija nakon operacije preporučuje se adjuvantna kemoterapija. Potrebno je napomenuti da je stopa preživljenja za asimptomatske bolesnike s perifernim nesitnostaničnim karcinomom promjera manjeg od 2 cm s potvrđenom N0 bolešću nakon anatomske segmentektomije prema rezultatima metaanalize iz 2014. godine jednaka kao za bolesnike koji su liječeni lobektomijom.³⁶

Inoperabilni bolesnici liječe se kemoterapijom prve linije, tj. kombinacijom cisplatine odnosno karboplatine s lijekovima treće generacije: gemcitabinom, taksanima (paklitakselom ili docetakselom), pemetreksedom (s izuzetkom pločastog karcinoma) ili etopozidom. Preporučuje se svim bolesnicima s adenokarcinomom prije započinjanja liječenja odrediti mutacije EGFR i ALK: kod bolesnika s aktivnim mutacijama gefitinib, erlotinib ili afatinib odnosno krizotinib ili ceritinib su lijekovi prvog izbora, a kod preostalih se kombinaciji temeljenoj na platini pridodaje bevacizumab, monoklonsko protutijelo na čimbenik rasta vaskularnog endotela (VEGF).

Monoterapijom docetakselom, pemetreksedom ili inhibitorima tirozinske kinaze gefitinibom, erlotinibom ili afatinibom provodi se druga linija liječenja. Kod bolesnika koji nisu primali erlotinib taj se lijek daje u trećoj liniji liječenja.

Redovite kliničke, laboratorijske i radiološke kontrole provode se tijekom aktivnog liječenja i nakon završetka terapije s ciljem pravovremenog utvrđivanja progresije odnosno recidiva bolesti: kompjutorizirana tomografija toraksa i gornjeg abdomena indicirana je dvaput godišnje tijekom prve dvije godine, a potom jednom godišnje.

1.1.8.1. Imunoterapija nesitnostaničnog karcinoma pluća

Imunoterapijski pristup temelji se na principima različitim od konvencionalne kemoterapije usmjerene na brzodijeleće stanice ili liječenja usmjerenog na dokidanje ključnih molekularnih puteva o kojima ovise tumorski rast i sposobnost invazije. Osnovna je pretpostavka imunogeničnost tumora, odnosno prepoznavanje tumorskih stanica kao stranih nakon antigenske prezentacije i aktivacije stanične imunosti, pri čemu su rast i razvoj tumora mogući samo uz mehanizme izbjegavanja imunološkog nadzora. Iako je, u prvom redu zbog neuspjelih pokušaja imunomodulacije BCG-om, interferonom ili interleukinom-2, smatran slabo imunogeničnim tumorom, nedavne kliničke studije pokazale su iznenađujuće rezultate imunoterapije nesitnostaničnog karcinoma pluća. Ipilimumab je IgG1 monoklonsko protutijelo na CTLA-4 antigen citotoksičnih limfocita T čija je učinkovitost u liječenju prve linije novootkrivenog karcinoma pločastih stanica dokazana u kombinaciji s paklitakselom i karboplatinom,³⁷ a u tijeku je III faza kliničke studije (NCT01285609).

Osim inhibicije kostimulacijskih signala limfocita T, druga najispitivanija zahvatna točka imunoterapije su PD-1 (*engl. programmed death receptor*), odnosno njegov ligand PD-L1 koji se u tumorima uslijed aktivacije onkogeni i/ili upalne reakcije u tumorskom mikrookolišu pojačano ekspimiraju. Nivolumab je monoklonsko protutijelo na PD-1 limfocitni receptor odobreno u liječenju uznapredovalih NSCLC s dokazanom progresijom u tijeku ili nakon na platini temeljenih kemoterapijskih protokola. Dodatne terapijske mogućnosti od posebnog su značaja u liječenju pločastog karcinoma gdje je dosad u obzir dolazila tek jedna linija kemoterapije. U pločastom karcinomu u usporedbi s docetakselom po RECIST kriterijima objektivizirani odgovor na liječenje bio je viši s nivolumabom (20% naspram 9%), a njegovo trajanje nije dosegnuto (za docetaksel je iznosilo osam mjeseci), jednogodišnje preživljenje je bilo 42% (naspram 24% za docetaksel).³⁸ Osim nivolumaba u SAD i Europi je odobren i pembrolizumab, a ispituju se atezolizumab i durvalumab, IgG protutijela na PD-L1. Osim u drugoj liniji liječenja, od 2016. je pembrolizumab u SAD odobren u prvoj liniji kod bolesnika s uznapredovalim nesitnostaničnim karcinomom i visokom ekspresijom PD-L1 temeljem rezultata III faze kliničkog ispitivanja KEYNOTE-024, a atezolizumab u nesitnostaničnom karcinomu s dokazanom progresijom unatoč kemoterapiji temeljem dokazane superiornosti u odnosu na docetaksel.^{39, 40, 41}

1.2. Molekularni mehanizmi karcinoma pluća

Zasad je stadij tumorske bolesti najpouzdaniji prognostički čimbenik karcinoma pluća. Poznavanje kompleksnih molekularnih mehanizama tumorskog nastanka, razvoja i rasta, odnosno identifikacija njihovih biljega važno je za razumijevanje patogeneze karcinoma pluća no isto tako i za pronalaženje usmjerenog protutumorskog liječenja te uključivanja adjuvantnih terapijskih protokola za podskupine bolesnika koji dijele zajedničke molekularne značajke tumora, odnosno individualizirani terapijski pristup.

1.2.1. Genetske promjene

U stanicama karcinoma pluća bez iznimke nastaju poremećaji normalne regulacije stanične proliferacije i rasta uključujući i izmijenjenu komunikaciju s izvanstaničnim matriksom.

Među osnovnim odrednicama maligne alteracije najvažnije su: samodostatnost signala rasta, neosjetljivost na inhibitore rasta, izbjegavanje apoptoze, neograničen replikacijski potencijal, neoangiogeneza, invazija tkiva i metastaziranje.⁴²

Transformacija u maligni fenotip zahtijeva brojne progresivne genetske i epigenetske promjene. Somatske mutacije gena koji kodiraju bjelančevine nužne za stanični rast i preživljavanje dovode do maligne transformacije stanice. Tako promijenjena stanica postaje neosjetljiva na mehanizme negativne povratne sprege ili specifične stimulacijske signale. Štoviše, maligno transformirana stanica postaje ovisna o onkogenom signalu, odnosno pokretačkoj mutaciji koja je njezin trajni biljeg i istovremeno svojevrsna Ahilova peta. Ciljano protutumorsko liječenje usmjereno je upravo na ishodišnji transformacijski signal, odnosno pokretačku mutaciju. Osim veće učinkovitosti specifična terapija temeljena na molekularnom testiranju tumorskog tkiva povezana je i s manjom toksičnošću.

Međunarodne smjernice triju udruženja, CAP (College of American Pathologists), IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) i AMP (Association of Molecular Pathologists) iz 2013. i 2014. godine preporučuju testiranje mutacije EGFR i ALK u tkivu primarnog tumora ili dostupnih presadnica kod svih bolesnika čiji tumor sadrži elemente adenokarcinoma ili se oni ne mogu isključiti sa sigurnošću, neovisno o kliničkim osobitostima.⁴³

1.2.2. Onkogeni i signalni putevi stimulacije rasta

1.2.2.1. Signalni put receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR)

Obitelj ErbB receptora tirozinske kinaze sastoji se od četiri člana: receptora epidermalnog čimbenika rasta EGFR (*engl. epidermal growth factor receptor*), odn. HER1 ili ErbB-1, ErbB-2 (HER2), ErbB-3 i ErbB-4. Svima im je zajednička visoko konzervirana intracelularna domena tirozinske kinaze.⁴⁴

EGFR na staničnoj površini je monomer i njegova dimerizacija je nužan preduvjet aktivacije tirozinske kinaze. Aktiviran je epidermalnim čimbenikom rasta (*engl. EGF, epidermal growth factor*) ili nekim od njemu sličnih liganada poput TGF- α (*engl. transforming growth factor- α*) ili amfiregulina što nizvodno potiče brojne signalne puteve koji reguliraju staničnu proliferaciju, aktivaciju transkripcije i izbjegavanje apoptoze (RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT, STAT3 i STAT5).⁴⁵

Aktivacijom tirozinske kinaze i fosforilacijom receptora aktivira se signalni put RAS s posljedičnom kaskadnom aktivacijom BRAF i MEK1 te fosforilacijom ERK1/2 što diktira staničnu proliferaciju. Također, aktiviran je PI3K put i nizvodno proteinska kinaza B (AKT). Delecije tumorsko-supresorske fosfataze PTEN koja inhibira PI3K put ili njezino utišavanje na epigenetskoj razini dokazani su u glioblastomu i adenokarcinomu endometrija. PTEN također utječe na fosforilacijski status EGFR. Nizvodno je aktiviran i signalni put mTOR koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, proliferacije i apoptoze.⁴⁶

Aktivnost tirozinske kinaze EGFR u normalnim stanicama je strogo mrežno kontrolirana, no u malignim stanicama geni koji kodiraju receptor mogu mutacijama izbjeći uobičajene čvrsto ustrojene intracelularne kontrolne mehanizme.

Pojačana ekspresija ili aberantna aktivacija EGFR javljaju se u 50-90% nesitnostaničnih karcinoma pluća i mogu biti udružene s amplifikacijom gena. Mutacije tirozinske kinaze EGFR javljaju se u oko 15% adenokarcinoma pluća u Sjedinjenim Američkim Državama i Europi, te jednako tako i kod nas.⁴⁷ Incidencija u Aziji je značajno viša, između 22 i 62%.⁴⁸

Liječenje karcinoma pluća usmjereno na EGFR započelo je i prije spoznaja o specifičnim aktivacijskim mutacijama, a gefitinib je u neselekcioniranoj populaciji imao stopu odgovora od 10-20%^{49, 50}, a erlotinib statistički značajno poboljšao preživljenje.⁵¹ Ovo je otkriće ubrzo

zasjenjeno dramatičnim odgovorom u subpopulaciji bolesnika s adenokarcinomom, posebice ženskog spola, Azijata i nepušača.⁵²

Mutacije EGFR čine tumorske stanice (uglavnom adenokarcinoma) ovisne o trajnom EGF signalu, te stoga prekid signala inhibitorima tirozinske kinaze (TKI) uzrokuje smrt maligne stanice. Aktivirajuće somatske mutacije javljaju se kao delecije, insercije ili točkaste mutacije egzona 18-21 gena EGFR, pri čemu točkasta mutacija egzona 21 *L858R* i delecija egzona 19 *del746-750* obuhvaćaju čak 86% svih mutacija u nesitnostaničnom karcinomu.⁵³ Osim toga, inhibitori EGFR induciraju apoptozu tumorskih stanica putem Bcl-2 obitelji bjelančevina⁵⁴ i autofagiju inhibicijom mTOR sustava te poticanjem aktivnosti tumorskog supresora Beclin 1.⁵⁵ Unatoč izvrsnim rezultatima liječenja inhibitorima tirozinske kinaze EGFR, u tumorima se gotovo bez iznimke pojavljuju novonastale mutacije, najčešće zamjena metionina treoninom u egzonu 20 gena EGFR (T790M) koje uzrokuju rezistenciju tumora na TKI.⁵⁶

Mutacije HER2 (ERBB2) tirozinske kinaze mogu se utvrditi kod 1-2% nesitnostaničnih karcinoma pluća. Također su najčešće u adenokarcinomu, kod žena i nepušača.⁵⁷

1.2.2.2. Signalni put RAS/RAF/MEK/MAPK/MYC

Aktivacija signalnog puta RAS/RAF/MEK/MAPK nizvodno od EGFR puta pokreće nekontroliranu staničnu proliferaciju.

RAS obitelj protoonkogeni sastoji se od četiri visoko homologne bjelančevine: KRAS, HRAS, NRAS i RRAS. Pritom su najčešće posrijedi KRAS mutacije, a mutacije drugih protoonkogeni iz iste obitelji nalaze se iznimno.⁵⁸ Aktivirajuće KRAS mutacije nalaze se u 20-25% plućnih adenokarcinoma i značajno su češće kod pušača.⁵⁹ Čini se da su žene osjetljivije na mutacije KRAS uzrokovane pušenjem.⁶⁰ Iako su ranije studije nedvojbeno ukazivale na mutaciju KRAS kao negativan prognostički čimbenik,⁶¹ njezin utjecaj na preživljenje u ranom adenokarcinomu pluća je ograničen.⁶² U IV stadiju mutacija KRAS je neovisni prediktivni čimbenik kraćeg preživljenja za razliku od mutacije EGFR.⁶³ KRAS mutacije smanjuju osjetljivost tumora na terapiju erlotinibom u odnosu na divlji tip tumora.⁶⁴ Na animalnom modelu dokazano je značajno smanjenje ukupne mase karcinoma pluća s mutacijom KRAS nakon primjene kombinacijskog liječenja inhibitorima bjelančevina MEK i PI3K.⁶⁵ BRAF je nizvodni signalni

medijator KRAS-a koji aktivira put MAP kinaze. Mutacije se nalaze u 1-3% nesitnostaničnih karcinoma pluća, predominiraju u adenokarcinomu i kod pušača.⁶⁶ Većinom je posrijedi mutacija V600E.⁶⁷ Gen MAPK2K1 kodira MEK1 koji nizvodno od RAF-a kontrolira staničnu proliferaciju. Mutacije MAPK2K1 nalaze se u 1% plućnih adenokarcinoma.⁶⁸

MYC protoonkogeni aktivirani amplifikacijom uzvodnih gena često potiču nekontroliranu proliferaciju stanica nesitnostaničnih pluća, iako je njihova aktivnost zabilježena i u sitnostaničnom karcinomu.^{69, 70} Osim što proizlazi da u nastajanju karcinoma pluća može sudjelovati aktivacija različitih signalnih puteva, rutinsko određivanje mutacija ALK i EGFR u budućnosti će zasigurno slijediti i niz drugih.

1.2.2.3. Signalni put PI3K/AKT

Signalni sustav PI3K/AKT aktiviran je rano u nastanku karcinoma pluća. Potiče preživljavanje tumorskih stanica kočenjem apoptoze. U pločastom karcinomu zabilježena je amplifikacija gena koji kodira katalitičku podjedinicu fosfatidilinozitol 3-kinaze PI3K. PI3 kinaza je supstrat za IGF (*engl. insulin-like growth factor*) obitelj signalnih bjelančevina.⁷¹ Nizvodnom aktivacijom serin-treonin kinaze AKT omogućena je fosforilacija niza regulatornih bjelančevina kao što je Bad (na taj način deaktiviran čime je poništen njegov proapoptotski učinak) ili neizravna aktivacija drugih signalnih sustava kao što je mTOR koji regulira staničnu proliferaciju, napredovanje staničnog ciklusa, organizaciju citoskeleta, translaciju glasničke RNA.⁷² Osim toga, AKT izravno regulira signale apoptoze fosforilacijom i stimulacijom ekspresije survivina.

PI3K/AKT signalni sustav nadzire tumorski supresor PTEN koji je u nekim tumorima potpuno utišan. Inaktivacija ili izostanak ekspresije ovog gena utvrđeni su u nesitnostaničnom karcinomu pluća.^{73,74} Mutacije PIK3CA javljaju se u oko 4% nesitnostaničnih karcinoma pluća, uključujući adenokarcinome i pločasti karcinom,⁷⁵ a mogu biti jedan od mehanizama rezistencije na inhibitore tirozinske kinaze EGFR.⁷⁶

1.2.2.4. NKX2-1 (TTF-1) – tkivno specifični onkogen

Amplifikacija tkivno specifičnih transkripcijskih čimbenika dokazana je u karcinomu prostate, dojke i malignom melanomu.^{77,78,79} Temeljem ovih spoznaja postavljena je teorija tkivno

specifičnih onkogeno po kojoj su preživljavanje i rast tumorske stanične populacije ovisni o trajnom signalu putevima specifičnim za pojedina tkiva, primjerice abnormalnoj aktivaciji puteva uključenih u normalnu diferencijaciju. NKX2-1 (odn. TTF-1, engl. thyroid transcription factor-1) je tkivno specifični transkripcijski čimbenik nužan za pravilno grananje dišnih puteva i nastanak pneumocita tipa II koji se smatra najvjerojatnijim kandidatom amplifikacije u nesitnostaničnom karcinomu pluća. TTF-1 također sudjeluje u regulaciji morfogeneze štitnjače i mozga.⁸⁰

1.2.2.5. Fuzijske bjelančevine ALK

EML4-ALK (engl. *echinoderm microtubule-associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase*) identificiran je 2007. godine kao fuzijski onkogen u anaplastičnom velikostaničnom limfomu.⁸¹ EML4-ALK nastaje inverzijom na kratkom kraku drugog kromosoma kojom se egzoni 1-13 EML4 pripajaju egzonima 20-29 anaplastične limfomske kinaze ALK te nastaje kimerična bjelančevina sastavljena od N-terminalne domene EML4 i C-terminalne intracelularne domene ALK s aktivnošću tirozinske kinaze.⁸²

Iako su od otkrića EML4-ALK utvrđene različite mutacije, svima im je zajednička dimerizacija i/ili oligomerizacija ALK neovisna o vezivanju liganda i posredovana EML4 fuzijskim suučesnikom. Na taj se način konstitutivno aktivira tirozinska kinaza. Plućno-specifična ekspresija EML4-ALK onkogeno dovodi do pojave multiplih plućnih adenokarcinoma u populaciji transgeničnih miševa.⁸³

Rast staničnih linija karcinoma koje nose EML4-ALK translokaciju učinkovito inhibiraju blokatori ALK tirozinske kinaze.⁸⁴ Također ALK inhibitori uzrokuju regresiju tumora EML4-ALK transgeničnih miševa, što dokazuje ovisnost o fuzijskom onkogenu.

Pregradnja gena anaplastičke limfomske kinaze u neselekcioniranoj populaciji nesitnostaničnih karcinoma pluća javlja se u oko 4% uzoraka,^{66,85,86,87,88} no uz kliničko-patološku korelaciju mutacija se nalazi znatno učestalije: u podskupini nepušača (ili blagih pušača s manje od deset pušačkih godina u anamnezi) s adenokarcinomom i bez mutacije EGFR učestalost je 33%. Drugim riječima, svaki treći bolesnik s osobitostima karakterističnim za mutaciju EGFR koju nije moguće dokazati može nositi fuzijski onkogen EML4-ALK.⁸⁹ Fuzijski onkogen EML4-ALK javlja se kod mlađih bolesnika, u adenokarcinomu, iako je sporadično opisan i u pločastom karcinomu.

Zlatni standard za potvrdu pregradnje gena ALK je jos uvijek fluorescentna in situ hibridizacija (FISH), iako se u novim smjericama očekuje prihvaćanje imunohistokemijske metode (klonovima D5F3 i 5A4) kao dovoljni uvjet za odluku o terapiji.

1.2.2.6. Amplifikacija FGFR1

Receptor fibroblastnog čimbenika rasta-1 (FGFR1) je receptor stanične membrane s aktivnošću tirozinske kinaze i uključen je u aktivaciju stanične proliferacije. Amplifikacija gena FGFR utvrđena je kod 13-25% pločastih karcinoma pluća i tad je povezana s pušenjem i nižom stopom preživljenja.⁹⁰

1.2.3. Tumorsko-supresorski geni i putevi inhibicije tumorskog rasta

1.2.3.1. Tumorsko-supresorska bjelančevina p53

Fosfoprotein p53 je kritična točka u aktivaciji intrinzičnog puta apoptoze. Aktiviran je mitohondrijskim signalima iz stanične unutrašnjosti (za razliku od ekstrinzičnog puta aktiviranog receptorima s površine stanice). U kontekstu ekscitativnog, nepopravljivog oštećenja p53 potiče apoptozu aktivacijom ekspresije nizvodnih gena (npr. *puma*, *noxa*, *fas*) ili kočenjem antiapoptotskih bjelančevina (npr. Bcl-XL, Bcl-2).⁹¹ Pritom se pod apoptozom podrazumijeva kaspazama posredovan stanični suicid za razliku od drugih mehanizama programirane stanične smrti (npr. autofagije, paraptoze ili mitotske katastrofe).⁹²

Inaktivacijske mutacije p53 vrlo su česte u malignim tumorima, posebice u karcinomu pluća. Najčešće se nalaze hemizigotne delecije uz inaktivirajuću mutaciju preostalog alela. Za gubitak funkcije tumorsko-supresorskog gena nužna je naime inaktivacija oba alela. Regulacija p53 odvija se putem onkogeno MDM2 koji pokreće njegovu degradaciju ili p14^{ARF} izoforme tumorskog supresora CDKN2A. Amplifikacija MDM2 javlja se u oko 6% nesitnostaničnih karcinoma pluća, a gubitak ekspresije p14^{ARF} u oko 40% nesitnostaničnih i oko 65% sitnostaničnih karcinoma.^{93,94} Genskom terapijom moguće je ponovno uspostaviti funkciju p53 puta u subpopulaciji tumorskih stanica.⁹⁵

1.2.3.2. Signalni put CDKN2A/RB

Signalni put CDKN2A-RB1 kontrolira prijelaz G1 faze staničnog ciklusa u S fazu. Hiperfosforilirani retinoblastoma protein (RB), kodiran kao RB1, zaustavlja tranziciju u S fazu i na taj način suprimira nekontrolirani rast. Gotovo sve sastavnice ovog signalnog puta mogu biti promijenjene u karcinomu pluća mutacijom (CDK4, CDKN2A), delecijom (RB1, CDKN2A), amplifikacijom (CDK4, CCN1), utišavanjem metilacije (CDKN2A, RB1) ili fosforilacijom (RB).^{96, 97, 98}

1.2.3.3. Tumorsko-supresorski geni kromosoma 3p

Gubitak jedne kopije kromosoma 3p jedan je od najčešćih ranih događaja u karcinomu, utvrđen u 96% plućnih karcinoma i 78% preneoplastičkih lezija.⁹⁹

Mapiranjem je utvrđeno više gena kratkog kraka s funkcijom supresije tumorskog rasta, među njima i obitelj semaforina i FHIT smješten na najčešće lomljivom mjestu ljudskog genoma (FRA3B) te TUSC2 (FUS1). TUSC2 učinak tumorske supresije postiže inhibicijom kinaza kao što su EGFR, PDGFR, c-Abl, c-Kit i AKT te inhibicijom degradacije p53 posredovane onkogenom MDM2.^{100,101}

1.2.3.4. Signalni put LKB1

Signalni put serin/treoninske kinaze LKB1 regulira polaritet stanice, diferencijaciju i metabolizam. Inaktiviran je kod trećine nesitnostaničnih karcinoma pluća¹⁰² gdje često korelira s aktivacijom KRAS sustava i inhibicijom signalnog puta mTOR¹⁰³ što sve potiče nekontroliranu staničnu proliferaciju. U pretkliničkim ispitivanjima bigvanidi su pokazali djelotvornost u liječenju NSCLC s LKB1 i KRAS mutacijama. U tijeku je II faza randomiziranog kliničkog ispitivanja kombinacije metformina, paklitaksela, karboplatine i bevazicumaba u liječenju adenokarcinoma pluća.¹⁰⁴

1.2.4. Epigenetske promjene

Epigenetske promjene mijenjaju ekspresiju gena ne zahvaćajući u sekvenciju DNA i stoga su potencijalno reverzibilne. Aberantna hipermetilacija promotorskih regija gena koji ostaju

nemetilirani bez obzira na starenje ili pak onih koji tijekom starenja podliježu metilaciji česta je promjena u ranim fazama karcinoma pluća. Na taj način utišana je transkripcija gena koji imaju funkciju tumorskih supresora, popravaka oštećenja DNA, detoksikacije duhanskog dima ili regulacije proliferacije.¹⁰⁵ Deacetilacija histona primjer je epigenetskog utišavanja gena. Inhibitori histonske deacetilaze (HDAC) smanjuju invazivni potencijal u staničnim linijama nesitnostaničnog karcinoma rezistentnog na cisplatinu.¹⁰⁶

1.2.4.1. Regulacija posredovana mikroribonukleinskim kiselinama (miRNA)

MikroRNA su malene molekule RNA koje se sastoje od svega dvadesetak nukleotida i ne kodiraju bjelančevine, već reguliraju ekspresiju gena destrukcijom RNA ili inhibicijom procesa translacije. Više od polovice mikroRNA locirano je na lomljivim mjestima genoma ili na lokusima povezanim s nastankom tumora. Obitelj mikroRNA *let-7* (*engl. lethal-7*) djeluje kao supresor tumorskog rasta regulirajući *KRAS* i *NRAS*.¹⁰⁷ U nesitnostaničnom karcinomu je slabije izražena nego u normalnom tkivu što je povezano sa lošijim prognostičkim ishodom.¹⁰⁷ MikroRNA-128b izravni je regulator *EGFR* i uzrokuje lubitak heterozigotnosti u staničnim linijama nesitnostaničnog karcinoma pluća.¹⁰⁸

1.2.4.2. Signalni putevi Notch, Hedgehog i Wnt

Tijekom embrionalnog razvoja stanice često mijenjaju osnovne odrednice identiteta tijekom migracije u novonastala tkiva. Mnoge od tih morfogogenetskih promjena induciraju različiti izvanstanični ligandi, odnosno njihovo vezivanje za specifične u tom trenutku aktivirane receptore. U novije vrijeme u središtu pozornosti među brojnim signalnim putevima koji reguliraju gensku ekspresiju te uzrokuju dinamičke promjene u staničnoj adheziji i migraciji upravo su signalni putevi Notch, Hedgehog i Wnt.

Geni za regulaciju signalnih puteva Notch, Hedgehog (HH) i Wnt koji sudjeluju u razvoju progenitorskih stanica i plućnoj organogenezi strogo su regulirani u zdravom organizmu, no njihove se mutacije s posljedičnom aktivacijom abnormalnih nizvodnih efektorskih molekula nalaze često u karcinomu pluća.^{109,110}

Notch je evolucijski visokokonzervirani intracelularni signalni put uključen u programiranje stanične diferencijacije beskralješnjaka i kralješnjaka. Abnormalna aktivacija receptora Notch3 eksprimirana je u 39% resekiranih plućnih karcinoma i njegova ekspresija korelira s ekspresijom receptora EGF. Inhibicijom receptora Notch3 zabilježeno je usporenje rasta tumorskih stanica kao i pojačanje ovisnosti o čimbenicima rasta odnosno izraženiji odgovor na inhibiciju tirozinske kinaze EGFR.¹¹¹

Multifunkcionalni interleukin-6 (IL-6) modulira regulaciju receptora Notch3, također i obitelj JAK tirozinskih kinaza a posredno i signalne molekule STAT3, MAPK i PI3K.¹¹²

Signalni sustav Hedgehog tijekom embrionalnog razvoja regulira sudbinu zametnih stanica, međutim u odraslom organizmu kralješnjaka sudjeluje u odgovoru na ozljedu i uključen je u regeneriranje respiratornog epitela.¹¹³ Pojačanje signala HH puta s posljedičnom aktivacijom onkogeno GLI1 zabilježeno je u sitnostaničnom¹¹⁴ i nesitnostaničnom karcinomu pluća.¹¹⁵

Sustav bjelančevina Wnt (*engl. Wingless-type*) igra ključnu ulogu u održanju pluripotencije zametnih stanica i kasnije usmjerene diferencijacije. Signalizacija se odvija dominantno putem β -katenina i igra presudnu ulogu u organogenezi, ali i inicijaciji i progresiji tumora.

B-katenin je transkripcijski kofaktor nuklearnog čimbenika TCF/LEF (*engl. T cell factor/lymphoid enhancer factor*), a osim toga čvrsto vezan za citoplazmatsku domenu kadherina tipa I igra odlučujuću ulogu u strukturnoj organizaciji aktinskog citoskeleta s kojim se veže putem α -katenina.¹¹⁶

Strukturni i funkcijski dinamički integritet kompleksa kadherin-katenin reguliran je fosforilacijom, npr. sustavom Src kinaza ili putem EGFR. Aktivacijom tirozinskih kinaza biva razorena sveza s kadherinom,¹¹⁷ razina citoplazmatskog β -katenina raste, a nakon dostatne akumulacije i stabilizacije može uslijediti i transfer u staničnu jezgru pod utjecajem IGF-1 (*engl. insulin-like growth factor-1*) i transkripcija gena posredovana TCF/LEF.¹⁰¹

Iako je Wnt signalni put iznimno kompleksan uz brojne interakcije s drugim regulacijskim sustavima, česta pojava njegovih alteracija u nesitnostaničnom karcinomu pluća osnova je intenzivnog traganja za prognostičkom vrijednošću pojedinih mutacija kao i ciljanim terapijskim opcijama usmjerenim na neku od komponenti u uznapredovalom NSCLC.

U kulturama respiratornog epitela cigaretni dim potiče nastanak tumora putem signalnih puteva Wnt i HH.¹¹⁸ Aberantna ekspresija Wnt1 i β -katenina pokazala se kao neovisni prognostički čimbenik nesitnostaničnog karcinoma pluća nakon kirurškog zahvata,¹¹⁹ a aberantna ekspresija β -katenina pojavljuje se češće u metastatskim lezijama nego u korespondirajućem primarnom tumoru.¹²⁰ Inhibicijom signalnog puta monoklonskim protutijelom usmjerenim na Wnt1, niskomolekularnom tzv. siRNA (*engl. small interfering RNA*) ili drugim metodama moguće je inducirati apoptozu tumorskih stanica,¹²¹ reducirati sposobnost invazije¹²² i inhibirati proliferaciju stanične linije nesitnostaničnog karcinoma pluća.¹²³ Osim toga, aktivacija puta Wnt u staničnoj liniji nesitnostaničnog karcinoma A549 povezana je s rezistencijom na cisplatinu,¹²⁴ inhibicija liganda Wnt puta FZD-8 povećava odgovor na decetaksel,¹²⁵ a inhibicija Wnt puta antagonistom EMX2 ponovno uspostavlja osjetljivost na cisplatinu.¹²⁶

1.3. Epitelno-mezenhimska tranzicija: raskrižje razvoja i maligne transformacije

Razvoj organskih sustava metazoa započinje nastankom jednoga sloja epitelnih stanica koje predstavljaju temeljnu strukturu na kojoj počiva daljnje građenje. Epitelne stanice rastu u jednom sloju, međusobno lateralno povezane specijaliziranim spojnim strukturama, čvrstim (*engl. tight junction*), tijesnim (*engl. gap junction*), adherentnim svezama i dezmosomima. Adherentne sveze imaju osobito važnu ulogu u konstruiranju lateralnih međustaničnih adhezivnih spojeva.¹²⁷

Epitelne stanice redaju se po načelu apikalno-bazalnog polariteta osnovanog na ukotvljenosti za bazalnu membranu koja je odgovorna za sprječavanje njihove migracije u predležeći ekstracelularni matriks (ECM).

Mezenhimalne stanice nastaju od primitivnog epitela tijekom rane embriogeneze. Za razliku od epitela, polarizirane su u anteriorno-posteriornom smjeru i rijetko uspostavljaju izravni odnos sa susjednim mezenhimijskim stanicama. Stoga se mogu pojedinačno uvlačiti u ekstracelularni matriks.

Konverzija epitelnih u mezenhimske stanice definirana je kao zasebni stanični program 1980-tih serijom elegantnih pokusa Greenburga i Haya koji su i uveli termin epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT).¹²⁸ Glavne odrednice epitelno-mezenhimske tranzicije su: (1) morfološke promjene od jednoslojnog pločastog rasta uzdužno polariziranih epitelnih stanica do vretenastih mezenhimijskih stanica s migratornim protruzijama (pseudopodijima, filopodijima), (2)

promjena diferencijacijskih biljega od citokeratina u vimentin, fibronektin, $\beta 1$ integrine i „splicing“ varijante FGFR2 i (3) funkcionalne promjene.^{129, 130}

Epitelno-mezenhimska konverzija nije nužno ireverzibilna. Mezenhimsko-epitelna konverzija (MET) pojavljuje se tijekom embrionalnog razvoja kao odraz plastičnosti epitela.^{131, 132}

Superobitelj transformirajućeg čimbenika rasta- β (TGF- β) je primarni signalni induktor EMT. Pritom signalni sustav TGF- β komunicira s ranije spomenutim putevima Wnt, Notch i signalnim putevima tirozinskih kinaza. Nadalje, proces epitelno-mezenhimske tranzicije je transkripcijski moduliran promotorom gena E-kadherina (funkcionalni gubitak E-kadherina u epitelnim stanicama je jedna od osnovnih značajki EMT) te transkripcijskim čimbenicima s cinkovim prstima, tzv. *Zinkfinger proteins* (Slug, Snail, obitelj ZEB).^{133, 134, 135, 136}

1.3.1. Bjelančevina NEDD9

Regulatorni protein NEDD9 integralna je sastavnica normalne i patološki promijenjene stanične biologije sudjelovanjem u kontroli migracije i kemotaksije, apoptoze, staničnog ciklusa i diferencijacije. Djelomična sekvenca gena NEDD-9 prvi put je opisana 1992. godine subtrakcijskim kloniranjem gena dominantno eksprimiranih u ranom embrionalnom razvoju mozga (*engl. Neural precursor cell expressed, Developmentally Down-regulated*).¹³⁷ Četiri godine kasnije gen je izoliran u cijelosti i identificiran kao tkivno specifični koordinirajući regulator polarizacije citoskeleta pod utjecajem signala rasta onkogene fosfotirozinske kinaze Abl i nazvan je HEF1 (*engl. Human Enhancer of Filamentation 1*).¹³⁸ HEF1 smješten u fokalnim adhezijama (mjestima o integrinu ovisnih sveza s izvanstaničnim matriksom), a osim s Abl kinazom povezan je i s fokalnom adhezijskom kinazom FAK.^{139,140} Iste godine Minegishi i sur. su osim neovisne potvrde o interakciji s FAK-om dokazali i sudjelovanje bjelančevine koju su nazvali Cas-L (*engl. Cas-L: Crk-associated substrate-related protein, lymphocyte type; Cas: chicken tumor virus no. 10 regulator of kinase*) u kostimulaciji limfocita T.¹⁴¹ Od 2007. godine sva su tri imena (HEF1, Cas-L i NEDD9) u uobičajenoj uporabi kao sinonimi.

NEDD9/HEF1/Cas-L je uz još dvije bjelančevine, p130Cas/BCAR1 i Efs/Sin član tzv. obitelji Cas (*engl. Crk-associated proteins*) i dosad nije utvrđena njegova katalitička aktivnost.

Bjelančevine obitelji Cas sudjeluju u brojnim biološkim funkcijama: staničnoj migraciji, prijanjanju za izvanstanični matriks te odgovoru na mehaničke promjene mikrookoliša, degradaciji izvanstaničnog matriksa, kontroli staničnog ciklusa, cilijarnoj resorpciji,

reorganizaciji osteoklasta, kemotaksiji, fagocitozi te razvoju imunološkog, centralnog i perifernog živčanog sustava.¹⁴²

Gen za NEDD9 je kod svih kralježnjaka konzerviran i u ljudskom genomu je smješten na kromosomu 6p25-p24. NEDD9 sastoji se od 834 aminokiseline organizirane u četiri domene: aminoterminalne domene SH3 (*engl. Src homology 3*), supstratne domene SD, serinom bogatog četverostrukog heliksa i karboksiteminalne domene. Iako se NEDD9 nalazi dominantno u staničnoj citoplazmi, nakon ekstrinzičkih ili intrinzičkih poticaja on se koncentrira u fokalnim adhezijama te u području centrosoma i mitotskog vretena tijekom faza G2 i M staničnog ciklusa i među ostalim upravo interakcije s centrosomima i sustavom proteasoma izdvajaju NEDD9 od ostalih članova obitelji Cas.^{143, 144, 145, 146} Interakcije s proteasomskom mašinerijom i bjelančevinama SMAD omogućuju brzi obrtaj pri odgovoru na različite biološke stimuluse. Supstratna domena NEDD9 je intrinzički nestrukturirana, ali osjetljiva na istežanje N-terminalnih i C-terminalnih sveza pri čemu se razotkrivaju SH2 vezna mjesta i postaju slobodna za fosforilaciju i vezivanje. Drugim riječima, NEDD9 vjerojatno funkcionira i kao mehanosenzor.

NEDD9 je reguliran primarno na razini fosforilacijske kontrole Src kinazama i fokalnom adhezijskom kinazom što je među ostalim uvjetovano integritetom citoskeleta, čvrstoćom izvanstaničnog matriksa, aktivacijom integrina i TGF- β 1, ali isto tako i na razini transkripcije te već spomenute brze proteolize sustavom proteasoma i kaspazama.^{126, 147, 148}

NEDD9 igra važnu ulogu kao svojevrsni mrežni čvor u regulaciji barem tri različite klase bioloških zbivanja: migraciji i invaziji, zatim apoptozi i konačno staničnom ciklusu.¹⁴⁰

Proces stanične migracije zahtijeva kompleksnu koordinaciju ustroja staničnog polariteta, aktinskog i mikrotubularnog citoskeleta, receptora stanične membrane i međustaničnih sveza. Fokalne adhezije odupiru se silama izvanstaničnog matriksa, a s druge strane aktinski citoskelet kontrakcijom omogućava gibanje stanica. NEDD9 na mjestima fokalnih adhezija pozicioniran je tako da može kontrolirati staničnu migraciju interakcijom s različitim signalnim putevima. Pojačana ekspresija NEDD9 potiče širenje stanica na dvodimenzionalnim podlogama,¹⁴⁹ promjenu staničnog oblika i gubitak međustaničnih sveza.¹⁵⁰ Pritom je nužna fosforilacija putem Src i fokalne adhezijske kinaze uz nizvodnu aktivaciju adaptorske molekule Crk i potom malene GTP-aze Rac koja pak uzrokuje aktivaciju aktinskog kompleksa.¹⁵¹ Također, NEDD9 nizvodno aktivira čitav niz čimbenika uključenih u procese migracije i invazije kao što su

multiple matriksne metaloproteinaze (MMP), disintegrin, efrin, receptori transformirajućeg čimbenika rasta (TGF) i receptor Erb2/Her2/Neu.^{146, 152}

Nadalje, NEDD9 sudjeluje u migraciji limfocita T i B posredovanoj integrinom i neovisno o integrinu koordinira kostimulaciju limfocita T.^{153, 154, 155, 156}

U normalnim stanicama ili tijekom ranog tumorskog razvoja povišena razina intracelularnog NEDD9 potiče staničnu migraciju i invazivnost, ali također uvjetuje postmitotske pogreške citokineze, stanične adhezije i dovodi do stanične smrti. Pritom je posrijedi posebna inačica programirane stanične smrti uvjetovana disrupcijom međustaničnih sveza (tzv. anoikis).^{125, 130, 157, 158}

Aktivacija NEDD-9 je odnedavno utvrđena kao ključni događaj u stjecanju metastatskog potencijala u adenokarcinomu dojke,^{159, 160} agresivnom glioblastomu,¹⁶¹ povezana je s kolorektalnim karcinomom^{162, 163, 164} i nastankom tumora ovisnih o BCR-Abl genu,¹⁶⁵ a odnedavno i metastaziranjem LKB1-negativnih nesitnostaničnih karcinoma pluća.¹⁶⁶

1.3.1.1. NEDD9 u glioblastomu

Povećana ekspresija fokalne adhezijske kinaze FAK ili PDGF (platelet-derived growth factor) u stanicama glioblastoma potiče migraciju stanica i to putem specifične fosforilacije i aktivacije NEDD9. Osim toga, inhibicijom NEDD9 poništena je bazalna sposobnost migracije kao i migracija uvjetovana PDGF-om.¹⁴⁶ Nadalje, NEDD9 je aktiviran osim u glioblastomu i u malignom gliomu, a u podgrupi tzv. low grade glioma također je eksprimiran i korelira s kraćim preživljenjem.¹⁶⁷

1.3.1.2. NEDD9 u melanomu

Ekspresija NEDD9 je vrlo visoka u 35% metastatskih melanoma, a stupanj ekspresije korelira s progresijom bolesti. U suradnji s RAS-RAF signalnim sustavima NEDD9 in vivo i in vitro potiče malignu transformaciju melanocita i stanica nemetastatskih melanoma.¹⁶⁸ Nadalje, prekidanje signalizacije fokalne adhezijske kinaze djelovanjem FNRK (*engl. FAK-related non-kinase*) smanjuje migraciju, invaziju i potencijal vaskulogene mimikrije agresivnog melanoma.¹⁶⁹

1.3.1.3. NEDD9 u karcinomu dojke

NEDD9 je pojačano eksprimiran u MCF-7 staničnim linijama karcinoma dojke¹⁷⁰ i inducira porast transkripcije mRNA bjelančevina uključenih u staničnu migraciju, transformaciju i invaziju (MMP1, MMP8, MMP12, MMP13 i MMP14 te MLCK, ErbB2).¹³³

Kod knock-out soja *Nedd*^{-/-}, odnosno transgeničnih miševa kojima je inaktiviran gen NEDD9, usporeni su nastanak i progresija rasta tumora dojke u odnosu na divlji tip, smanjen je ukupni broj induciranih tumora, a također i broj plućnih presadnica.¹⁵⁹

Ektopična ekspresija NEDD9 u epitelnim stanicama dojke potiče epitelno-mezenhimsku tranziciju, aktivira signalni put ERK i interakcije transkripcijskih čimbenika epitelno-mezenhimske tranzicije s E-kadherinom, a u agresivnim tumorima dojke NEDD9 je jače izražen.¹⁶⁰

1.3.1.4. NEDD9 u karcinomu želuca i kolorektalnom karcinomu

U adenokarcinomu želuca utvrđena je pojačana ekspresija NEDD9 pri čemu je razina ekspresije izravno povezana s brojem presadnica u regionalnim limfnim čvorovima, dubinom i stadijem tumora po TNM klasifikaciji.¹⁷¹

U staničnim linijama kolorektalnog karcinoma NEDD9 je dvostruko jače eksprimiran u usporedbi s kontrolnim zdravim epitelom, a ektopična stimulacija s NEDD9 uzrokuje peterostruki porast nekontrolirane stanične proliferacije karakterističan za agresivne tumore. U stanicama kolorektalnog karcinoma izloženim hipoksiji NEDD9 je jače eksprimiran što hipotetski predstavlja adaptacijski odgovor tumora na smanjenu opskrbu kisikom tijekom eksponencijalnog rasta.¹⁷²

1.3.1.5. NEDD9 u karcinomu pluća

Godine 2007. Ji i suradnici utvrdili su inhibiciju NEDD9 posredovanu serin-treoninskom kinazom 11 (STK11, također zvana LKB1) u mišjem modelu nestnostaničnog karcinoma pluća. U tumorima s inaktivirajućom mutacijom LKB1 dokazali su povećanu ekspresiju NEDD9 neovisnu o signalnom putu mTOR.¹⁶⁶

Pet godina kasnije Feng i suradnici potvrdili su LKB1 kao inhibicijski signal transkripcije NEDD9 u mišjem modelu te pokazali smanjenje udjela slabodiferenciranih karcinoma kod miševa s inaktiviranim genom NEDD9. Također, u uzorku od 175 humanih adenokarcinoma ekspresija NEDD9 je korelirala s kliničkim stadijem bolesti, pušenjem i slabom diferencijacijom. Nije utvrđena značajna korelacija s veličinom primarnog tumora.¹⁷³ Iste, 2012. godine Chang i suradnici opisali su statistički značajnu povezanost razine mRNA u 24 uzorka adenokarcinoma pluća fluorescentnom kvantitativnom reakcijom reverzne transkripcijske PCR (*engl. polymerase chain reaction*) s uznapredovalim stadijem bolesti.¹⁷⁴ Ekspresija NEDD9 u izravnom je odnosu s razinama ekspresije E-kadherina, β -katenina i N-kadherina kao biljezima epitelno-mezenhimske tranzicije.¹⁷⁵

2. HIPOTEZA

Ekspresija bjelančevine NEDD9 u transbronhalnim bioptatima karcinoma pluća jača je kod agresivnijih karcinoma te je jedan od negativnih prognostičkih čimbenika.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj istraživanja:

istražiti povezanost ekspresije bjelančevine NEDD9 s različitim histološkim tipovima karcinoma pluća te odrediti njezin utjecaj na preživljenje.

3.2. Specifični ciljevi:

1. reklasificirati uzorke transbronhalnih bioptata karcinoma pluća prema zajedničkim preporukama IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), ATS (American Thoracic Society) i ERS (European Respiratory Society) iz 2011. godine.
2. odrediti korisnost upotrebe protutijela napsin A u odnosu prema TTF-1 protutijelu kod identificiranja žljezdane diferencijacije.
3. odrediti korisnost upotrebe protutijela napsin A u odnosu prema CK7 protutijelu kod identificiranja žljezdane diferencijacije.
4. ispitati pojavnost pozitivne reakcije napsina A kod karcinoma pločastih stanica pluća.
5. odrediti pojavnost i intenzitet ekspresije NEDD9 u različitim tipovima karcinoma pluća na uzorcima transbronhalnih bioptata.
6. odrediti povezanost ekspresije NEDD9 s preživljenjem bolesnika.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

U istraživanju je korišten arhivski materijal Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dobiven tijekom rutinske dijagnostike u razdoblju od 2002. do 2004. godine. Nasumično je odabrano ukupno 220 uzoraka transbronhalnih bioptata pluća iz arhivskih parafinskih blokova. Pritom je odabrano po 55 uzoraka dijagnosticiranih kao planocelularni karcinom, adenokarcinom, sitnostanični te krupnostanični karcinom. Provedena je reklasifikacija svih uzoraka prema smjernicama IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), ATS (American Thoracic Society) i ERS (European Respiratory Society) iz 2011. godine imunohistokemijski upotrebom preporučenih protutijela, ali i paralelnom histološkom analizom rezova obojanih hemalaun eozinom.

Posebna pozornost je posvećena zaštiti osobnih podataka bolesnika te je u istraživanju korišteno pretraživanje prema dijagnozi, a od kliničkih podataka analizirani su podaci o dobi i spolu.

4.2. Metode

Uzorci bioptata su prethodno fiksirani u 10% puferiranoj otopini formalina, uklopljeni u parafinske blokove, izrezani na slojeve debljine 5 μ m, deparafinizirani i bojani standardnom metodom hemalauneozinom.

Za dokazivanje žljezdane diferencijacije upotrijebljeno je TTF-1 protutijelo (Novocastra, Velika Britanija), citokeratin 7 (CK7) (Dako, Danska) i napsin A (Novocastra, Velika Britanija), za dokazivanje pločaste diferencijacije citokeratin 5/6 (CK5/6) (Dako, Danska) i p63 (Novocastra, Velika Britanija) prema uputama proizvođača i upotrebom EnVision kita (Dako, Danska) za vizualizaciju pozitivne reakcije.

Također, ispitana je učinkovitost protutijela napsin A u dokazivanju žljezdane diferencijacije u odnosu na TTF-1 i CK7 te eventualna pojavnost kod pločastog i sitnostaničnog karcinoma. Karcinomi s originalnom dijagnozom planocelularnog karcinoma, adenokarcinoma te krupnostaničnog karcinoma obojani su na sva navedena protutijela, dok su sitnostanični karcinomi obojani samo na CD56 (Novocastra, Velika Britanija) kako bismo potvrdili dijagnozu.

Nakon provedene reklasifikacije svi uzorci obojani su anti-HEF1 (NEDD9) protutijelom (Abcam, Velika Britanija) prema uputama proizvođača, upotrebljavajući također EnVision kit za vizualizaciju pozitivne reakcije. Procijenjen je postotak pozitivnih tumorskih stanica, intenzitet reakcije te radi li se o nuklearnom, citoplazmatskom ili nuklearnom i citoplazmatskom pozitivitetu.

Koristeći svjetlosni mikroskop pri povećanju od 400x određena je imunohistokemijska reakcija na mjestu najjače aktivnosti (tzv. „hot spot“). „Hot spot“ je određen pod malim povećanjem (40X) pregledavanjem čitavog odabranog prereza. Imunohistokemijska reakcija procijenjena je semikvantitativnom metodom prema sljedećim kriterijima:

- „0“ predstavlja odsutnost reakcije (0-25% pozitivnih stanica),
- „1“ slabo izraženu reakciju (26-50% pozitivnih stanica),
- „2“ umjereno izraženu reakciju (51-75% pozitivnih stanica) te
- „3“ za vrlo izraženu reakciju (više od 75% pozitivnih stanica).

Zasebno su promatrani intenzitet bojanja jezgre i citoplazme i udio obojanih stanica.

Analizirani su i statistički obrađeni dobiveni podaci unutar pojedinih tumorskih skupina i uočene razlike među tumorskim skupinama u korelaciji s podacima o preživljenju dobivenim od Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

4.2.1. Statističke metode

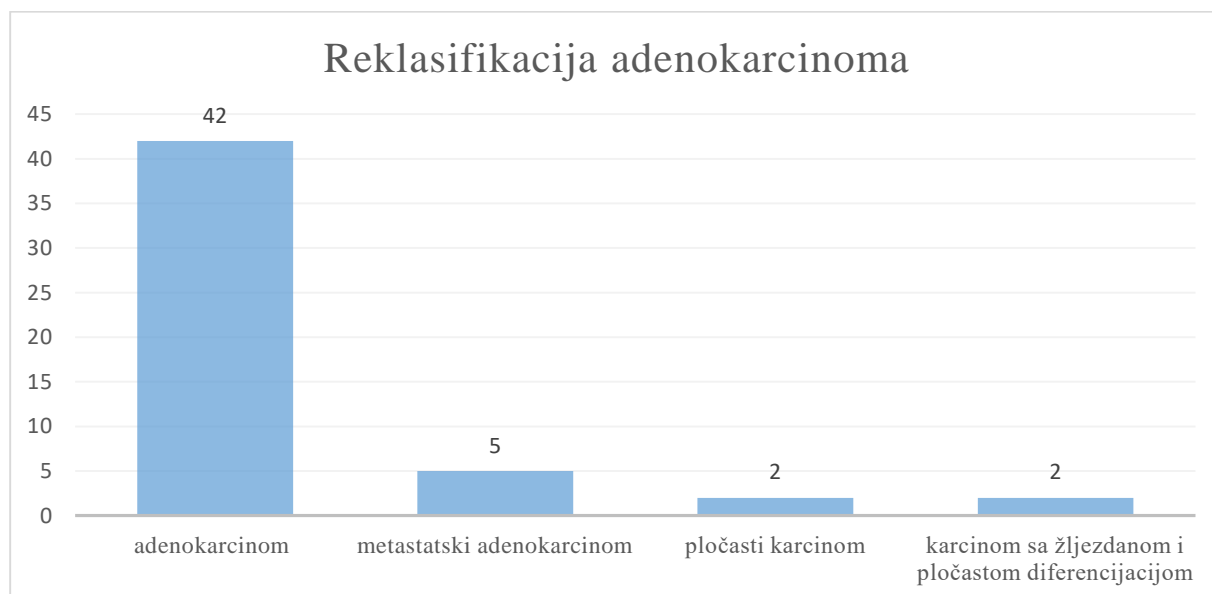
Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kvantitativnih podataka te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Usporedbe između pojedinih kategorijskih i nominalnih vrijednosti u odnosu na izraženost i reakciju NEDD u jezgri i citoplazmi tumora pluća, analizirane su X^2 kvadrat testom. Povezanost prognostički preživljenja s izraženosti i reakcijom NEDD u jezgri i citoplazmi tumora pluća analizirana je Spearmanovim koeficijentima korelacije. Log rank test i Kaplan-Meierove krivulje preživljenja korištene su u analizi preživljenja obzirom na izraženost i reakciju NEDD u jezgri i citoplazmi pojedinih skupina tumora. Sve P vrijednosti

manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila statistička podrška IBM SPSS Statistics, verzija 24.0 (www.spss.com).

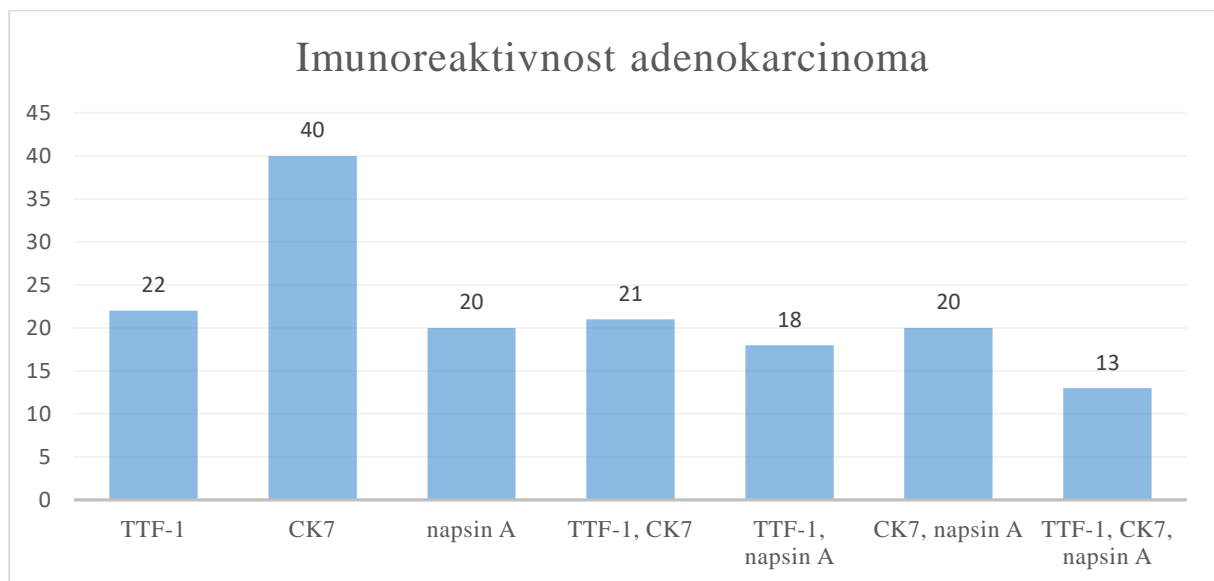
5. REZULTATI

U arhivskom materijalu Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prikupljenom tijekom rutinske dijagnostike u razdoblju od 2002. do 2004. godine nasumično je izabrano 220 uzoraka transbronhalnih bioptata pluća inicijalno dijagnosticiranih kao planocelularni karcinom, adenokarcinom, sitnostanični te krupnostanični karcinom. U rezultate istraživanja uključeno je ukupno 185 uzoraka, dok je preostalih 35 zbog nedostanog raspoloživog materijala u arhivskim parafinskim blokovima za sve predviđene analize izostavljeno.

Reklasifikacijom adenokarcinoma uporabom panela protutijela na TTF-1, CK7, napsin A, p63 i CK5/6 dijagnoza je potvrđena imunohistokemijskim metodama u 42 tumora (83%), dok je pet tumora reklasificirano u metastatski adenokarcinom (9.4%), dva u karcinom pločastih stanica (3.7%), a dva u karcinom s vjerojatnom istovremenom žljezdanom i pločastom diferencijacijom (3.7%). Reklasifikacijom adenokarcinoma imunohistokemijskim metodama dobivena je statistički značajna razlika ($p=0,005$ uz Yatesovu korekciju X^2 testa). Rezultati reklasifikacije adenokarcinoma prikazani su slikama 1 i 2.



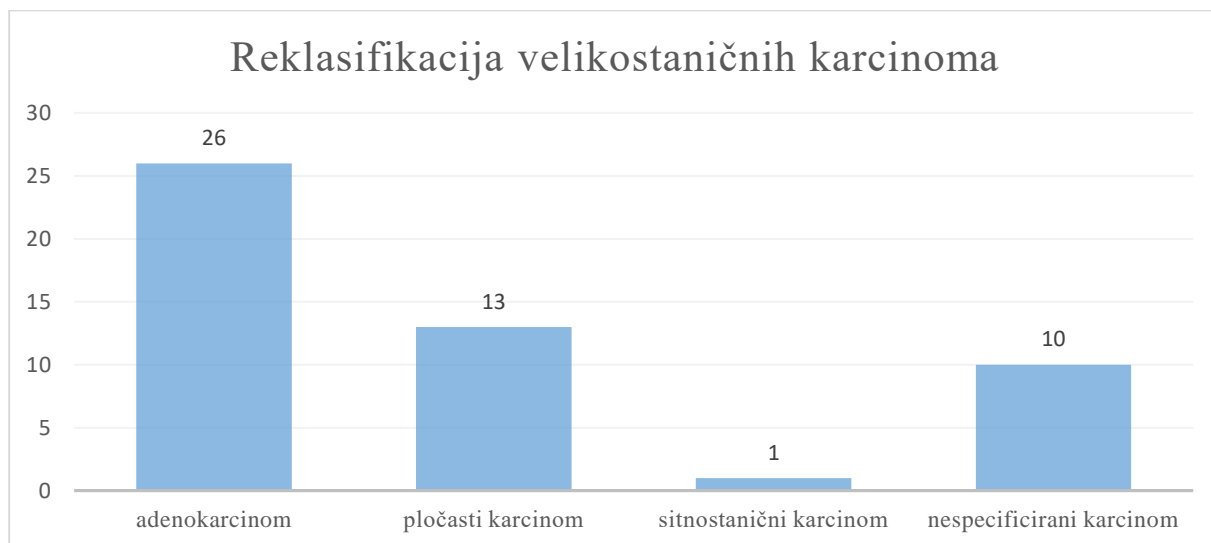
Slika 1. Reklasifikacija adenokarcinoma uporabom biljega TTF-1, CK7, napsin A, p63 i CK5/6



Slika 2. Pojedinačna i ukrižena imunoreaktivnost adenokarcinoma s biljezima TTF-1, CK7, napsin A, p63 i CK5/6

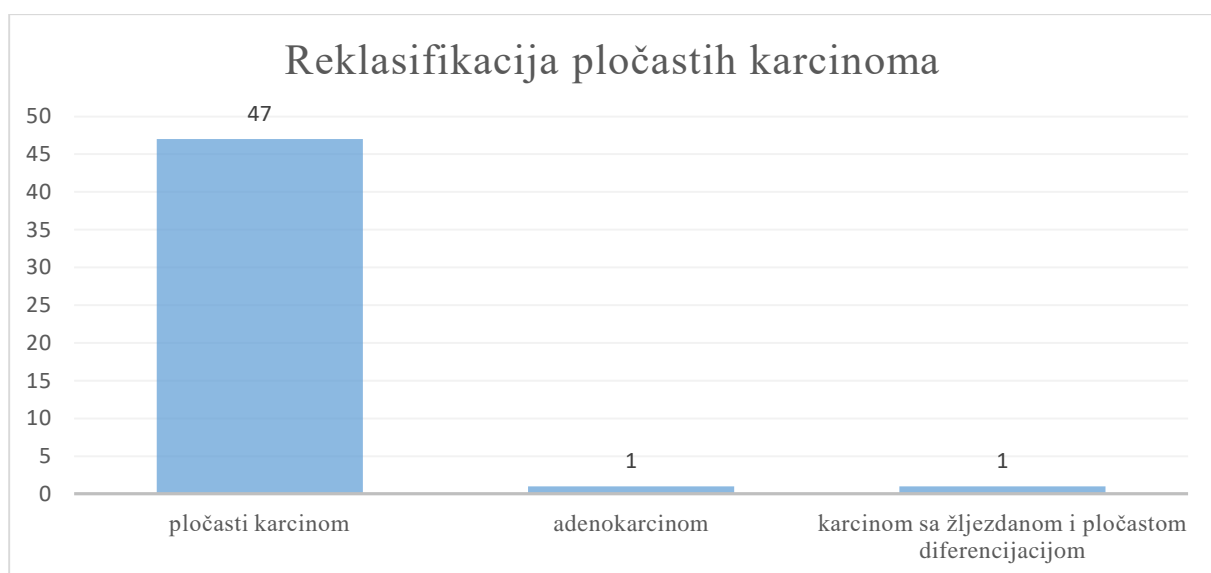
Među imunohistokemijski potvrđenim dijagnozama adenokarcinoma bojanje protutijelom na napsin A bilo je pozitivno u 45.33% tumora koji su istovremeno bili pozitivni na CK7 u 100%, a na TTF-1 u 90% slučajeva. S izuzetkom CK7, zabilježena je heterogenost imunoreakcija: u 21 uzorku bili su pozitivni TTF-1 i CK7, u 18 uzoraka TTF-1 i napsin A, u 20 uzoraka CK7 i napsin A, a u samo 13 uzoraka ukrižena reaktivnost na sva tri biljega. Bojanje napsinom A bilo je pozitivno u 5% pločastih karcinoma (pozitivnih na p63).

Od ukupno 50 uzoraka velikostaničnog karcinoma svi su reklasificirani: njih 52% je reklasificirano u adenokarcinom (26/50), 26% u pločasti karcinom (13/50), 2% u mikrocelularni karcinom (1/50), a preostalih 20% uzoraka je konačno dijagnosticirano kao nespecificirani karcinom sa svim negativnim ispitivanim biljezima (10/50) (Slika 3). Zbog nedostatnog materijala ekspresija NEDD9 u uzorcima nespecificiranog karcinoma nije ispitivana.



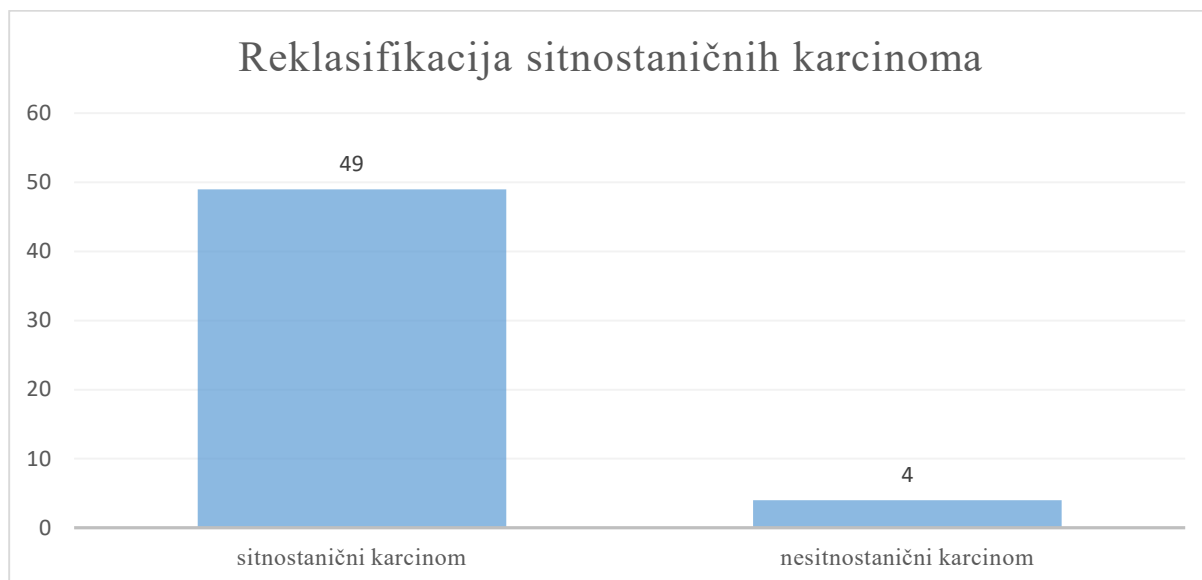
Slika 3. Reklasifikacija velikostaničnih karcinoma uporabom biljega TTF-1, CK7, napsin A, p63 i CK5/6

Samo su dva od ukupno 49 uzoraka pločastog karcinoma reklasificirana, i to jedan u adenokarcinom temeljem pozitivnog TTF-1 uz negativne biljege pločaste diferencijacije, a drugi u karcinom s vjerojatnom istovremenom žljezdanom i pločastom diferencijacijom uz pozitivne biljege p63, CK5/6 i TTF-1 i CK7, ali negativnim napsinom A (Slika 4). Uporabom imunohistokemijskih metoda nije nađena statistička značajnost reklasifikacije ($p=0,995$).



Slika 4. Reklasifikacija pločastih karcinoma uporabom biljega TTF-1, CK7, napsin A, p63 i CK5/6

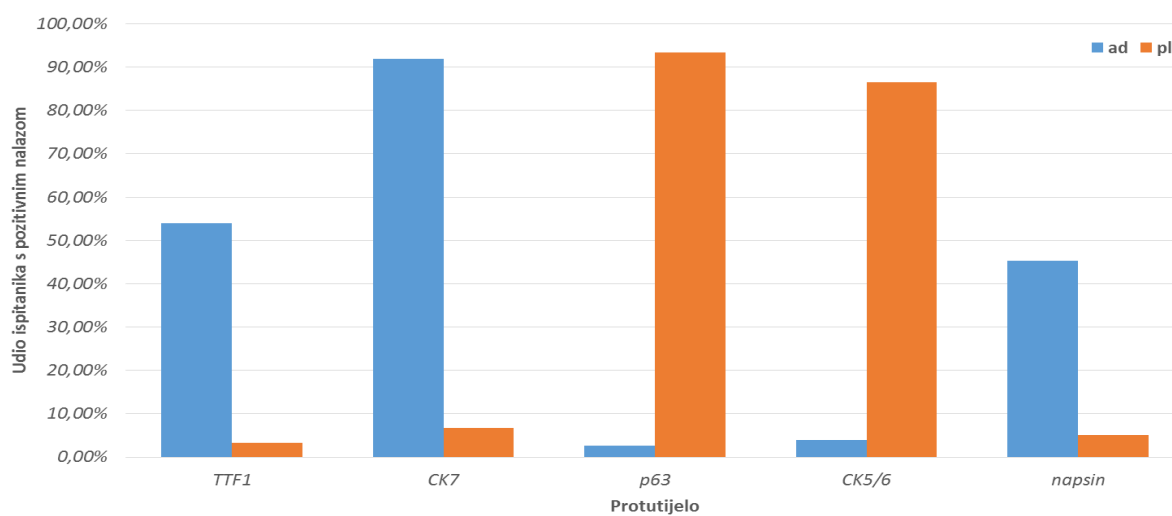
Od ukupno 53 uzorka sitnostaničnog karcinoma u nesitnostanični karcinom je reklasificirana su četiri tumora (7.5%) temeljem negativnog biljega CD56 i morfološkog izgleda (Slika 5). Sva navedena četiri uzorka bila su pozitivna na p63, a 91.8% na CK5/6 (45/49), te je dijagnosticiran karcinom pločastih stanica. Uporabom imunohistokemijskih metoda nije nađena statistička značajnost reklasifikacije ($p=0,126$).



Slika 5. Reklasifikacija sitnostaničnih karcinoma uporabom biljega CK5/6

Slijedeća tablica i pripadajući grafikon prikazuju ekspresiju promatranih protutijela prema tipu reklasificiranog karcinoma. Pritom su imunohistokemijskim bojanjima utvrđene dijagnoze u tablicama i grafičkim prikazima označene kao „ad“, „pl“ odnosno „mi“, za adenokarcinom, pločasti odnosno mikrocelularni karcinom, kako bi prikaz bio što pregledniji. Obzirom da u mikrocelularnih karcinoma mjerenje ekspresije nije bilo provedeno, ti karcinomi nisu prikazani. Razlike među dvama promatranim skupinama (ad i pl) bile su visoko statistički značajne za sva promatrana protutijela, odnosno ekspresija biljega bila je značajno različita između ispitanika s planocelularnim i onih s adenokarcinomom (hi-kvadrat test; $p<0,001$ u svim slučajevima).

| Tablica 7 – Ekspresija protutijela prema tipu karcinoma | | | | | | | | | | | |
|--|------------|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|
| | | TTF-1 | | CK7 | | p63 | | CK5/6 | | napsin A | |
| | PHD | poz | neg | poz | neg | poz | neg | poz | neg | poz | neg |
| N | ad | 41 | 35 | 68 | 6 | 2 | 73 | 3 | 72 | 34 | 41 |
| % | | 53,95% | 46,05% | 91,89% | 8,11% | 2,67% | 97,33% | 4,0% | 96,0% | 45,33% | 54,67% |
| N | pl | 2 | 58 | 4 | 55 | 57 | 4 | 51 | 8 | 3 | 57 |
| % | | 3,33% | 96,67% | 6,78% | 93,22% | 93,44% | 6,56% | 86,44% | 13,56% | 5,0% | 95,0% |
| p | | <0,001 | | <0,001 | | <0,001 | | <0,001 | | <0,001 | |



Slika 6. – Razlike u ekspresiji pojedinih biljega prema tipu karcinoma

Tablica koja slijedi prikazuje udio ženskih i muških ispitanika u ukupnoj promatranoj populaciji kao i prema reklasificiranoj dijagnozi.

U ukupnom broju ispitanika značajno je više muškaraca (N=148), nego žena (N=37). Razlike po spolu bile su statistički značajne između triju promatranih skupina ($p=0,001$; hi-kvadrat test), sa značajno većim udjelom muškaraca u svim trima skupinama, a osobito u skupini „pl“, tj. u oboljelih od planocelularnog karcinoma.

| | PHD | ž | m | Ukupno |
|----------|---------------|-----------|------------|---------------|
| N | ad | 19 | 57 | 76 |
| % | | 25,00% | 75,00% | |
| N | mi | 15 | 33 | 48 |
| % | | 31,25% | 68,75% | |
| N | pl | 3 | 58 | 61 |
| % | | 4,92% | 95,08% | |
| N | Ukupno | 37 | 148 | 185 |

Ispitivane skupine bile su usporedive prema dobi (donja tablica; $p=0,898$; Kruskal-Wallis ANOVA). Srednja dob svih ispitanika uključenih u istraživanje iznosila je 74,2 godine.

| Dob | M* | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
|---------------|-----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| ad | 74,4 | 76 | 44,0 | 103 | 10,1 | 72,1 | 76,7 | 69,0 | 75,0 | 81,0 |
| mi | 73,8 | 48 | 51,0 | 99 | 9,5 | 71,0 | 76,5 | 68,0 | 75,0 | 80,5 |
| pl | 74,1 | 61 | 48,0 | 92 | 9,5 | 71,7 | 76,5 | 68,0 | 77,0 | 82,0 |
| Ukupno | 74,2 | 185 | 44,0 | 103 | 9,7 | 72,7 | 75,6 | 69,0 | 76,0 | 81,0 |

M = srednja vrijednost; N = broj opažanja (ispitanika); Min/Maks = najniža i najviša vrijednost; SD = standardna devijacija; -95% IP/+95% IP = intervali pouzdanosti; DK/GK = donji i gornji kvartil

Prema spolu (donja tablica) razlike u dobi također nisu bile statistički značajne ($p=0,509$).

| Tablica 10 – Deskriptivni podaci dobi ispitanika | | | | | | | | | | |
|---|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| <i>Prema spolu</i> | | | | | | | | | | |
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
| ž | 75,5 | 37 | 56 | 102 | 9,8 | 72,3 | 78,8 | 69 | 75 | 82 |
| m | 73,8 | 148 | 44 | 103 | 9,7 | 72,2 | 75,4 | 68 | 76 | 80,5 |
| Ukupno | 74,2 | 185 | 44 | 103 | 9,7 | 72,7 | 75,6 | 69 | 76 | 81 |

Tablice koje slijede (Tablica 11 - Tablica 15) prikazuju srednju dob ispitanika prema pozitivnom ili negativnom nalazu određenog biljega. Niti za jedan od promatranih biljega razlike u dobi nisu bile statistički značajne.

| Tablica 11 – Deskriptivni podaci dobi ispitanika | | | | | | | | | | |
|---|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| <i>Prema biljegu TTF-1</i> | | | | | | | | | | |
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
| neg | 74,7 | 93 | 48,0 | 102,0 | 9,5 | 72,7 | 76,6 | 69,0 | 77,0 | 82,0 |
| poz | 73,8 | 44 | 44,0 | 103,0 | 10,3 | 70,6 | 76,9 | 69,5 | 74,5 | 79,0 |
| p=0,448 | | | | | | | | | | |

| Tablica 12 – Deskriptivni podaci dobi ispitanika | | | | | | | | | | |
|---|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| <i>Prema biljegu CK7</i> | | | | | | | | | | |
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
| neg | 75,1 | 62 | 48,0 | 102,0 | 9,7 | 72,6 | 77,6 | 69,0 | 77,0 | 82,0 |
| poz | 73,5 | 72 | 44,0 | 103,0 | 9,8 | 71,2 | 75,8 | 68,0 | 74,0 | 80,5 |
| p=0,265 | | | | | | | | | | |

Tablica 13 – Deskriptivni podaci dobi ispitanika*Prema biljevu p63*

| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
|------------|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| neg | 74,1 | 78 | 44,0 | 103,0 | 10,1 | 71,8 | 76,3 | 69,0 | 75,0 | 81,0 |
| poz | 74,6 | 59 | 48,0 | 92,0 | 9,5 | 72,1 | 77,1 | 69,0 | 77,0 | 82,0 |
| p=0,425 | | | | | | | | | | |

Tablica 14 – Deskriptivni podaci dobi ispitanika*Prema markeru CK 5/6*

| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
|------------|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| neg | 73,7 | 81 | 44,0 | 103,0 | 10,4 | 71,4 | 76,0 | 68,0 | 75,0 | 81,0 |
| poz | 75,3 | 54 | 49,0 | 92,0 | 8,9 | 72,8 | 77,7 | 70,0 | 77,0 | 82,0 |
| p=0,226 | | | | | | | | | | |

Tablica 15 – Deskriptivni podaci dobi ispitanika*Prema markeru napsin A*

| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
|------------|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| neg | 74,7 | 99 | 48,0 | 102,0 | 9,3 | 72,8 | 76,5 | 69,0 | 77,0 | 82,0 |
| poz | 73,5 | 37 | 44,0 | 103,0 | 11,2 | 69,7 | 77,2 | 63,0 | 74,0 | 80,0 |
| p=0,498 | | | | | | | | | | |

Promatrano prema spolu (Tablica 16 - Tablica 20) uočene su očekivane razlike u ekspresiji određenih biljega: biljezi žljezdane diferencijacije CK7 i napsin A bili su značajno više izraženi u žena, dok su p63 i CK5/6 bili učestalije pozitivni u muškaraca.

| | | ž | m | Ukupno |
|----------|---------------|----------|----------|---------------|
| N | neg | 12 | 81 | 93 |
| % | | 12,90% | 87,10% | |
| N | poz | 10 | 34 | 44 |
| % | | 22,73% | 77,27% | |
| N | Ukupno | 22 | 115 | 137 |
| p=0,143 | | | | |

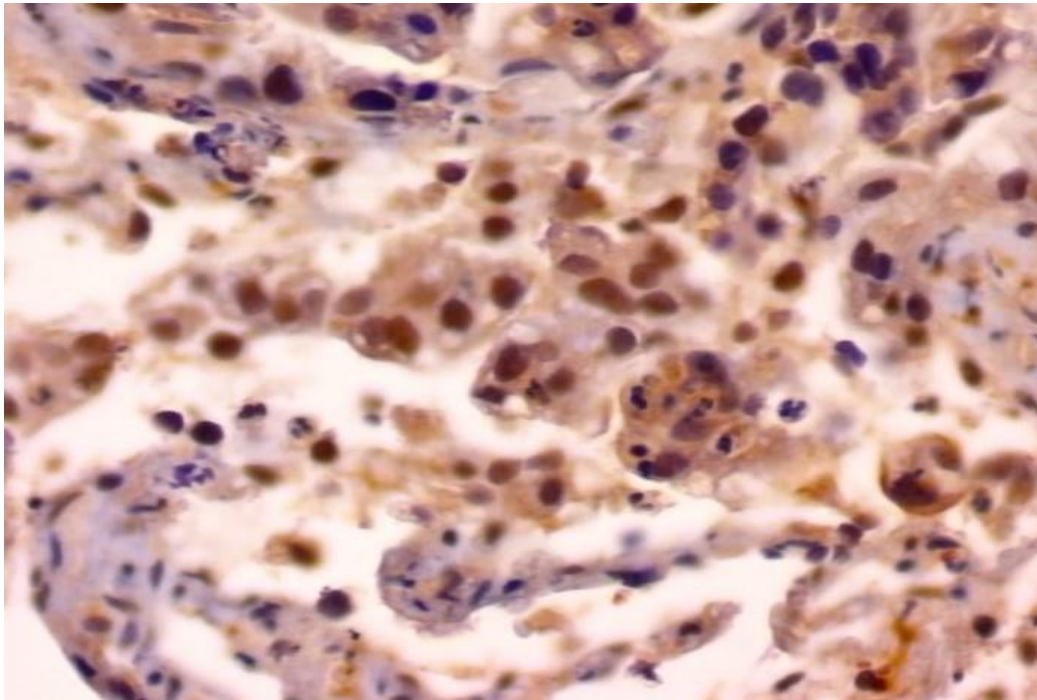
| | | ž | m | Ukupno |
|----------|---------------|----------|----------|---------------|
| N | neg | 5 | 57 | 62 |
| % | | 23,81 | 50,44 | |
| N | poz | 16 | 56 | 72 |
| % | | 76,19 | 49,56 | |
| N | Ukupno | 21 | 113 | 134 |
| p=0,024 | | | | |

| | | ž | m | Ukupno |
|----------|---------------|----------|----------|---------------|
| N | neg | 18 | 60 | 78 |
| % | | 85,71 | 51,72 | |
| N | poz | 3 | 56 | 59 |
| % | | 14,29 | 48,28 | |
| N | Ukupno | 21 | 116 | 137 |
| p=0,004 | | | | |

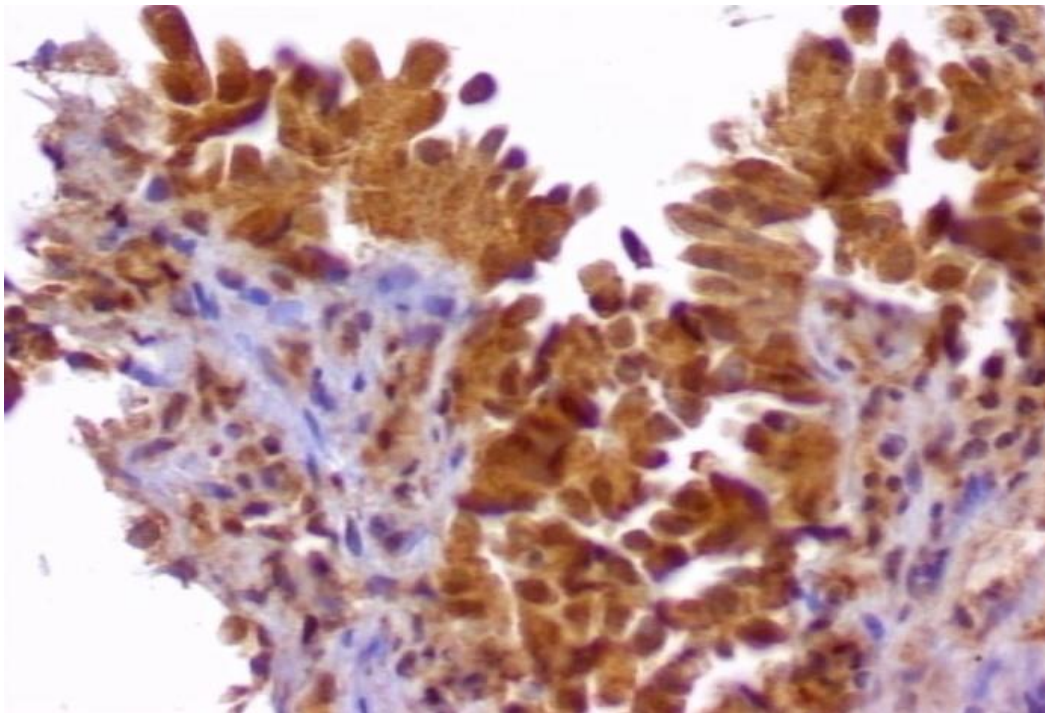
| Tablica 19 – Udio ispitanika prema markeru CK5/6 i spolu | | | | |
|---|---------------|----------|----------|---------------|
| | | ž | m | Ukupno |
| N | neg | 18 | 63 | 81 |
| % | | 85,71 | 55,26 | |
| N | poz | 3 | 51 | 54 |
| % | | 14,29 | 44,74 | |
| N | Ukupno | 21 | 114 | 135 |
| p=0,009 | | | | |

| Tablica 20 – Udio ispitanika prema markeru napsin A i spolu | | | | |
|--|---------------|----------|----------|---------------|
| | | ž | m | Ukupno |
| N | neg | 12 | 87 | 99 |
| % | | 54,55 | 76,32 | |
| N | poz | 10 | 27 | 37 |
| % | | 45,45 | 23,68 | |
| N | Ukupno | 22 | 114 | 136 |
| p=0,035 | | | | |

Slijede rezultati imunohistokemijske reakcije na anti-NEDD9 protutijelo koja je određena na mjestu najjače aktivnosti pri povećanju od 400x svjetlosnim mikroskopom. Izrazito pozitivne reakcije u staničnoj jezgri odnosno citoplazmi tumora prikazane su na slikama 7 i 8.



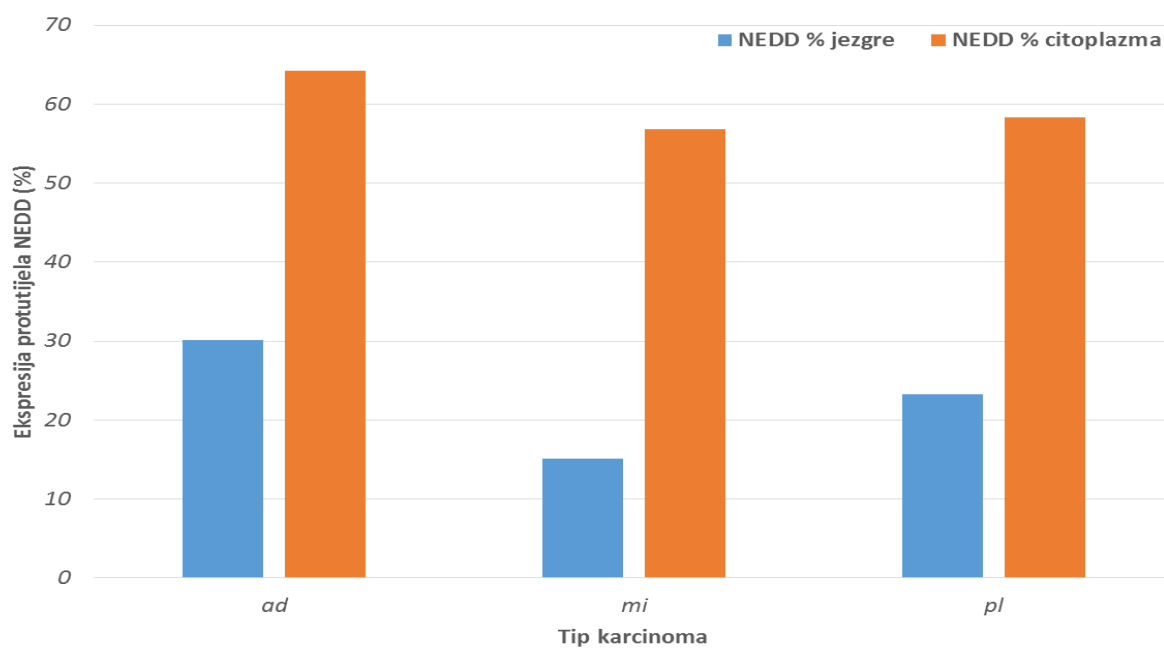
Slika 7. - Izrazita ekspresija NEDD9 u jezgri stanica adenokarcinoma (x400)



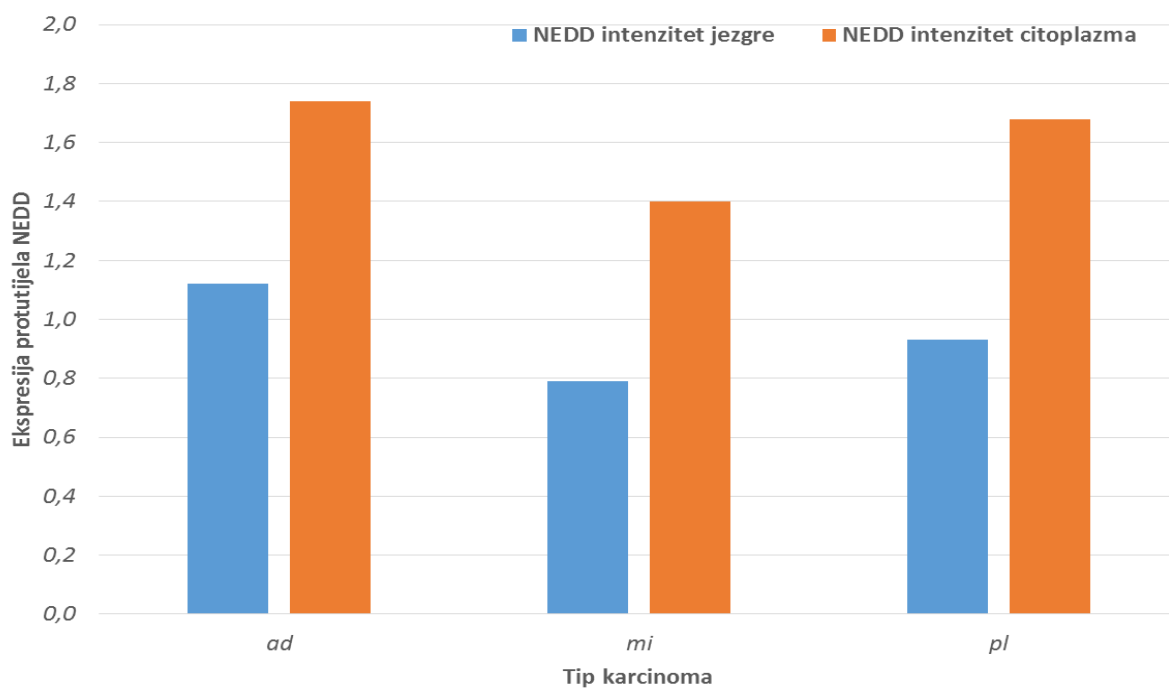
Slika 8. - Izrazita ekspresija NEDD9 u citoplazmi stanica adenokarcinoma (x400)

Sljedeća tablica prikazuje parametre ekspresije protutijela NEDD9 u jezgri i citoplazmi kao i intenzitet bojanja ovim protutijelom. Razlike među skupinama karcinoma nisu bile statistički značajne niti za jednu od promatranih varijabli. P vrijednosti (navedene u stupcu „p“ donje tablice, korištena je Kruskal-Wallis ANOVA) su iznad razine statističke značajnosti nakon što se u obzir uzme Bonferronijeva korekcija koja je neophodna zbog višestrukih analiza istog uzorka.

| Tablica 21 – Ekspresija protutijela NEDD9 | | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|----------|
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK | p |
| NEDD9 % jezgre | | | | | | | | | | | |
| ad | 30,1 | 74 | 0 | 100 | 32,9 | 22,5 | 37,8 | 0 | 20 | 60 | 0,044 |
| mi | 15,1 | 47 | 0 | 70 | 22,2 | 8,6 | 21,7 | 0 | 0 | 30 | |
| pl | 23,2 | 59 | 0 | 80 | 26,6 | 16,3 | 30,2 | 0 | 10 | 50 | |
| NEDD9 intenzitet jezgra | | | | | | | | | | | |
| ad | 1,12 | 74 | 0 | 3 | 1,03 | 0,88 | 1,36 | 0 | 1 | 2 | 0,246 |
| mi | 0,79 | 38 | 0 | 2 | 0,87 | 0,50 | 1,08 | 0 | 0,50 | 2 | |
| pl | 0,93 | 59 | 0 | 2 | 0,91 | 0,70 | 1,17 | 0 | 1 | 2 | |
| NEDD9 % citoplazma | | | | | | | | | | | |
| ad | 64,2 | 74 | 0 | 100 | 33,9 | 56,3 | 72,0 | 40 | 70 | 90 | 0,192 |
| mi | 56,8 | 47 | 0 | 100 | 30,9 | 47,7 | 65,9 | 30 | 60 | 80 | |
| pl | 58,3 | 59 | 0 | 100 | 30,9 | 50,3 | 66,4 | 30 | 60 | 80 | |
| NEDD9 intenzitet citoplazma | | | | | | | | | | | |
| ad | 1,74 | 74 | 0 | 3 | 0,95 | 1,52 | 1,96 | 1 | 2 | 3 | 0,121 |
| mi | 1,40 | 47 | 0 | 3 | 0,88 | 1,15 | 1,66 | 1 | 1 | 2 | |
| pl | 1,68 | 59 | 0 | 3 | 0,75 | 1,48 | 1,87 | 1 | 2 | 2 | |

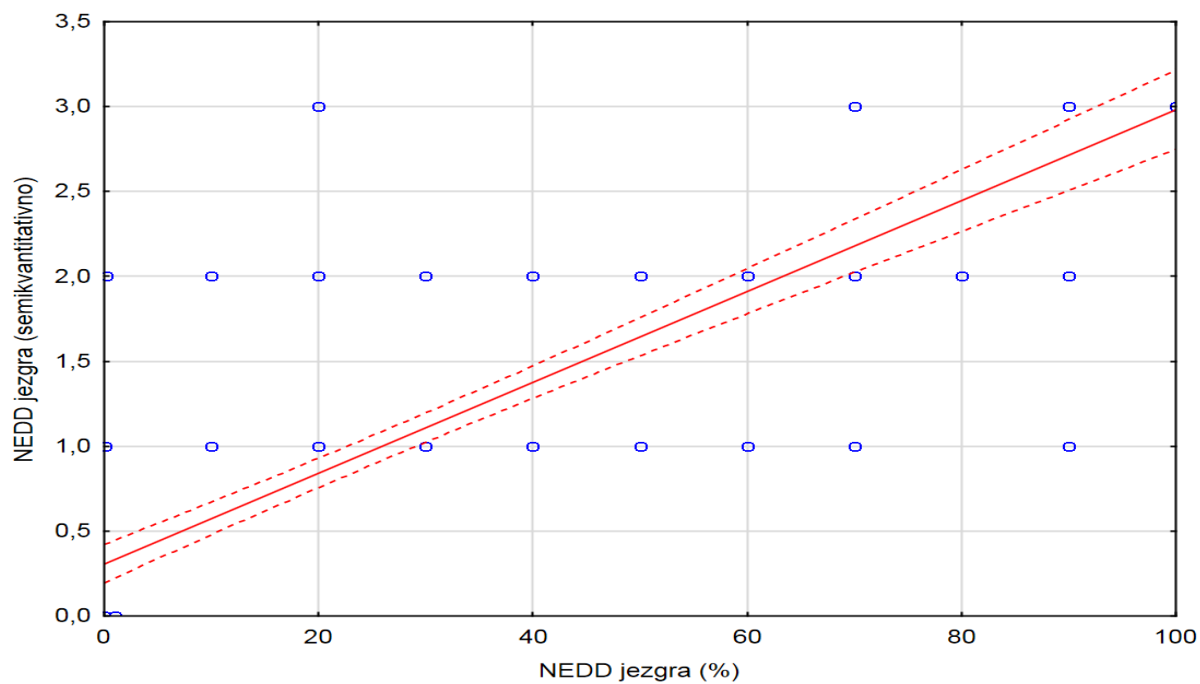


Slika 9. – Razlike u ekspresiji NEDD9 (mjereno u %) između jezgre i citoplazme, prema tipu karcinoma.

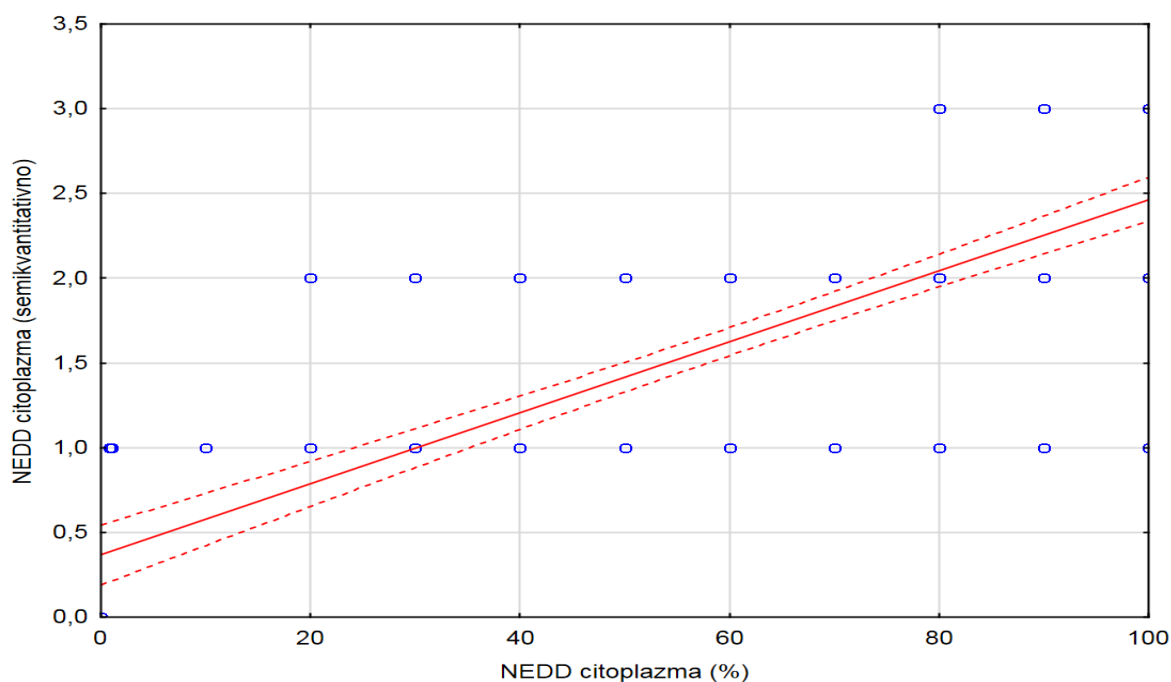


Slika 10. – Razlike u ekspresiji NEDD9 (mjereno semikvantitativno) između jezgre i citoplazme, prema tipu karcinoma.

Dodatno je provedena analiza povezanosti (korelacije) mjerenja za intenzitet ekspresije u jezgri i citoplazmi. Korištenjem Spearmanove korelacije utvrđeni su koeficijenti korelacije od 0,896 za jezgru (intenzitet u % \leftrightarrow intenzitet semikvantitativno) odnosno 0,748 ($p < 0,001$ u oba slučaja). Visoki koeficijenti korelacije potvrđuju (očekivanu) visoku povezanost između intenziteta ekspresije mjerenih različitim metodama.



Slika 11. – Korelacija vrijednosti NEDD9 izmjerenih u % i semikvantitativno u jezgri.



Slika 12. – Korelacija vrijednosti NEDD9 izmjerenih u % i semikvantitativno u citoplazmi.

Vrijednosti NEDD9 (mjerene kao postotak i semikvantitativno) mogu se transformirati u manji broj kategorija, kako slijedi:

- NEDD9 mjereno kao postotak može se sumirati u dvije skupine – do i uključujući 50% i iznad 50%. Varijabla je tako kategorizirana u dvije kategorije: do 50% (što uključuje i vrijednosti od točno 50%) i >50%.
- NEDD9 mjereno semikvantitativno može se također kodirati u dvije skupine. Prvi način grupiranja korišten u ovom radu su skupine „0,1“ i „2,3“. Drugi način grupiranja su skupine „0,1,2“ i „3“.

Ova transformacija provedena je kako bi se utvrdila moguća povezanost ekspresije NEDD9 s tipom karcinoma, a koja nije bila uočena u prethodno prikazanim analizama. Intenzitet bojanja kategoriziran na ovaj način moguće je usporediti s nalazom PHD kako je prikazano u tablicama koje slijede.

Tablica 22 – Ekspresija NEDD9 prema tipu karcinoma

Jezgra; u %

| Jezgra | PHD | do 50% | >50% | Redak |
|----------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| N | a | 52 | 22 | 74 |
| % | | 70,27% | 29,73% | |
| N | m | 42 | 5 | 47 |
| % | | 89,36% | 10,64% | |
| N | p | 47 | 12 | 59 |
| % | | 79,66% | 20,34% | |
| N | Ukupno | 141 | 39 | 180 |
| p=0,043 | | | | |

Tablica 23 – Ekspresija NEDD9 prema tipu karcinoma

Jezgra, semikvantitativno

| Jezgra | PHD | 0,1 | 2,3 | Redak |
|----------------|---------------|------------|------------|--------------|
| N | a | 40 | 34 | 74 |
| % | | 54,05% | 45,95% | |
| N | m | 27 | 11 | 38 |
| % | | 71,05% | 28,95% | |
| N | p | 37 | 22 | 59 |
| % | | 62,71% | 37,29% | |
| N | Ukupno | 104 | 67 | 171 |
| p=0,204 | | | | |

Tablica 24 – Ekspresija NEDD9 prema tipu karcinoma

Citoplazma; u %

| Citoplazma | PHD | do 50% | >50% | Redak |
|------------|---------------|--------|--------|-------|
| N | a | 20 | 54 | 74 |
| % | | 27,03% | 72,97% | |
| N | m | 16 | 31 | 47 |
| % | | 34,04% | 65,96% | |
| N | p | 24 | 35 | 59 |
| % | | 40,68% | 59,32% | |
| N | Ukupno | 60 | 120 | 180 |
| p=0,251 | | | | |

Tablica 25 – Ekspresija NEDD9 prema tipu karcinoma

Citoplazma, semikvantitativno

| Citoplazma | PHD | 0,1,2 | 3 | Redak |
|------------|---------------|--------|--------|-------|
| N | a | 55 | 19 | 74 |
| % | | 74,32% | 25,68% | |
| N | m | 42 | 5 | 47 |
| % | | 89,36% | 10,64% | |
| N | p | 51 | 8 | 59 |
| % | | 86,44% | 13,56% | |
| N | Ukupno | 148 | 32 | 180 |
| p=0,063 | | | | |

| Tablica 26 – Ekspresija NEDD9 prema tipu karcinoma <i>Citoplazma, semikvantitativno</i> | | | | |
|---|---------------|------------|------------|--------------|
| Citoplazma | PHD | 0,1 | 2,3 | Redak |
| N | a | 31 | 43 | 74 |
| % | | 41,89% | 58,11% | |
| N | m | 26 | 21 | 47 |
| % | | 55,32% | 44,68% | |
| N | p | 25 | 34 | 59 |
| % | | 42,37% | 57,63% | |
| N | Ukupno | 82 | 98 | 180 |
| p=0,294 | | | | |

Iz podataka prikazanih u tablicama uočljiva je granična statistička značajnost (u kontekstu potrebne korekcije za multiplacitet) kod intenziteta bojanja u postotcima jezgri (Tablica 22) i jednog od načina kategorizacije semikvantitativnog načina bojanja citoplazme (Tablica 25).

Donja tablica prikazuje vrijeme preživljenja za umrle bolesnike, za sve promatrane skupine. Najdulje srednje vrijeme preživljenja uočeno je u ispitanika s planocelularnim karcinomom i iznosilo je 18,13 mjeseci, dok su najkraće preživljavali ispitanici sa sitnostaničnim karcinomom – 8,55 mjeseci. Ispitanici koji su bolovali od adenokarcinoma imali su srednje preživljenje od 9,41 mjeseci tj. između dvije spomenute skupine. Očekivano, razlike među skupinama bile su statistički značajne ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis ANOVA).

Zanimljivo je da dob ispitanika u trenutku uključivanja u ispitivanje nije bila statistički značajno povezana s vremenom preživljenja ($p = 0,548$; $R = -0,048$; Spearmanova korelacija).

| Tablica 27 – Vrijeme preživljenja | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| <i>Samo osobe umrle do kraja promatranog razdoblja</i> | | | | | | | | | | |
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
| mi | 8,55 | 44 | 0,07 | 33,03 | 7,83 | 6,17 | 10,93 | 1,85 | 6,63 | 12,88 |
| ad | 9,41 | 59 | 0,43 | 42,20 | 9,54 | 6,92 | 11,90 | 2,56 | 7,23 | 11,93 |
| pl | 18,13 | 56 | 0,90 | 81,30 | 16,68 | 13,66 | 22,59 | 6,73 | 13,03 | 22,92 |
| Ukupno | 12,24 | 159 | 0,07 | 81,30 | 12,88 | 10,22 | 14,26 | 3,70 | 9,00 | 15,90 |

Promatrajući vrijednosti prikazane u gornjoj tablici (Tablica 27), moguće je izvući pogrešan zaključak o preživljenju pacijenata uključenih u ispitivanje. Naime, prikazano je vrijeme preživljenja samo za osobe koje su umrle, a nisu u obzir uzeti oni koji su preživjeli.

Slijedeća tablica stoga prikazuje podatke o preživljenju za sve osobe uključene u ispitivanje, i one koje su u trenutku prikupljanja podataka umrle, kao i za one koje su bile žive. Promatrajući na taj način, najdulje preživljenje je u bolesnika s adenokarcinomom (30,86 mjeseci), potom slijede bolesnici s planocelularnim karcinomom (24,61 mjeseci) te konačno osobe s mikrocelularnim karcinomom (10,53 mjeseci).

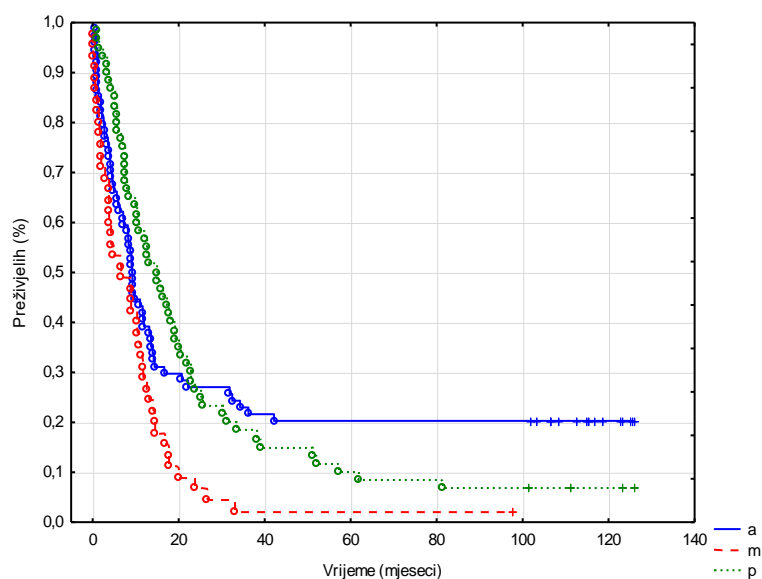
| Tablica 28 – Vrijeme preživljenja | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|
| <i>Svi ispitanici</i> | | | | | | | | | | |
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK |
| mi | 10,53 | 45 | 0,07 | 97,87 | 15,40 | 5,90 | 15,16 | 1,87 | 6,70 | 13,20 |
| ad | 30,86 | 74 | 0,43 | 126,23 | 43,82 | 20,71 | 41,01 | 3,73 | 9,23 | 32,47 |
| pl | 24,61 | 60 | 0,90 | 125,87 | 29,40 | 17,02 | 32,21 | 7,23 | 15,05 | 25,42 |
| Ukupno | 23,65 | 179 | 0,07 | 126,23 | 34,61 | 18,55 | 28,76 | 4,07 | 10,33 | 22,03 |

Kako niti jedan od pristupa prikazanih u prethodnim tablicama (Tablica 27 i Tablica 28) ne daje potpunu sliku o vremenu preživljenja i ne omogućava odgovarajuću statističku analizu razlika između bolesnika s pojedinom dijagnozom, proveda se daljnja analiza preživljenja, počevši s udjelom osoba s određenom dijagnozom koje su u vrijeme provođenja ispitivanja bile žive.

Uzimajući u obzir sve osobe, uključujući one koje su u trenutku provođenja ispitivanja bili žive, uočljivo je da je najveći udio preživljenja u osoba s adenokarcinomom, gdje je u trenutku provođenja ispitivanja bila živo nešto više od petine ispitanika (20,27%), potom slijede bolesnici s planocelularnim karcinomom (6,67% preživjelih) te konačno bolesnici sa sitnostaničnim karcinomom gdje je preživjelih bilo samo 2,22% (Tablica 29).

| Tablica 29 – Udio umrlih ispitanika, prema dijagnozi | | | | |
|---|----------|-------------|--------------|--------------|
| PHD | | Živi | Umrli | Redak |
| ad | N | 15 | 59 | 74 |
| | % | 20,27% | 79,73% | |
| mi | N | 1 | 44 | 45 |
| | % | 2,22% | 97,78% | |
| pl | N | 4 | 56 | 60 |
| | % | 6,67% | 93,33% | |
| Svi | | 20 | 159 | 179 |

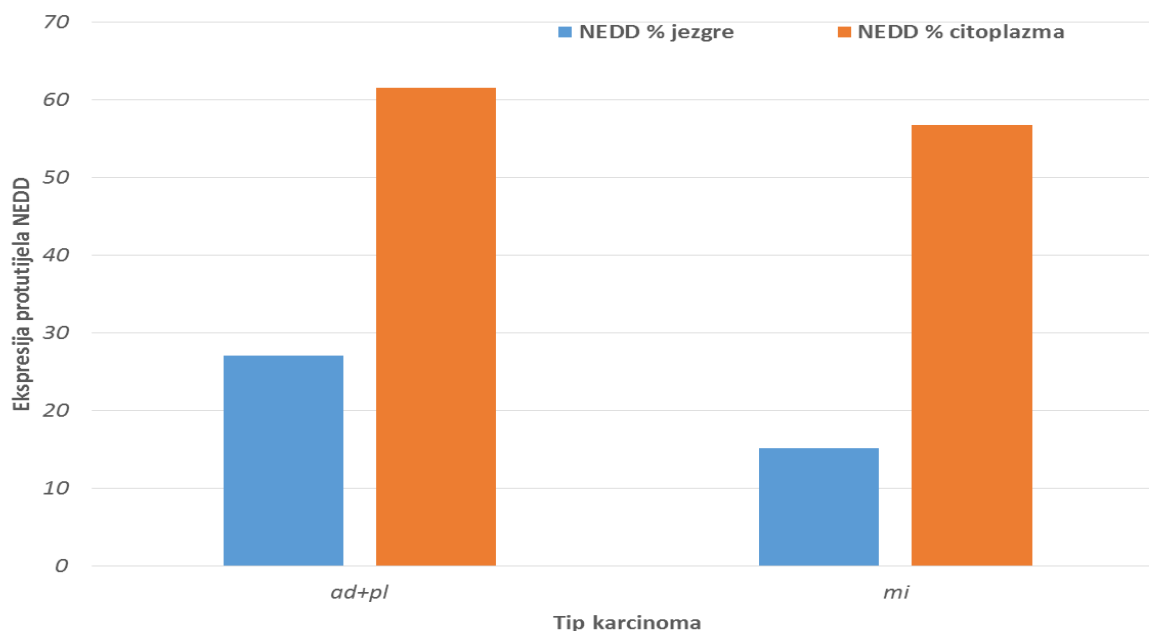
Sljedeći grafikon prikazuje razlike u preživljenju u obliku Kaplan-Meierovog grafikona. Uzimajući u obzir vrijeme preživljenja i tip karcinoma, krajem promatranog vremenskog perioda najmanji udio preživjelih bio je među bolesnicima sa sitnostaničnim karcinomom, nakon kojih je slijedio planocelularni i potom adenokarcinom. Razlike u preživljenju među skupinama bile su statistički značajne (hi-kvadrat test; $p=0,002$).



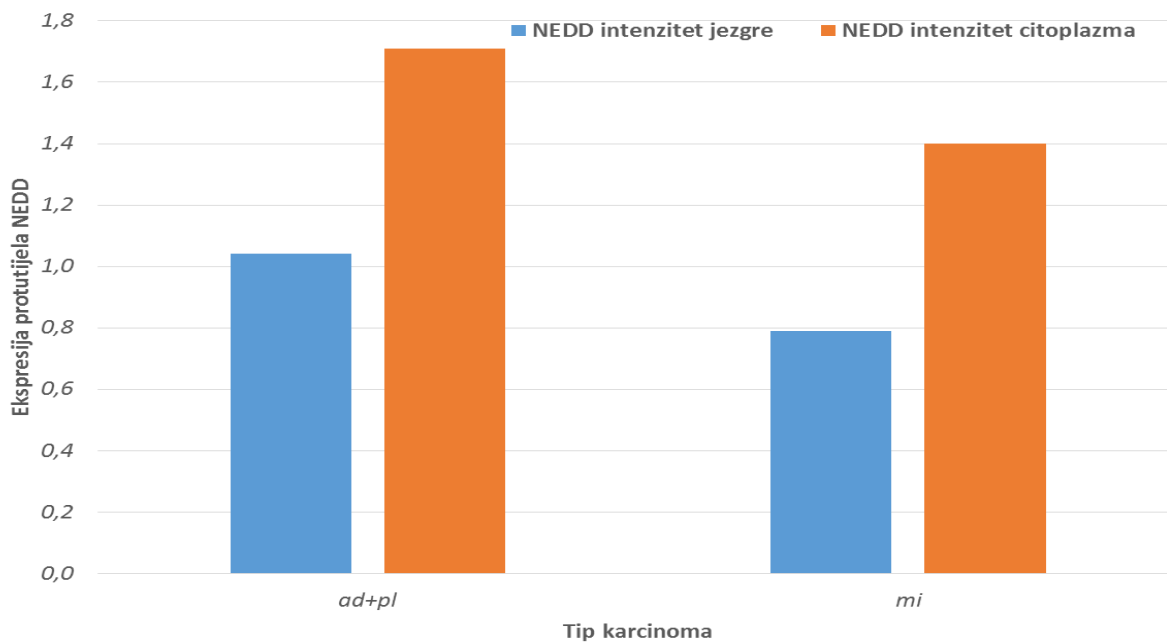
Slika 13. – Kaplan-Meierov grafikon preživljenja prema tipu karcinoma.

Obzirom na rezultate opisane ranije, odnosno činjenicu da se među bolesnicima sa sitnostaničnim karcinomom nalazi najmanji udio preživjelih u usporedbi s preostale dvije skupine (Tablica 29), bilo je opravdano razmotriti i drugi način grupiranja bolesnika kojim bi se ovo uzelo u obzir. Tablica 30 prikazuje deskriptivne podatke ekspresije NEDD9 za tako grupirane bolesnike – u skupinu mikrocelularnog karcinoma u usporedbi sa skupinom u kojoj se nalaze bolesnici s preostale dvije dijagnoze. Iz podataka prikazanih u tablici vidljiv je uzorak slabije ekspresije NEDD9 u bolesnika s sitnostaničnim karcinomom, u usporedbi s preostale dvije dijagnoze. Radi jasnijeg prikaza, isti podaci nalaze se i na grafikonima koji slijede iza tablice.

| Tablica 30 – Ekspresija protutijela NEDD9 | | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|--------------|
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK | p |
| NEDD9 % jezgre | | | | | | | | | | | |
| mi | 15,13 | 47 | 0 | 70 | 22,24 | 8,60 | 21,66 | 0 | 0 | 30 | 0,023 |
| ad+pl | 27,07 | 133 | 0 | 100 | 30,34 | 21,87 | 32,28 | 0 | 20 | 60 | |
| NEDD9 intenzitet jezgre | | | | | | | | | | | |
| mi | 0,79 | 38 | 0 | 2 | 0,87 | 0,50 | 1,08 | 0 | 0,50 | 2 | 0,180 |
| ad+pl | 1,04 | 133 | 0 | 3 | 0,98 | 0,87 | 1,21 | 0 | 1 | 2 | |
| NEDD9 % citoplazma | | | | | | | | | | | |
| mi | 56,81 | 47 | 0 | 100 | 30,86 | 47,75 | 65,87 | 30 | 60 | 80 | 0,216 |
| ad+pl | 61,59 | 133 | 0 | 110 | 32,61 | 56 | 67,19 | 40 | 70 | 90 | |
| NEDD9 intenzitet citoplazma | | | | | | | | | | | |
| mi | 1,40 | 47 | 0 | 3 | 0,88 | 1,15 | 1,66 | 1 | 1 | 2 | 0,045 |
| ad+pl | 1,71 | 133 | 0 | 3 | 0,87 | 1,57 | 1,86 | 1 | 2 | 2 | |



Slika 14. – Ekspresija NEDD9 (mjerena u %), prema tipu karcinoma, grupirano kako je opisano ranije.



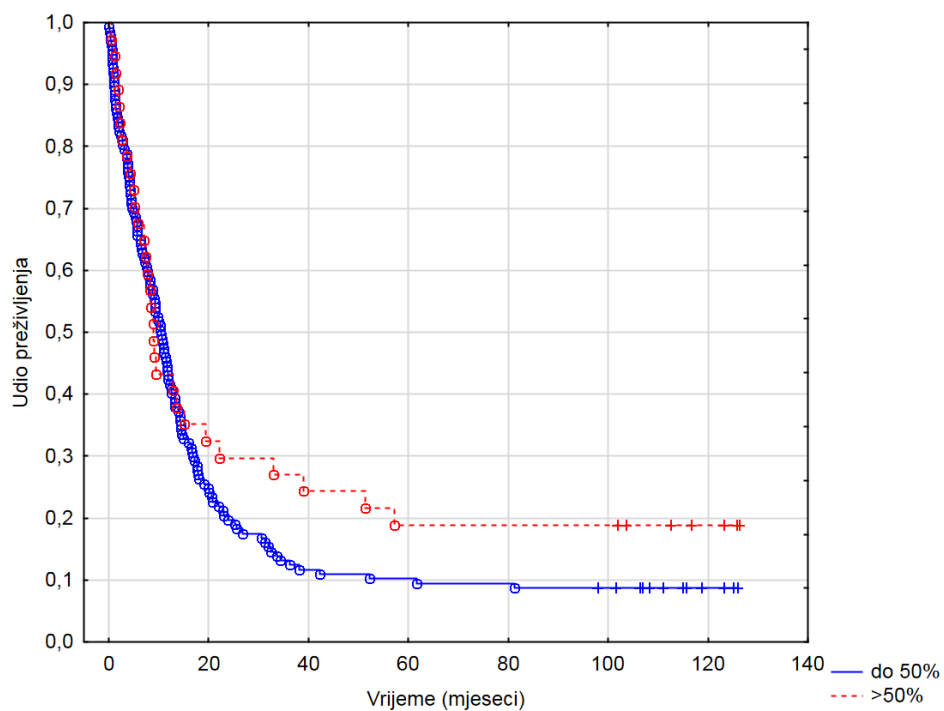
Slika 15. – Ekspresija NEDD9 (mjerena semikvantitativno), prema tipu karcinoma, grupirano kako je opisano ranije.

Pored ekspresije NEDD9 u različitim tipovima karcinoma, potrebno je ispitati i ekspresiju NEDD9 u umrlih u usporedbi s preživjelim bolesnicima. Donja tablica prikazuje rezultate ekspresije kao i statističku značajnost razlika između dvaju promatranih skupina – preživjelih i umrlih bolesnika. Općenito je moguće zaključiti da je ekspresija NEDD9 bila jače izražena u preživjelih u usporedbi s ispitanicima koji su umrli.

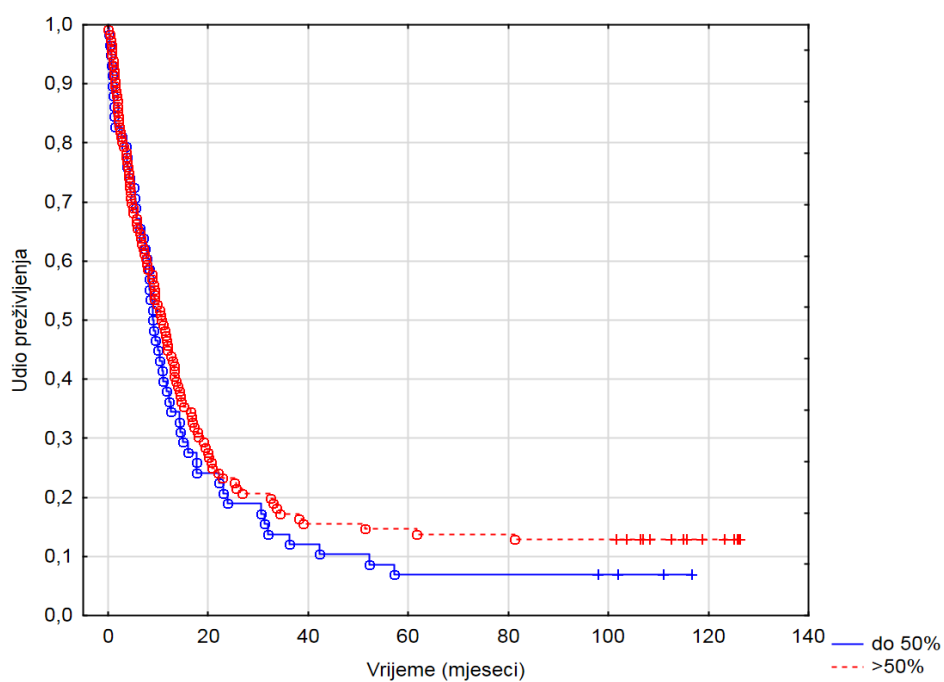
Napomena. Intenzitet ekspresije mjeran je na dva različita načina. S obzirom na visoki stupanj korelacije između dobivenih rezultata (vidjeti ranije), opravdano je razmatrati samo jednu metodu. U skladu s rezultatima prikazanim do sada, prema našem mišljenju opravdanija je uporaba samikvantitativne metode.

| Tablica 31 – Ekspresija protutijela NEDD9 | | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|------------|-------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|----------------|-----------|----------|
| Dob | M | N | Min | Maks | SD | -95% IP | +95% IP | DK | Medijan | GK | p |
| NEDD9 % jezgre | | | | | | | | | | | |
| živi | 34,7 | 19 | 0 | 100 | 34,4 | 18,2 | 51,3 | 0 | 30 | 60 | 0,114 |
| umrli | 22,8 | 155 | 0 | 100 | 28,0 | 18,3 | 27,2 | 0 | 10 | 40 | |
| NEDD9 intenzitet jezgre | | | | | | | | | | | |
| živi | 1,50 | 18 | 0 | 3 | 1,15 | 0,93 | 2,07 | 0 | 2 | 2 | 0,034 |
| umrli | 0,93 | 148 | 0 | 3 | 0,92 | 0,78 | 1,08 | 0 | 1 | 2 | |
| NEDD9 % citoplazma | | | | | | | | | | | |
| živi | 72,1 | 19 | 0 | 100 | 37,4 | 54,1 | 90,1 | 60 | 90 | 100 | 0,018 |
| umrli | 58,7 | 155 | 0 | 110 | 31,0 | 53,8 | 63,6 | 40 | 60 | 80 | |
| NEDD9 intenzitet citoplazma | | | | | | | | | | | |
| živi | 2 | 19 | 0 | 3 | 1 | 1,52 | 2,48 | 1 | 2 | 3 | 0,037 |
| umrli | 1,57 | 155 | 0 | 3 | 0,84 | 1,44 | 1,71 | 1 | 2 | 2 | |

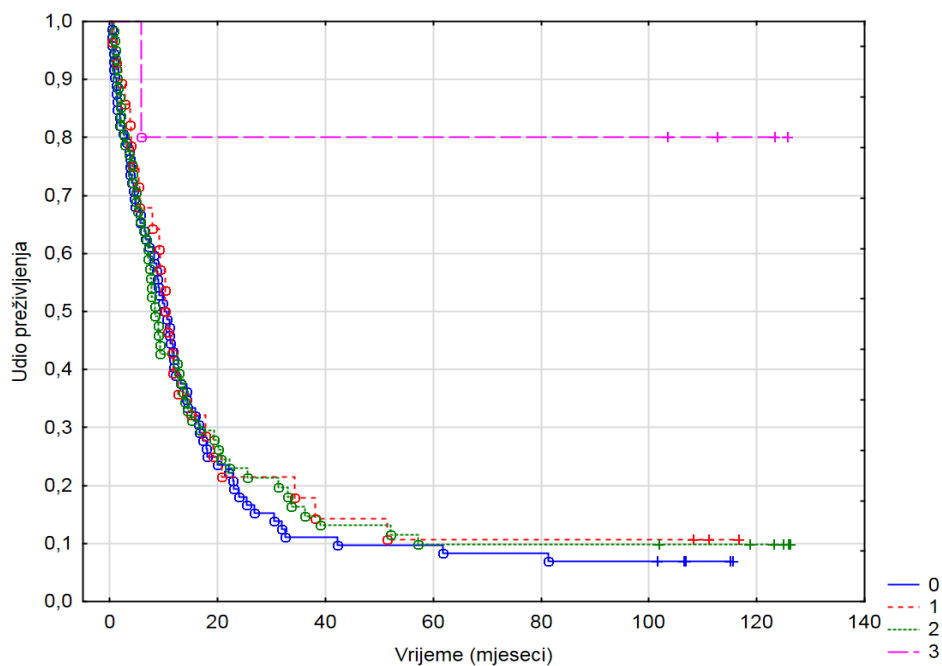
Konačno, prikazat će se i statistički ispitati značajnost razlika u duljini preživljenja za ispitanike kategorijski grupirane prema intenzitetu bojanja jezgre odnosno citoplazme. Sumarnim promatranjem rezultata prikazanih u svim grafikonima moguće je uočiti ponegdje statistički granično značajan uzorak koji sugerira duže preživljenje u skupinama s jače izraženom ekspresijom NEDD9.



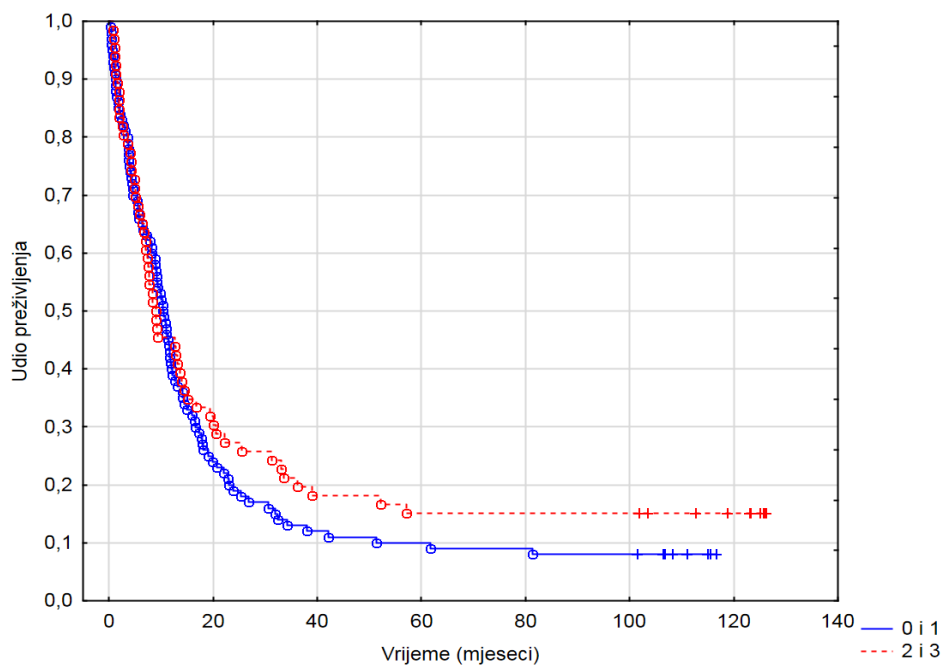
Slika 16. – Razlike u preživljenju prema intenzitetu ekspresije NEDD9 u jezgri. $p=0,502$.



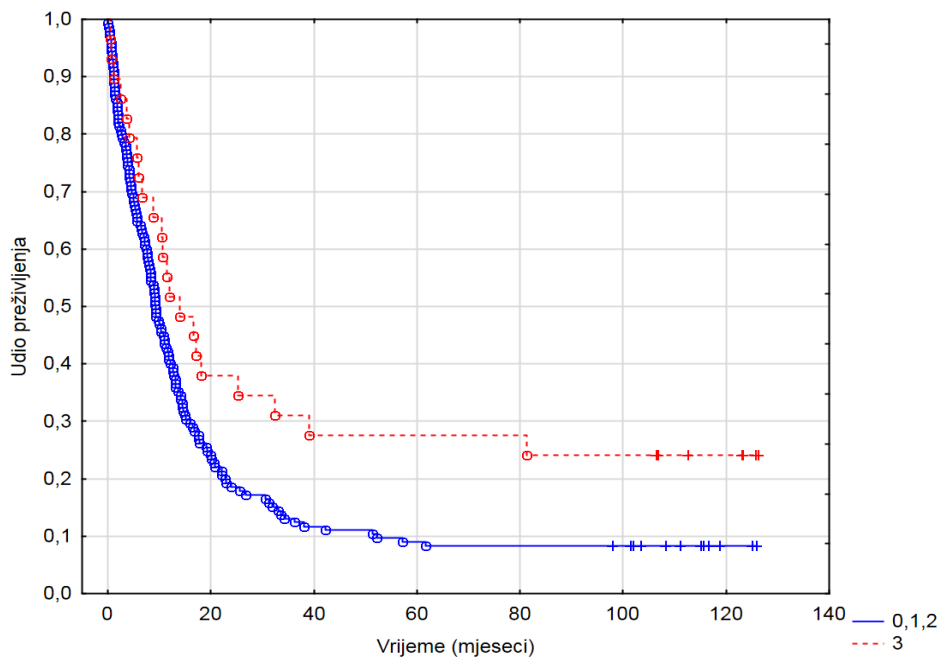
Slika 17. – Razlike u preživljenju prema intenzitetu ekspresije NEDD9 u citoplazmi. $p=0,495$.



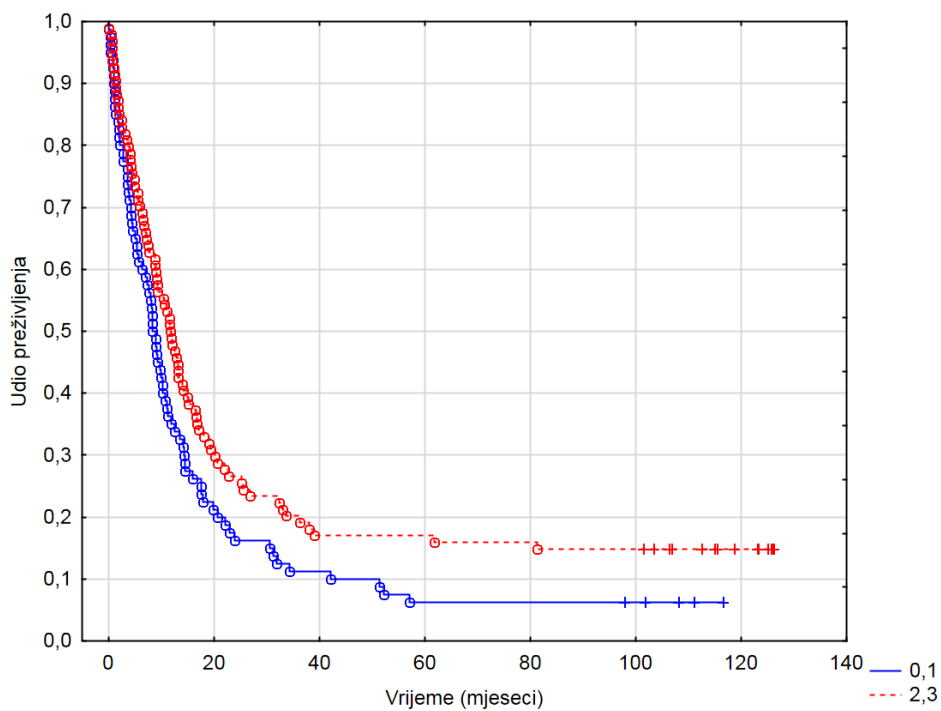
Slika 18. – Razlike u preživljenju prema intenzitetu ekspresije NEDD9 u jezgri. $p=0,078$. Rezultate treba tumačiti s oprezom zbog malog broja bolesnika i konzekventno velikog odskakanja rezultata za skupinu s intenzitetom 3.



Slika 19. – Razlike u preživljenju prema intenzitetu ekspresije NEDD9 u jezgri. Ishodišne vrijednosti (0-3) kategorizirane su u dvije skupine, kako je opisano ranije. $p=0,671$.



Slika 20. – Razlike u preživljenju prema intenzitetu ekspresije NEDD9 u citoplazmi. Ishodišne vrijednosti (0-3) kategorizirane su u dvije skupine, kako je opisano ranije. $p=0,068$.



Slika 21. – Razlike u preživljenju prema intenzitetu ekspresije NEDD9 u citoplazmi. Ishodišne vrijednosti (0-3) kategorizirane su u dvije skupine, kako je opisano ranije. $p=0,077$.

Daljnje razmatranje utjecaja različitih varijabli na preživljenje provedeno je Coxovim regresijskim modelom koji u obzir uzima utjecaj pojedinih varijabli na preživljenje, kao i duljinu preživljenja. Najjednostavniji pristup regresijskom modeliranju je model koji uključuje sve varijable od potencijalnog interesa. U slučaju ovog istraživanja to su: spol, dob, TTF-1, CK7, p63, CK 5/6, napsin A, intenzitet ekspresije NEDD9 u jezgri i citoplazmi.

Ovakvim pristupom dobiveni su rezultati prikazani u sljedećoj tablici. Rezultati upućuju na važnost ekspresije CK7 i napsina A (ali ne i drugih promatranih parametara, uključujući i NEDD9) kao prediktore preživljenja.

| Tablica 32 – Rezultati Coxove regresije | | | | |
|--|-------------|-----------|----------|-----------|
| | Beta | SE | p | RR |
| spol | 0,493 | 0,356 | 0,166 | 1,638 |
| dob | 0,006 | 0,010 | 0,585 | 1,006 |
| TTF-1 | -0,118 | 0,273 | 0,665 | 0,888 |
| CK7 | 0,883 | 0,358 | 0,014 | 2,418 |
| p63 | 0,006 | 0,597 | 0,991 | 1,006 |
| CK5/6 | 0,404 | 0,499 | 0,418 | 1,498 |
| napsin A | -0,505 | 0,264 | 0,056 | 0,604 |
| NEDD9 int j | -0,097 | 0,110 | 0,377 | 0,907 |
| NEDD9 int c | -0,086 | 0,115 | 0,455 | 0,918 |

6. RASPRAVA

Točna klasifikacija karcinoma pluća temelj je na kojem se zasniva učinkovitost terapijskih protokola. Više od 80% karcinoma pluća objedinjeno je u skupini nesitnostaničnih karcinoma među kojima karcinom sa žljezdanom diferencijacijom obuhvaća između 35% i 50%, iako se još pedesetih godina prošloga stoljeća javljao u samo 5% svih karcinoma pluća. Adenokarcinom pluća obuhvaća iznimno širok patološki, molekularni, klinički i radiološki spektar, a sve bolje razumijevanje kompleksnih molekularnih puteva nastanka, održavanja i progresije tumorskog rasta kao i imunskog odgovora na malignu proliferaciju otvara nove mogućnosti personaliziranog liječenja.

Nedvojbeno razlikovanje adenokarcinoma i karcinoma pločastih stanica iznimno je važno zbog: 1. primjene erlotiniba, gefitiniba ili afatiniba u prvoj liniji liječenja adenokarcinoma s dokazanim EGFR mutacijama, 2. primjene krizotiniba ili ceritiniba u liječenju adenokarcinoma s dokazanom ALK translokacijom, 3. kontraindikacije za bevazicumab u pločastom karcinomu zbog potencijalno fatalnih krvarenja i 4. neučinkovitosti pemetrekseda u terapiji pločastog karcinoma.

Prema standardiziranim morfološkim kriterijima postoji jasna distinkcija adenokarcinoma i pločastog karcinoma. Stanice adenokarcinoma su uniformno kubične do cilindrične, često formirajući tubularne, acinarne ili papilarne tvorbe i nerijetko produciraju mucin. U pločastim karcinomima nalaze se ovisno o stupnju diferencijacije tipična žarišta orožnjavanja s međustaničnim mostićima. U dovoljno velikim uzorcima resekiranih tumora mjestimična skvamozna žarišta u adenokarcinomu ili češće, u oko 15% slučajeva, otoci žljezdane diferencijacije u pločastom karcinomu ne predstavljaju dijagnostički problem, no u transbronhalnim, tzv. malim biopstatima ili citološkim uzorcima mogu dovesti do pogrešne klasifikacije.¹⁷⁶ Znatno češći problem su slabo ili fokalno izražene tipične značajke žljezdane ili pločaste diferencijacije kod nisko diferenciranih tumora, a uzorci malih biopstata ili obrisaka bronha često su hipocelularni uz artefakte nastale mehaničkim oštećenjima tkiva. Brojne studije ukazuju na mogućnost pogrešne morfološke klasifikacije uzoraka malih biopstata u komparaciji s konačnom dijagnozom reseciranog materijala, pa su primjerice Cataluña i sur. 1996. godine opisali pogrešnu klasifikaciju 10% pločastih karcinoma, 14% adenokarcinoma i 50% velikostaničnih karcinoma.¹⁷⁷

Imunohistokemijske metode povećavaju točnost i reproducibilnost patohistološke dijagnostike uz znatno rjeđu konačnu dijagnozu nespecificiranog nesitnostaničnog karcinoma (NSCLC NOS) u malim uzorcima. Protutijela na TTF-1 za dokaz glandularne i donedavno p63 uz CK5/6 za dokaz pločaste diferencijacije su se pokazala najpouzdanijima u klasifikaciji većine nesitnostaničnih karcinoma, a drugi mogući pristup je korištenje panela nuklearnih i citoplazmatskih biljega, npr. TTF-1/CK 5/6 ili p63/napsin A.^{178, 179, 180} Godine 2012. Bishop i sur. dokazali su jednaku osjetljivost, ali znatno veću specifičnost protutijela p40 u odnosu na p63 u određivanju pločaste diferencijacije.¹⁸¹

Još uvijek se oko 70% nesitnostaničnih karcinoma pluća dijagnosticira u inoperabilnim stadijima bolesti i stoga veliki uzorci tumorskog tkiva dobiveni resekcijom najčešće nisu dostupni za preciznu patohistološku analizu, te se većina tumora utvrđuje u uzorcima transbronhalnih bioptata i/ili, posebice u u slabije opremljenim centrima, uzorcima obrisaka četkicom i/ili bronhalnih aspirata, rjeđe transtorakalnih bioptata ili iglenih citopunkcija. Preporuke Svjetske Zdravstvene Organizacije iz 2015. godine o klasifikaciji karcinoma pluća ne odnose se samo na resecirane tumore, već i na transbronhalne biopate i uzorke za citološku analizu.¹⁸²

Među našim uzorcima prvotno klasificiranima kao adenokarcinom dijagnoza je potvrđena imunohistokemijskim metodama u 83%, dok je u čak 17% slučajeva dijagnoza revidirana i time je potvrđena korisnost imunohistokemijskih metoda u rutinskoj dijagnostici karcinoma pluća. Među reklasificiranim tumorima najviše ih je klasificirano u metastatski adenokarcinom (9.4%), 3.7% u karcinom pločastih stanica, a 3.7% u karcinom s vjerojatno istodobnom žljezdanom i pločastom diferencijacijom uz napomenu provedenog imunohistokemijskog bojanja. Naime, dijagnoza adenoskvamoznog karcinoma smije se postaviti samo na reseciranom uzorku uz uvjet barem 10%-tne zastupljenosti obje sastavnice.¹⁸³ Među našim uzorcima nije bilo tumora istovremeno negativnih na biljege pločaste i žljezdane diferencijacije, a među tumorima koji su pokazivali koekspresiju obje vrste biljega ona je bila izražena fokalno (difuzna ekspresija žljezdanih biljega unatoč koekspresiji p63 sugerirala bi dijagnozu adenokarcinoma).

Sukladno ranijim podacima Yatabea i sur. imunoreaktivnost adenokarcinoma na TTF-1 u našem istraživanju pokazivala je bimodalnu distribuciju: pozitivna reakcija očitana je u 41.5%

slučajeva, dok je u preostalima potpuno izostala.¹⁸⁴ U Yatabeovoj seriji koja se sastojala od 64 bioptata adenokarcinoma pluća, TTF-1 je bio pozitivan u 73%, češće kod žena i nepušača, te uz negativno bojanje na p53, dok je u također malenoj seriji Nicholsona i sur. TTF-1 bio pozitivan u 13 od 16 bioptata (81%) konačno klasificiranih kao adenokarcinom.¹⁷⁹ Kadota i sur. su ispitivali ekspresiju TTF-1 u mikrozovima tumorskih blokova.¹⁸⁵ Ovisno o histološkom tipu tumora i stupnju diferencijacije, imunoreaktivnost na TTF-1 dokazana je 47% invazivnih mucinoznih karcinoma, 67% adenokarcinoma s koloidnom predominacijom, pa sve do 100% u minimalno invazivnom adenokarcinomu ili karcinomu s lepidičkom predominacijom. Treba naglasiti da su svi ispitivani adenokarcinomi u njihovoj seriji bili u I stadiju bolesti prema TNM klasifikaciji.

Subklasifikacijom nesitnostaničnih karcinoma Mukhopadhyay i sur. opisali su imunoreaktivnost na napsin A u 58% adenokarcinoma pri čemu su svi oni bili pozitivni i na TTF-1.¹⁸⁰ Bishop i sur. dokazali su imunoreaktivnost na napsin A u 83% adenokarcinoma (u komparaciji s 73% tumora pozitivnih na TTF-1), a neuroendokrini tumori, metastaze adenokarcinoma kolona, gušterače i dojke te mezoteliom bili su napsin A negativni.¹⁸⁶ Napsin A je proteaza koja se normalno nalazi u lizosomima pneumocita tipa II i alveolarnim makrofazima, ali i proksimalnim i zavijenim kanalićima bubrega, te manje u pankreatičnim acinusima i duktusima, nije specifičan za adenokarcinom pluća i može biti pozitivan u karcinomu bubrega, karcinomu endometrija, ovarija i štitnjače.¹⁸⁷ Najveća mu je vrijednost pomoć interpretaciji TTF-1-negativnih adenokarcinoma, odnosno u distinkciji pločastog karcinoma u kojem je redovito negativan.^{188, 189} U niže diferenciranom adenokarcinomu zabilježena je slabija imunoreaktivnost.¹⁹⁰

U našem uzorku bojanje protutijelom na napsin A bilo je pozitivno u 45.33% adenokarcinoma, pri čemu su svi tumori pozitivni na napsin A bili ujedno i pozitivni na CK7, a 90% i na TTF-1. Drugim riječima, bojanje protutijelom na napsin A ovdje nije dodatno pridonijelo dijagnostičkoj preciznosti. S druge strane, u čak 91.89% uzoraka adenokarcinoma dokazali smo imunoreaktivnost na CK7. Sva tri biljega, TTF-1, napsin A i CK7 bila su pozitivna u 29.5% adenokarcinoma. Navedeni rezultati ukazuju da je imunohistokemijska analiza adenokarcinoma u korištenim uvjetima pouzdana uz panel protutijela na TTF-1 i CK7 uz dodatak napsina A za dodatnu potvrdu dijagnoze i identifikaciju adenokarcinoma negativnih na ostale biljege žljezdane diferencijacije.

Uzorci reklasificirani kao karcinomi s pločastom diferencijacijom nisu pokazali imunoreaktivnost na TTF-1, ali su bili homogeno nuklearno pozitivni na p63 (100%) i citoplazmatski na CK5/6 (91.8%, odnosno 45/49 tumora) i u slučajevima slabo diferenciranih tumora.

Očekivano, imunohistokemijskim metodama dijagnoze pločastog kao niti sitnostaničnog karcinoma nisu revidirane u statistički značajnom broju.

Donedavno široko preporučivan monolitni princip klasifikacije malih bioptičkih uzoraka na nesitnostanične, sitnostanične i uzorke koje nije moguće drugačije klasificirati (NOS, *engl. not-otherwise specified*, često klasificiran kao velikostanični karcinom) temeljen na morfološkoj analizi preparata rezultirao je s vremenom porastom udjela nespecificiranih nesitnostaničnih karcinoma. Analizom velikog broja uzoraka utvrđen je gotovo dvostruki porast učestalosti nespecificiranih nesitnostaničnih karcinoma u razdoblju od 1989. do 2006. godine te je upravo ta konačna dijagnoza postavljena u 20-40% svih nesitnostaničnih karcinoma.¹⁹¹

U našem uzorku velikostaničnih karcinoma uporabom panela protutijela svi su tumori reklasificirani: 52% u adenokarcinom (26/50), 26% u pločasti karcinom (13/50), 2% u sitnostanični karcinom (1/50), a preostalih 20% uzoraka je konačno dijagnosticirano kao nespecificirani karcinom s negativnim biljezima TTF-1, CK7, napsin A, CK5/6 i p63. Drugim riječima, dijagnoza nespecificiranog karcinoma postavljena je u 5.41% (10/185) slučajeva od ukupnog broja promatranih uzoraka karcinoma pluća.

Zaključno, uporaba imunohistokemijskih metoda značajno povisuje točnost i reproducibilnost patohistološke dijagnostike adenokarcinoma pluća. Temeljem naših rezultata proizlazi dostatnost trojnog panela protutijela na TTF-1, CK7 i p63 za nesitnostanične, odnosno protutijela na CD56 uz odgovarajuću morfološku sliku za sitnostanične karcinome uz napomenu dodatne koristi uključivanja napsina A u slučaju TTF-1/CK7-negativnih adenokarcinoma, odnosno za potvrdu dijagnoze adenokarcinoma pluća. Uključivanje većeg broja protutijela opravdano je u nejasnim slučajevima. Naime, od iznimne važnosti je čuvanje maksimalne raspoložive količine uzoraka za buduće analize.

Učestalost pojave različitih genskih mutacija u karcinomu pluća je među najčešćima od svih humanih malignih tumora.^{192, 193} Mutacije receptora EGFR ili fuzijske bjelančevine ALK

primjeri su genskih mutacija na kojima se temelji usmjereno liječenje inhibitorima tirozinske kinaze erlotinibom, gefitinibom ili afatinibom odnosno krizotinibom ili ceritinibom. Nadalje, učestale su mutacije tumorsko-supresorskih gena, primjerice TP53 i serinsko-treoninske kinaze LKB1.^{194, 102} Osim toga, kompleksnu sliku genskih mutacija u karcinomu pluća dodatno nadopunjuju tzv. usputne mutacije (*engl. passenger mutations*) koje ne sudjeluju izravno u inicijaciji tumora, ali mogu imati utjecaj na terapijski odgovor i progresiju bolesti.

Mutacije gena koji sudjeluju u regulaciji procesa epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) mogu zahvaćati niz transkripcijskih čimbenika odnosno signalnih molekula međusobno isprepletenih aktivacijskih sustava kao što su superobitelj TGF- β , Wnt, Notch, Shh, c-Met, put EGFR ili receptora čimbenika rasta fibroblasta (FGFR) itd.

Upravo započinjanje epitelno-mezenhimske tranzicije u pojedinačnim stanicama ili manjoj nakupini stanica najčešće u rubnim područjima primarnog tumora omogućuje invaziju tumorske okoline i udaljeno metastaziranje. Proces vjerojatno ne zahvaća cijelu tumorsku populaciju, iako je to pitanje još uvijek otvoreno.¹⁹⁵ Stanice u početku imaju istovremeno obilježja epitela i mezenhima, no napredovanjem tranzicije stječu vretenstu morfologiju s migratornim protruzijama koje im omogućuju intravazaciju i kasniju ekstravazaciju na udaljenim lokalizacijama, mijenjaju diferencijacijske biljege i funkcijske značajke. Nadalje, proces koloniziranja i nastanka mikrometastaza nužno uključuje ponovno reprogramiranje u novom mikrookolišu i mezenhimsko-epitelnu tranziciju (MET).

Regulatorna bjelančevina NEDD9 sudjeluje u staničnom ciklusu aktivirajući Aurora A kinazu tijekom tranzicije G2 u M fazu i nužna je za pravilno odvajanje centrosoma (pogreške ove točke stanične diobe sankcionirane su u normalnim uvjetima staničnim arestom i akceleriranom apoptozom).¹⁴⁰ Osim regulacije staničnog ciklusa, sudjeluje u razvoju imunološkog, centralnog i perifernog živčanog sustava, adheziji osteoklasta za koštani matriks i kemotaksiji limfocita T i B.^{140, 196, 197} NEDD9 smješten na mjestima fokalnih adhezija funkcionira kao mehanosenzor, izravno nadzire integritet aktinskog citoskeleta i staničnu migraciju: njegova ekspresija povezana je s pojačanom migracijom stanica na dvodimenzionalnim, ali i trodimenzionalnim podlogama i gubitkom međustaničnih sveza.¹⁹⁸ U procesu epitelno-mezenhimske tranzicije funkcionira kao svojevrsni mrežni čvor u kojem konvergiraju različiti signalni putovi (slično kao TGF- β i Wnt). Sastoji se od 834 aminokiseline podijeljene u četiri domene koje uglavnom funkcioniraju kao aktivna vezna mjesta temeljem čega NEDD9 sudjeluje u determiniranju aktivacije i trajanja nizvodnih signalnih putova, a također lateralno aktivira signalni put EGFR

(EGFR, Ras, Rac, JNK, ERK1/2).^{130, 131, 201, 202} Nakon aktiviranja integrinom NEDD9 ekstenzivno fosforiliran fokalnom adhezijskom kinazom FAK, kinazama obitelji SRC ili ABL na mjestima kontakta s izvanstaničnim matriksom inducira staničnu migraciju. Uzvodni stimulusi fosforilacije NEDD9 su brojni: hipoksija, aktivacija kemokinskih receptora i različitih tirozinskih kinaza. Razina ekspresije NEDD9 u stanicama je strogo kontrolirana na transkripcijskoj razini i proteolizom kaspazama i sustavom proteasoma. Hiperekspresija u normalnim stanicama rezultira programiranom staničnom smrću, te su za toleranciju na pojačanu ekspresiju NEDD9 u malignoj transformaciji nužne prethodno stečene genetske ili epigenetske promjene.¹⁹⁹

Godine 2006. Kim i sur. dokazali su ključnu ulogu NEDD9 u progresiji, invaziji i metastaziranju malignog melanoma putem signalnog sustava Ras, a godinu dana kasnije Natarajan i sur. imenovali su ga kao nužni i specifični nizvodni medijator adhezijske kinaze FAK u glioblastomu.^{168, 161} NEDD9 je hiperekspimiran u staničnim linijama karcinoma dojke gdje inicira epitelno-mezenhimsku tranziciju i aktivira signalni put ERK-Snail/Slug.¹⁶⁰ Nadalje, kod *Nedd9*^{-/-} miševa značajno je reducirana ukupna masa karcinoma dojke, odgođeno vrijeme nastanka tumora u odnosu na divlji tip, manji je broj i sporiji rast neovisnih tumora, a utvrđen je i trend reduciranog metastaziranja u pluća.¹⁵⁹ U maloj seriji od deset staničnih linija kolorektalnog karcinoma Li i sur. opisali su dvostruko višu razinu HEF1/NEDD9 u odnosu na normalno tkivo i u paralelnoj skupini od 40 tumora dokazali korelaciju mRNA HEF1/NEDD9 i gradusa tumorske diferencijacije.¹⁶²

Malobrojne studije dosad su se bavile ekspresijom NEDD9 u karcinomu pluća. Na mišjem modelu karcinoma pluća inaktivacija serinsko-treoninske kinaze LKB1 nađena u 34% induciranih adenokarcinoma i 19% induciranih pločastih karcinoma izaziva aktivaciju nizvodnih gena za višestruke promotore metastaziranja uključujući NEDD9, dok se reeksprimiranjem LKB1 ekspresija NEDD9 smanjuje.¹⁷³

U ovom istraživanju ispitana je razina ekspresije NEDD9 u uzorcima transbronhalnih bioptata čije su dijagnoze prvotno potvrđene imunohistokemijskim metodama i razvrstane u podskupine adenokarcinoma, pločastog i sitnostaničnog karcinoma. Ekspresija je mjerena semikvantitativno pri čemu je promatran postotak pozitivnih tumorskih stanica te intenzitet bojanja protutijelom kao i razine ekspresije u staničnim odjeljcima - jezgri i citoplazmi. Sukladno podacima iz literature, utvrđena je ekspresija NEDD9 u jezgri i citoplazmi ispitivanih podskupina karcinoma pluća (adenokarcinoma, karcinoma pločastih stanica, ali i sitnostaničnog

karcinoma) uz visoke koeficijente korelacije, odnosno visoku povezanost između različitih mjerenja. Naime, dinamička razmjena molekula kao što je NEDD9 između spremišta u citoplazmi i o integrinu ovisnih fokalnih adhezija predstavlja osnovu moduliranja stanične migracije, a jednako tako NEDD9 se koncentrira u području centrosoma i diobenog vretena tijekom stanične diobe s vrškom na prijelazu G2 u M fazu.¹⁴⁰ Chang i sur. su 2012. god. u seriji od 60 reseciranih adenokarcinoma pluća također utvrdili ekspresiju u oba stanična odjeljka.²⁰⁰ Osim u adenokarcinomu, nekoliko je autora dosad ispitalo ekspresiju NEDD9 u nesitnostaničnom karcinomu: Feng i sur. su 2012. god. objavili studiju 175 reseciranih nesitnostaničnih karcinoma (od toga 53 karcinoma pločastih stanica) kojom su pojačanu ekspresiju NEDD9 pokazali u 67.8% adenokarcinoma i 66.7% pločastih karcinoma, a godinu dana kasnije Miao i sur. su utvrdili umjerenu ili jaku ekspresiju NEDD9 u 56.2% reseciranih nesitnostaničnih karcinoma (od ukupno 105 uzoraka, 43 uzorka su klasificirani kao pločasti karcinom).^{173, 175} U svom istraživanju objavljenom 2013. god. Jin i sur. su se fokusirali na inverzni odnos ekspresije NEDD9 i epitelnog biljega EMT E-kadherina, no i ondje je NEDD9 bio pojačano eksprimiran u 68%, a slabo u 32% reseciranih nesitnostaničnih karcinoma pluća.²⁰¹ Niti u jednom od navedenih radova nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji NEDD9 između pločastog karcinoma i adenokarcinoma, pa tako niti u našem istraživanju. Međutim, po prvi puta smo utvrdili ekspresiju NEDD9 u sitnostaničnom karcinomu.

Sitnostanični karcinom sastoji se od malih stanica s stanica s oskudnim citoplazmama i hiperkromatskim jezgrama koje su okruglastog, ovalnog ili ponekad vretenastog oblika što upućuje na slabiju adheziju za okolinu. U staničnim linijama izrazito su heterogene pri čemu ih većina raste u plutajućim staničnim nakupinama uz manju subpopulaciju adherentnih stanica.²⁰² Navedene karakteristike nalikuju onima tipičnima za epitelno-mezenhimsku tranziciju. Također, sitnostanični karcinom odlikuje se velikim metastatskim potencijalom i visokom stopom rekurencije. Ito i sur. analizirali su subpopulacije staničnih linija sitnostaničnog karcinoma, posebno linije NCI-H69 i NCI-H69V i dokazali povišenu ekspresiju transkripcijskih čimbenika EMT Zeb1, Snail/Snail, Slug/Snail2 i FSP uz značajnu redukciju ekspresije E-kadherina (tipičnog biljega EMT) u liniji NCI-H69V. Iako je ekspresija mRNA pokazivala samo tendenciju u smjeru mezenhimskog fenotipa, na razini bjelančevima razlika je dosegla statističku značajnost. Štoviše, nakon 48-satne inkubacije s etopozidom u staničnoj liniji s osobinama EMT bilo je 81% i dalje vijabilnih stanica u komparaciji s 88% u kontrolnoj skupini što upućuje na ulogu EMT u rezistenciji na lijekove.²⁰³

Među bolesnicima istog histološkog tipa i TNM stadija karcinoma pluća postoji izrazita varijabilnost trajanja razdoblja bez napredovanja bolesti (engl. *progression-free survival*) i preživljenja. U podlozi te varijabilnosti je izrazita genska heterogenost karcinoma pluća, ali također i heterogenost unutar istog tumora uslijed klonalnih i subklonalnih mutacija i epigenetskih interakcija s mikrokolišem. U ovom istraživanju su se biljezi žljezdane diferencijacije napsin A i CK7 pokazali kao prognostički čimbenici dužeg preživljenja u skladu s podatkom iz literature da bolesnici s pločastim karcinomom imaju kraće preživljenje nego oni s adenokarcinomom nakon kirurške resekcije.²⁰⁴ U retrospektivnoj studiji Kawasea i sur. također je utvrđena značajna razlika u ukupnom preživljenju pločastog i adenokarcinoma što je objašnjeno većim udjelom T2-T4 tumora s umjerenom ili slabom diferencijacijom, većim metastaziranjem u limfne čvorove i vaskularnom invazijom te dominantno starijom muškom i pušačkom populacijom s pločastim karcinomom.²⁰⁵

Prethodno spomenutim istraživanjem Fenga i sur. na reseciranim uzorcima nesitnostaničnog karcinoma utvrđena je korelacija visoke ekspresije NEDD9 s metastaziranjem u limfne čvorove i uznapredovalim kliničkim stadijem bolesti (povezanost s veličinom primarnog tumora niti podtipom karcinoma nije dokazana). Pritom je ekspresija klasificirana slijepo u visoku ili nisku. Miao i sur. su također dokazali korelaciju visoke ekspresije NEDD9 (definiranu kao višu od one u normalnom plućnom tkivu na rubu reseciranog uzorka) s metastaziranjem u limfne čvorove i preživljenjem, ali ne i TNM stadijem ili stupnjem diferenciranosti tumora. U našem istraživanju korelacija ekspresije NEDD9 nije dosegla statističku značajnost, no uočen je trend (odnosno granično značajan uzorak) dužeg preživljenja u podskupinama bolesnika s visokom ekspresijom NEDD9. Objašnjenje za ovu razliku proizlazi iz heterogenosti našeg uzorka: u ovom istraživanju analizirani su uzorci transbronhalnih bioptata, a ne isključivo uzorci karcinoma reseciranog u stadiju I-III A (IIIB). Nadalje, proces epitelno-mezenhimske tranzicije započinje rano u tumorskoj bolesti i vjerojatno se mijenja stjecanjem metastatske signature pri čemu uloga NEDD9 i ostalih biljega EMT nije razjašnjena. Primjerice, Minn i sur. utvrdili su povezanost trostrukog sniženja NEDD9 i metastatskog fenotipa u karcinomu dojke.²⁰⁶ Može se pretpostaviti da agresivni tumori mogu tolerirati visoku ekspresiju NEDD9 nužnu za formiranje lamelopodija (u svrhu migracije) i invadopodija (u svrhu stanične invazije) koja u normalnoj stanici rezultira apoptozom samo uz prethodnu aktivaciju sekundarnih mutacija koje trajno aktiviraju antiapoptotske mehanizme, primjerice signalnim sustavom Ras.

S druge strane, metastaziranje zahtijeva stvaranje staničnih sveza i proces mezenhimsko-epitelne tranzicije u kojem ekstenzivna aktivacija EMT vjerojatno više nije potrebna.

Zasad dostupni podaci o procesu EMT u karcinomu pluća (uglavnom adenokarcinomu), pa tako i njezinu biljegu NEDD9, proistječu iz pojedinačnih studija na malom broju uzoraka. U ovom istraživanju ekspresija NEDD9 dokazana je u adenokarcinomu, karcinomu pločastih stanica i sitnostaničnom karcinomu. Međutim, ostaje otvoreno pitanje može li se proces epitelno-mezenhimske tranzicije u karcinomu pluća inhibirati specifičnom monoterapijom (primjerice usmjerenom na NEDD9).

Precizna onkološka terapija u budućnosti će vjerojatno uključivati kombinacije lijekova strukturirane prema multikomponentnoj signaturi tumora. Primjerice, Carretero i sur. dokazali su integriranjem genomičke i proteomičke analize primarnih mišjih adenokarcinoma s delecijom *Lkb1* hiperfosforilaciju supstrata SRC kinaze (kompatibilnu s pojačanom ekspresijom NEDD9) i potom superiornu stopu tumorske regresije uz trojnu kombinaciju dasatiniba (inhibitora SRC kinaze), inhibitora MEK1/2 i inhibitora PI3K-mTOR signala u odnosu na monoterapiju dasatinibom ili dvojnu terapiju.²⁰⁷ Za bolje razumijevanje evolucije tumorskih procesa i razvoj tzv. precizne onkologije potrebna su buduća istraživanja ujednačena prema kriterijima standardizirane procjene ekspresije biljega u kontekstu histološkog tipa tumora, stadija bolesti, ali i koekspresije biljega različitih signalnih putova ovisno o trajanju bolesti i primijenjenoj terapiji.

Poteškoće u tumačenju brojnih međusobnih mehanizama povratne sprege između signalnih putova moguće je nadići uniformiranjem raspoloživih informacija u jedinstvene širokodostupne baze podataka koje mogu predstavljati osnovu za izradu matematičkih prognostičkih modela.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata dobivenih ovim istraživanjem može se zaključiti:

1. Reklasifikacijom uzoraka transbronhalnih bioptata karcinoma pluća uporabom imunohistokemijskih metoda dijagnoza je promijenjena u 17% adenokarcinoma, 7.5% sitnostaničnih karcinoma i 2% pločastih karcinoma. Reklasifikacijom adenokarcinoma imunohistokemijskim metodama dobivena je statistički značajna razlika ($p=0,005$ uz Yatesovu korekciju X^2 testa), za razliku od sitnostaničnih karcinoma ($p=0,126$) i pločastih karcinoma ($p=0,995$). Svi uzorci velikostaničnih karcinoma su reklasificirani: 52% u adenokarcinom, 26% u pločasti, 2% u sitnostanični karcinom, a preostalih 20% uzoraka konačno dijagnosticirano kao nespecificirani karcinom sa svim negativnim biljezima.
2. Od ukupnog broja potvrđenih adenokarcinoma bojanje napsinom A bilo je pozitivno u 45.33% uzoraka, dok je bojanje na TTF-1 bilo pozitivno u 53.95% i pritom je 90% tumora pozitivnih na napsin A bilo istovremeno pozitivno na TTF-1 te bojanje napsinom A nije značajno doprinijelo postavljanju dijagnoze ($p=0,289$).
3. Od svih tumora s dokazanom žljezdanom diferencijacijom CK7 je bio pozitivan u 91.89% slučajeva dok je bojanje napsinom A bilo je pozitivno u 45.33% ($p<0,001$). Svi tumori pozitivni na napsin A bili su istovremeno pozitivni i na CK7 te bojanje napsinom A nije značajno doprinijelo postavljanju dijagnoze.
4. Bojanje napsinom A bilo je pozitivno u samo 5.0% karcinoma pločaste diferencijacije s visokom statističkom razlikom u odnosu na adenokarcinom ($p<0,001$).
5. Utvrđena je ekspresija NEDD9 u jezgri i citoplazmi adenokarcinoma, pločastog karcinoma i sitnostaničnog karcinoma. Pritom je citoplazmatska ekspresija bila statistički značajno ($p<0,001$) izraženija semikvantitativnom metodom i jačeg intenziteta bojanja ($p<0,001$) u svim tipovima tumora uz visoke koeficijente korelacije za obje metode od 0,896 u jezgri odnosno 0,748 u citoplazmi, čime je potvrđena visoka povezanost između mjerenja ekspresije različitim metodama.
6. Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije NEDD9 i preživljenja u različitim tipovima karcinoma pluća. Međutim, uočen je ponegdje statistički granično značajan uzorak koji sugerira duže preživljenje u skupinama adenokarcinoma s vrlo izraženom ekspresijom NEDD9.

8. SAŽETAK

Karcinom pluća objedinjuje zloćudne tumore nastale brojnim genetskim i epigenetskim promjenama epitelnih stanica bronha, bronhiola i alveola i predstavlja najčešći uzrok smrti među malignim bolestima. Također, karcinom pluća obuhvaća iznimno širok patohistološki i molekularni spektar, a točna klasifikacija temelj je individualiziranog pristupa u liječenju. Rezultati ovog rada ukazuju na korisnost uporabe imunohistokemijskih metoda koje značajno povisuju točnost i reproducibilnost patohistološke dijagnostike adenokarcinoma pluća ($p=0,005$). Nadalje, dijagnoza nespecificiranog karcinoma postavljena je u samo 5.41% slučajeva od ukupnog broja promatranih uzoraka karcinoma pluća. Bojanje napsinom A nije se pokazalo superiornim u dokazivanju žljezdane diferencijacije u odnosu na TTF-1: od 45.33% adenokarcinoma s pozitivnim napsinom A, njih 90% istovremeno je bilo pozitivno na TTF-1, $p=0,289$), a također niti u odnosu na CK7 koji je bio pozitivan u 91.89% svih uzoraka adenokarcinoma ($p<0,001$). S druge strane, pozitivna reakcija na napsin A nađena je u samo 5% pločastih karcinoma ($p<0,001$), što upućuje na visoku specifičnost i potencijalnu korisnost u interpretaciji nalaza tumora s negativnim ili dvojbenim bojanjem na ostale biljege žljezdane diferencijacije.

Regulatorna bjelančevina NEDD9 integralna je sastavnica normalne i patološki promijenjene stanične biologije sudjelovanjem u kontroli migracije i kemotaksije, apoptoze, staničnog ciklusa i diferencijacije te funkcionira kao mrežni čvor u kojem međusobno konvergiraju različiti signalni putovi epiteln-mezenhimske tranzicije. Njegova aktivacija je ključni događaj u stjecanju metastatskog potencijala u adenokarcinomu dojke, agresivnom glioblastomu i malignom melanomu. Ekspresija NEDD9 potvrđena je u uzorcima transbronhalnih bioptata u staničnoj jezgri i citoplazmi adenokarcinoma, karcinoma pločastih stanica i sitnostaničnog karcinoma, što sugerira važnost aktivacije procesa epiteln-mezenhimske tranzicije u različitim tipovima karcinoma pluća. Citoplazmatska ekspresija NEDD9 bila je statistički značajno izraženija od ekspresije u jezgri svih tipova karcinoma ($p<0,001$). Pritom nije utvrđena nedvojbeno povezanost ekspresije NEDD9 s preživljenjem.

Ključne riječi: karcinom pluća, NEDD9, transbronhalni bioptat

9. SUMMARY

Prognostic significance of NEDD9 in small biopsies of lung cancer

Jelena Ostojić, 2018.

Lung cancer is the major cause of cancer mortality worldwide and includes several histologic subtypes evolving from numerous genetic and epigenetic changes emerging in alveolar, bronciolar and bronchial epithelium. Precise histologic diagnosis is the cornerstone of the individualised treatment of lung cancer.

Here we have demonstrated significantly higher accuracy and reproducibility of the diagnosis using immunohistochemistry in transbronchial biopsies of lung adenocarcinoma ($p=0,005$). Also, only 5.41% of all samples was finally diagnosed as NSCC NOS. Positivity for napsin A was seen in 45.33% of all adenocarcinoma samples along with consistant coexpression of TTF-1 in 90% of cases ($p=0,289$). As for CK7, homogenous immunoreactivity showed in 91.89% of all adenocarcinomas, and therefore staining for napsin A wasn't proven superior to neither CK 7 nor TTF-1 in adenocarcinoma immunotyping. Nevertheless, napsin A was negative in 95% of squamous cell carcinoma samples and consequently may be useful as an additional marker of glandular differentiation in less clear immunoprofiles ($p<0,001$).

Regulatory protein NEDD9 is involved in control of migration chemotaxis, apoptosis, cell cycle and cellular differentiation, playing the role of the hub-protein in the complex process of epithelial-mesenchimal transition. NEDD9 has recently been identified as integral part of aquisition of metastatic potential in mammary adenocarcinoma, glioblastoma and metastatic melanoma. We have demonstrated both nuclear and cytoplasmatic expression of NEDD9 in transbronchial biopsies of lung adenocarcinoma, squamous carcinoma and also small cell carcinoma indicating the activation of the epithelial-mesenchimal transition in different lung cancer subtypes. Cytoplasmatic expression of NEDD9 was higher in comparison to nuclear in all carcinoma subtypes ($p<0.001$). The direct relationship between the expression of NEDD9 and survival wasn't established.

Keywords: Lung cancer, NEDD9, transbronchial biopsy

10. LITERATURA

1. Stewart B, Wild CP. World Cancer Report 2014. ePUB. [13.12.2016.]
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, i sur. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.
3. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, i sur. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*. 2012;13:607-15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.
4. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ, Lipowicz PJ, Appleton S. Time trends in never smokers in the relative frequency of the different histological types of lung cancer, in particular adenocarcinoma. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;74:12-22. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.11.016.
5. Lee PN, Forey BA. Indirectly estimated absolute lung cancer mortality rates by smoking status and histological type based on a systematic review. *BMC Cancer*. 2013;13:189. doi: 10.1186/1471-2407-13-189.
6. Recent trends in lung cancer incidence, mortality and survival. dostupno na: www.ncin.org.uk/databriefings [13.12.2016.]
7. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak, Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. godine, Zagreb 2016. godine, bilten br. 39.
8. Yang J, Zhu J, Zhang YH, Chen YS, Ding LL, Kensler TW, i sur. Lung cancer in a rural area of China: rapid rise in incidence and poor improvement in survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(16):7295-302.
9. Liu BQ, Peto R, Chen ZM, Boreham J, Wu YP, Li JY, i sur. Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *BMJ*. 1998;317(7170):1411-22.
10. International agency for research on cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. volume 83: tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon, France, 2004.
11. Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1992;52(9 Suppl):2670s-2676s.

-
12. Gately, I. Tobacco: a cultural history of how an exotic plant seduced civilization. Grove Press, 2003.
 13. Müller, F. H. Tabakmissbrauch und Lungencarcinom. *Z. Krebsforsch.* 1940;49:57–85.
 14. Doll R, Hill A. Smoking and carcinoma of the lung. Preliminary report. *BMJ.* 1950:739-48.
 15. Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchogenic carcinoma. *JAMA.* 1950;143:329-36.
 16. Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service. Public Health Service Publication No. 1103 United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General, 1969.
 17. Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest.* 1997;112(6):1474-9.
 18. Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, i sur. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non–small cell lung carcinoma. *Thorax.* 2004;59(8):679–81. doi:10.1136/thx.2003.018291.
 19. Tomassetti S, Gurioli C, Ryu JH, Decker PA, Ravaglia C, Tantalocco P, i sur. The impact of lung cancer on survival of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2015;147(1):157-64. doi: 10.1378/chest.14-0359.
 20. Katabami M, Dosaka-Akita H, Honma K, Saitoh Y, Kimura K, Uchida Y, i sur. Pneumoconiosis-related lung cancers: preferential occurrence from diffuse interstitial fibrosis-type pneumoconiosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):295-300. doi: 10.1164/ajrccm.162.1.9906138.
 21. Engels EA. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8:605–15. doi: 10.1586/14737140.8.4.605.
 22. Raviv S, Hawkins KA, DeCamp MM, Kalhan R. Lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(9):1138-46. doi: 10.1164/rccm.201008-1274CI.
 23. Lanphear BP, Buncher CR. Latent period for malignant mesothelioma of occupational origin. *J Occup Med.* 1992;34(7):718–21.
 24. Frost G. The latency period of mesothelioma among a cohort of British asbestos workers (1978–2005). *Br J Cancer.* 2013;109(7):1965–73. doi: 10.1038/bjc.2013.514.
 25. Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan JA, Hamra GB, i sur. Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort

-
- study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). *BMJ*. 2015;351:h5359. doi: 10.1136/bmj.h5359.
26. Xue Y, Harris E, Wang W, Baybutt RC. Vitamin A depletion induced by cigarette smoke is associated with an increase in lung cancer-related markers in rats. *J Biomed Sci*. 2015;22:84. doi: 10.1186/s12929-015-0189-0.
27. Foong RE, Zosky GR. Vitamin D deficiency and the lung: disease initiator or disease modifier? *Nutrients*. 2013;5(8):2880-900. doi: 10.3390/nu5082880.
28. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*. 2000;130(2):129-32.
29. Liu P, Vikis HG, Lu Y. Cumulative effect of multiple loci on genetic susceptibility to familial lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(2):517-24. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0791.
30. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Shin HR, Storm H, Ferlay H, i sur. *Cancer Incidence in Five Continents*. Vol. IX. Lyon: IARC Scientific Publication No. 160.; 2007.
31. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, i sur. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-85. doi: 10.1513/pats.201107-042ST.
32. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, i sur. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
33. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, i sur. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(1):39-51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.:39.
34. Petty TL. Sputum cytology for the detection of early lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9(4):309-12.
35. Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan D, Schwartz M, ur. *Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. Washington DC: AACC Press. 2002;3-8.

-
36. Tan Q, Huang J, Ding Z, Lin H, Lu S, Luo Q. Meta-analysis for curative effect of lobectomy and segmentectomy on non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9): 2599–2604.
37. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, i sur. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2046-54. doi: 10.1200/JCO.2011.38.4032.
38. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Poddubskaya E, Antonia S, i sur. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-35. doi: 10.1056/NEJMoa1504627.
39. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, i sur. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375:1823-833. doi: 10.1056/NEJMoa1606774.
40. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, i sur. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10066):255-65. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X.
41. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanzetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, i sur. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10030):1837-46. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
42. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
43. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, i sur. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(6):828-60. doi: 10.5858/arpa.2012-0720-OA.
44. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, i sur. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets*. 2005;6(3):243-57.
45. Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol*. 2002;29(5 Suppl 14):3-9. doi: 10.1053/sonc.2002.35642.

-
46. Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab Invest.* 2014;94(2):129-37. doi: 10.1038/labinvest.2013.147.
47. Brcic L, Jakopovic M, Misic M, Seiwerth F, Kern I, Smojver-Jezek S, i sur. Analysis of the frequency of EGFR, KRAS and ALK mutations in patients with lung adenocarcinoma in Croatia. *Diagn Pathol.* 2016;11(1):90. doi: 10.1186/s13000-016-0544-9.
48. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT, i sur. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol.* 2014;9:154. doi: 10.1097/JTO.0000000000000033.
49. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, i sur. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol.* 2003;21(12):2237-46. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2004;22(23):4863. doi: 10.1200/JCO.2003.10.038.
50. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ Jr, Prager D, Belani CP, i sur. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2003;290(16):2149-58. doi:10.1001/jama.290.16.2149.
51. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(2):123-32. doi: 10.1056/NEJMoa050753.
52. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(5):339-46. doi: 10.1093/jnci/dji055.
53. Sakurada A, Shepherd FA, Tsao MS. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: impact of primary or secondary mutations. *Clin Lung Cancer.* 2006;7(S4):S138-44.
54. Gong Y, Somwar R, Politi K, Balak M, Chmielecki J, Jiang X, i sur. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med.* 2007;4(10):e294. doi: 10.1371/journal.pmed.0040294.

-
55. Wei Y, Zou Z, Becker N, Anderson M, Sumpter R, Xiao G, i sur. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell*. 2013;154(6):1269-84. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.015.
56. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, i sur. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2240-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
57. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, i sur. Prevalence, clinicopathologic associations and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(18):4910-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0912.
58. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res*. 1992;52(S9):2665s-2669s.
59. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, Nafa K, i sur. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5731-4. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0646.
60. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, i sur. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6169-77. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3265.
61. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, i sur. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2005;92(1):131-9. doi:10.1038/sj.bjc.6602258.
62. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, Jänne PA, Pignon JP, Graziano S, i sur. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2173-81. doi: 10.1200/JCO.2012.48.1390.
63. Johnson ML, Sima CS, Chaft J, Paik PK, Pao W, Kris MG, i sur. Association of KRAS and EGFR mutations with survival in patients with advanced lung adenocarcinomas. *Cancer*. 2013;119(2):356-62. doi: 10.1002/cncr.27730.
64. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, i sur.

-
- Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol.* 2005;23(25):5900-9. doi: 10.1200/JCO.2005.02.857.
65. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, *i sur.* Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant K-Ras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med.* 2008;14(12): 1351–6. doi: 10.1038/nm.1890.
66. Litvak AM, Paik PK, Woo KM, Sima CS, Hellmann MD, Arcila ME, *i sur.* Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2014;9(11):1669-74. doi: 10.1097/JTO.0000000000000344.
67. Gautschi O, Milia J, Cabarro B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, *i sur.* Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer: Results from the European EURAF Cohort. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1451-7. doi: 10.1097/JTO.0000000000000625.
68. Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, *i sur.* Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2008;68(14):5524-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0099.
69. Broers JL, Viallet J, Jensen SM, Pass H, Travis WD, Minna JD, *i sur.* Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9(1):33-43. doi: 10.1165/ajrcmb/9.1.33.
70. Nau MM, Brooks BJ Jr, Carney DN, Gazdar AF, Battey JF, Sausville EA, *i sur.* Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(4):1092-6.
71. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, *i sur.* PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res.* 2008;68(17):6913-21. doi: 10.1158/0008-5472.
72. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007;12(1):9-22. doi: 10.1016/j.ccr.2007.05.008.
73. Soria JC, Lee HY, Lee JI, Wang L, Issa JP, Kemp BL, *i sur.* Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res.* 2002;8(5):1178-84.

-
74. Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, i sur. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum Pathol*. 2005;36(7):768-76. doi:10.1016/j.humpath.2005.05.006.
75. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, i sur. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol*. 2011;22(12):2616-24. doi: 10.1093/annonc/mdr489.
76. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, i sur. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3(75):75ra26. doi: 10.1126/scitranslmed.3002003.
77. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, i sur. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*. 1995;9(4):401-6. doi: 10.1038/ng0495-401.
78. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, i sur. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005;436(7047):117-22. doi: 10.1038/nature03664.
79. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, i sur. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet*. 2007;39(5):655-60. doi: 10.1038/ng2006.
80. Bingle CD. Thyroid transcription factor-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(12):1471-3.
81. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK⁺ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110:2259–67. doi: 10.1182/blood-2007-04-060715.
82. Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:2081. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1591.
83. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, i sur. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:19893. doi: 10.1073/pnas.0805381105.
84. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, i sur. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4275. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0168.
85. Boland JM, Erdogan S, Vasmatzis G, Yang P, Tillmans LS, Johnson MR, i sur. Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with ALK gene rearrangement and

-
- transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2009;40:1152. doi: 10.1016/j.humpath.2009.01.012.
86. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, *i sur.* Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1018.
87. Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, *i sur.* The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer.* 2009;115(8):1723-33. doi: 10.1002/cncr.24181.
88. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, *i sur.* EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008; 3(1):13-7. doi: 10.1097/JTO.0b013e31815e8b60.
89. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, *i sur.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009; 27(26):4247-53. doi: 10.1200/JCO.2009.22.6993.
90. Kim HS, Lee SE, Bae YS, Kim DJ, Lee CG, Hur J, *i sur.* Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival in patients with resected esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(4):2562-72. doi: 10.18632/oncotarget.2944.
91. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):594-604. doi: 10.1038/nrc864.
92. Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3155-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2223.
93. Tammemagi MC, McLaughlin JR, Bull SB. Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1991;8(7):625-34.
94. Gazzeri S, Della Valle V, Chaussade L, Brambilla C, Larsen CJ, Brambilla E. The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1998;58(17):3926-31.
95. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, *i sur.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature.* 2007;445(7128):661-5. doi: 10.1038/nature05541.

-
96. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, i sur. The Lung Cancer Study Group. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 1993;8(7):1913-9.
97. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol*. 1999;188(4):351-60. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199908)188:4<351::AID-PATH385>3.0.CO;2-W.
98. Sato M, Takahashi K, Nagayama K, Arai Y, Ito N, Okada M, i sur. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44(4):405-14. doi: 10.1002/gcc.20253.
99. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, i sur. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 2000;60(7):1949-60.
100. Ji L, Roth JA. Tumor suppressor FUS1 signaling pathway. *J Thorac Oncol*. 2008;3(4):327-30. doi: 10.1097/JTO.0b013e31816bce65.
101. Deng WG, Kawashima H, Wu G, Jayachandran G, Xu K, Minna JD, i sur. Synergistic tumor suppression by coexpression of FUS1 and p53 is associated with down-regulation of murine double minute-2 and activation of the apoptotic protease-activating factor 1-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(2):709-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3463.
102. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, i sur. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*. 2007;26(40):5911-8. doi: 10.1038/sj.onc.1210418.
103. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, i sur. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell*. 2004;6(1):91-9. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.007.
104. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M, i sur. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell*. 2013;23(2):143-58. doi: 10.1016/j.ccr.2012.12.008.
105. Zhong S, Fields CR, Su N, Pan YX, Robertson KD. Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA

-
- methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene*. 2007;26(18):2621-34. doi: 10.1038/sj.onc.121.0041.
106. Zuco V, Cassinelli G, Cossa G, Gatti L, Favini E, Tortoreto M, i sur. Targeting the invasive phenotype of cisplatin-resistant non-small lung cancer cells by a novel histone deacetylase inhibitor. *Biochem Pharmacol*. 2015;94(2):79-90. doi: 10.1016/j.bcp.2015.01.002.
107. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, i sur. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014.
108. Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, i sur. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol*. 2008;19(6):1053-9. doi: 10.1093/annonc/mdn006.
109. Daniel VC, Peacock CD, Watkins DN. Developmental signaling pathways in lung cancer. *Respirology*. 2006;11(3):234-40. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00838.x.
110. Zardawi SJ, O'Toole SA, Sutherland RL, Musgrove EA. Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer. *Histol Histopathol*. 2009;24(3):385-98. doi: 10.14670/HH-24.385.
111. Haruki N, Kawaguchi KS, Eichenberger S, Massion PP, Olson S, Gonzalez A, i sur. Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res*. 2005;65(9):3555-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3132.
112. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer*. 2007;110(9):1911-28. doi: 10.1002/cncr.22999.
113. Watkins DN, Berman DM, Baylin SB. Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle*. 2003;2(3):196-8.
114. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003;422(6929):313-7. doi: 10.1038/nature01493.
115. Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, i sur. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*. 2007;26(7):1046-55. doi: 10.1038/sj.onc.1209860.

-
116. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7. doi: 10.1126/science.1094291.
117. Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1999;274(51):36734-40.
118. Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, Sidhu SS, Mengistab A, Finkbeiner W, Gallup M, i sur. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer. *PLoS One*. 2006;1:e93. doi:10.1371/journal.pone.0000093.
119. Xu X, Sun PL, Li JZ, Jheon S, Lee CT, Chung JH. Aberrant Wnt1/ β -catenin expression is an independent poor prognostic marker of non-small cell lung cancer after surgery. *J Thorac Oncol*. 2011;6(4):716-24. doi: 10.1097/JTO.0b013e31820c5189.
120. Xu X, Kim JE, Sun PL, Yoo SB, Kim H, Jin Y, i sur. Immunohistochemical demonstration of alteration of β -catenin during tumor metastasis by different mechanisms according to histology in lung cancer. *Exp Ther Med*. 2015;9(2):311-18. doi: 10.3892/etm.2014.2095.
121. He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, Matsangou M, i sur. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia*. 2004;6(1):7-14.
122. Lee JS, Hur MW, Lee SK, Choi WI, Choi WI, Kwon YG, Yun CO. A novel sLRP6E1E2 inhibits canonical Wnt signaling, epithelial-to-mesenchymal transition, and induces mitochondria-dependent apoptosis in lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(5):e36520. doi: 10.1371/journal.pone.0036520.
123. Akiri G, Cherian MM, Vijayakumar S, Liu G, Bafico A, Aaronson SA. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene*. 2009;28(21):2163-72. doi: 10.1038/onc.2009.82.
124. Yang Y, Li H, Hou S, Hu B, Liu J, Wang J. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell. *PLoS One*. 2013;8(5):e65309. doi: 10.1371/journal.pone.0065309.
125. Wang HQ, Xu ML, Ma J, Zhang Y, Xie CH. Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(1):62-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.055.
126. Okamoto J, Hirata T, Chen Z, Zhou HM, Mikami I, Li H, i sur. EMX2 is epigenetically silenced and suppresses growth in human lung cancer. *Oncogene*. 2010;29(44):5969-75. doi: 10.1038/onc.2010.330.

-
127. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:119-46. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.119.
128. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 1982;95(1):333-9.
129. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20.
130. Zuk A, Hay ED. Expression of beta 1 integrins changes during transformation of avian lens epithelium to mesenchyme in collagen gels. *Dev Dyn.* 1994;201(4):378-93doi: 10.1002/aja.1002010409.
131. Boyer B, Thiery JP. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS.* 1993;101(4):257-68.
132. Davies JA. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat (Basel).* 1996;156(3):187-201.
133. Girolodi LA, Bringuier PP, de Weijert M, Jansen C, van Bokhoven A, Schalken JA. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(2):453-8. doi: 10.1006/bbrc.1997.7831.
134. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):84-9. doi: 10.1038/35000034.
135. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62(6):1613-8.
136. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, et al. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene.* 2007;26(49):6979-88. doi: 10.1038/sj.onc.1210508.
137. Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185:1155-61.
138. Law SF, Estojak J, Wang B, Mysliwiec T, Kruh G, Golemis EA. Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase

and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1996;16(7):3327–37.

139. Moreau D, Jacquot C, Tsita P, Chinou I, Tomasoni C, Juge M, i sur. Original triazine inductor of new specific molecular targets with antitumor activity against non small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2008;123:2676–83. doi: 10.1002/ijc.23809.

140. Pugacheva EN and Golemis EA. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol*. 2005;7:937–946. doi: 10.1038/ncb1309.

141. Minegishi M, Tachibana K, Sato T, Iwata S, Nojima Y, Morimoto C. Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med*. 1996;184(4):1365–75.

142. Tikhmyanova N, Little JL, Golemis EA. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(7):1025-48. doi: 10.1007/s00018-009-0213-1.

143. Pugacheva EN, Golemis EA. HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle*. 2006;5(4):384–91. doi: 10.4161/cc.5.4.2439.

144. Fashena SJ, Einarson MB, O'Neill GM, Patriotis CP, Golemis EA. Dissection of HEF1/NEDD9/CAS-L-dependent functions in motility and transcriptional regulation. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 1):99–111.

145. Bui, LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, Mota S, i sur. Nedd9/HEF1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene*. 2009;28(41):3642-51. doi: 10.1038/onc.2009.224.

146. Singh MK, Dadke D, Nicolas E. A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. *Mol Biol Cell*. 2008;19(4):1627–36. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0953.

147. Zheng M, McKeown-Longo PJ. Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF-beta 1 and cell adhesion. *J Biol Chem*. 2007;277(42):39599–608. doi: 10.1074/jbc.M202263200.

148. Liu, X; Elia A E, Law S F, Golemis E A, Farley J, Wang T. A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *EMBO J*. (England). 2000;19(24): 6759–69. doi: 10/19.24.6759.

149. Bradbury P, Bach CT, Paul A, O'Neill GM. Src kinase determines the dynamic exchange of the docking protein NEDD9 (Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-

-
- regulated Gene 9) at focal adhesions. *J Biol Chem.* 2014;289(36):24792–800. doi: 10.1074/jbc.M113.544106.
150. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, i sur. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 2004;6:154–61. doi: 10.1038/ncb1094.
151. Smith LG, Li R. Actin polymerization: riding the wave. *Curr Biol.* 2004;14:R109–11.
152. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, i sur. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer.* 2003;89(6):959-965. doi: 10.1038/sj.bjc.6601252149.
153. Ohashi Y, Iwata S, Kamiguchi K, Morimoto C. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte-type is a critical element in TCR- and beta₁ integrin-induced T lymphocyte migration. *J Immunol.* 1999;163(7):3727–34.
154. Kamiguchi K, Tachibana K, Iwata S, Ohashi Y, Morimoto C. Cas-L is required for beta 1 integrin-mediated costimulation in human T cells. *J Immunol.* 1999;163(2):563–8.
155. Astier A, Manie SN, Law SF, Freedman S. Association of the Cas-Like molecule HEF1/NEDD9/CAS-L with CrkL following integrin and antigen receptor signaling in B cells. Possible relevance to neoplastic lymphohematopoietic cells. *Leuk Lymph.* 1997;28:65–72. doi: 10.3109/10428191709058332.
156. Manie SN, Beck ARP, Astier A, Law SF, Canty T, Hirai H, i sur. Involvement of p130Cas and p105HEF1/NEDD9/CAS-L, a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *J Biol Chem.* 1997;272:4230–4236. doi: 10.1074/jbc.272.7.4230.
157. Law SF, O’Neill GM, Fashena SJ, Einarson MB, Golemis EA. The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol Cell Biol.* 2000;20(14):5184–95.
158. O’Neill GM, Seo S, Serebriiskii IG, Lessin SR, Golemis EA. A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res.* 2007;67(19):8975–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1328.
159. Izumchenko E, Singh MK, Plotnikova OV, Tikhmyanova N, Little JL, Serebriiskii IG, i sur. NEDD9 promotes oncogenic signaling in mammary tumor development. *Cancer Res.* 2009; 69: 7198–206. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0795.

-
160. Kong C, Wang C, Wang L, Ma M, Niu C, Sun X, i sur. NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(7):e22666. doi: 10.1371/journal.pone.0022666.
161. Natarajan M, Stewart Jr JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD, i sur. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene*. 2006;25(12):1721-32. doi: 10.1038/sj.onc.1209199.
162. Li Y, Bavarva JH, Wang Z, Guo J, Qian C, Thibodeau SN, i sur. HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene*. 2011;30(23):2633–43. doi: 10.1038/onc.2010.632.
163. Xia D, Holla VR, Wang D, Menter DG, DuBois RN. Prostaglandin E2 induces Human Enhancer of Filamentation 1 to promote proliferation of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(2):824-31. doi: 10.1158/008-5472.CAN-09-2105.
164. Cui X, Shen K, Xie Z, Liu T, Zhang H. Identification of key genes in colorectal cancer using random walk with restart. *Mol Med Rep*. 2017;15(2):867-872. doi: 10.3892/mmr.2016.6058.
165. Salgia R, Pisick E, Sattler M, Li JL, Uemura N, Wong WK, i sur. p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem*. 1996;271(41):25198–203.
166. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*. 2007;448(7155):807–10. doi: 10.1038/nature06030.
167. Speranza MC, Frattini V, Pisati V, Kapetis D, Porrati P, Eoli M, i sur. NEDD9, a novel target of miR-145, increases the invasiveness of glioblastoma. *Oncotarget*. 2012;3(7):723–34. doi: 10.18632/oncotarget.547.
168. Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, i sur. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell*. 2006;125(7):1269–81. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.008.
169. Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE, i sur. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res*. 2005;65(21):9851–60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172.

-
170. Law SF, Zhang Y-Z, Klein-Szanto A, Golemis EA. Cell-cycle regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple compartments. *Mol Cell Biol.* 1998;18(6):3540–51.
171. Zhang S, Wu L, Liu Q, Chen K, Zhang X. Impact on growth and invasion of gastric cancer cell lines by silencing NEDD9. *Oncotargets Ther.* 2015;8:223–31. doi: 10.2147/OTT.S74075.
172. Kim SH, Xia D, Kim SW, Holla V, Menter DG, Dubois RN. Human enhancer of filamentation 1 is a mediator of hypoxia-inducible factor-1 α -mediated migration in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 2010;70(10):4054–63. doi: 10.1158/0008-5472.
173. Feng Y, Wang Y, Wang Z, Fang Z, Li F, Gao Y, et al. The CRTCL1-NEDD9 signaling axis mediates lung cancer progression caused by LKB1 loss. *Cancer Res.* 2012;72(24):6502–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1909.
174. Chang JX, Gao F, Zhao GQ, Zhang GJ. Expression and clinical significance of NEDD9 in lung tissues. *Med Oncol.* 2012;29(4):2654–60. doi: 10.1007/s12032-012-0213-0.
175. Miao Y, Li AL, Wang L, Fan CF, Zhang XP, Xu HT, et al. Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-Cadherin, β -Catenin and N-Cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(2):281–6. doi: 10.1007/s12253-012-9580-2.
176. Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol.* 1985;16(6):569–79.
177. Cataluña JJ, Perpiñá M, Greses JV, Calvo V, Padilla JD, París F, et al. Cell type accuracy of bronchial biopsy specimens in primary lung cancer. *Chest.* 1996;109(5):1199–203.
178. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):442–7. doi: 10.1095/JTO.0b013e3181d40fac.
179. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):436–41. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181c6ed9b.
180. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical

panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(1):15-25. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182036d05.

181. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25(3):405-15. doi: 10.1038/modpathol.2011.173.

182. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-60. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.

183. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(5):668-84. doi: 10.5858/arpa.2012-0263-RA.

184. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(6):767-73.

185. Kadota K, Nitadori J, Sarkaria IS, Sima CS, Jia X, Yoshizawa A, et al. Thyroid transcription factor-1 expression is an independent predictor of recurrence and correlates with the IASLC/ATS/ERS histologic classification in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Cancer*. 2013;119(5):931-8. doi: 10.1002/cncr.27863.

186. Bishop JA, Sharma R, Illei PB. Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Hum Pathol*. 2010;41(1):20-5. doi: 10.1016/j.humpath.2009.06.014.

187. Yamashita Y, Nagasaka T, Naiki-Ito A, Sato S, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2015;28(1):111-7. doi: 10.1038/modpathol.2014.61.

188. Righi L, Graziano P, Fornari A, Rossi G, Barbareschi M, Cavazza A, et al. Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer*. 2011;117(15):3416-23. doi: 10.1002/cncr.25830.

-
189. Zhao W, Wang H, Peng Y, Tian B, Peng L, Zhang DC. Δ Np63, CK5/6, TTF-1 and napsin A, a reliable panel to subtype non-small cell lung cancer in biopsy specimens. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4247-53.
190. Stoll LM, Johnson MW, Gabrielson E, Askin F, Clark DP, Li QK. The utility of napsin-A in the identification of primary and metastatic lung adenocarcinoma among cytologically poorly differentiated carcinomas. *Cancer Cytopathol.* 2010;118(6):441-9. doi: 10.1002/cncy.20108.
191. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, i sur. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):411-4. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181d57f6e.
192. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, i sur. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature.* 2010;466(7308):869–73. doi: 10.1038/nature09208.
193. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, i sur. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013;502(7471):333–39. doi: 10.1038/nature12634.
194. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, i sur. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell.* 2012;150(6):1107–20. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.029.
195. Weinberg RA. Moving out: invasion and metastasis. u: *The Biology of Cancer*, Schanck D., ur. New York: Garland Science, 2013. Str.641–721.
196. Zhang Z, Neff L, Bothwell AL, Baron R, Horne WC. Calcitonin induces dephosphorylation of Pyk2 and phosphorylation of focal adhesion kinase in osteoclasts. *Bone.* 2002;31(3):359–65.
197. Gu JJ, Lavau CP, Pugacheva E, Soderblom EJ, Moseley MA, Pendergast AM. Abl family kinases modulate T cell-mediated inflammation and chemokine-induced migration through the adaptor HEF1 and the GTPase Rap1. *Sci Signal.* 2012;5(233):ra51. doi: 10.1126/scisignal.2002632.
198. Zhong J, Baquiran JB, Bonakdar N, Lees J, Ching YW, Pugacheva E, i sur. NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extra-cellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS One.* 2012;7(4):e35058. doi: 10.1371/journal.pone.0035058.

-
199. Nikonova AS, Gaponova AV, Kudinov AE, EA Golemis. CAS proteins in health and disease: an update. *IUBMB Life*. 2014;66(6): 387–95. doi: 10.1002/iub.1282.
200. Chang Jia, Gao F, Zhao GQ, Zhang GJ. Role of NEDD9 in invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. *Exp Ther Med*. 2012;4(5):795–800. doi: 10.3892/etm.2012.693.
201. Jin Y, Li F, Zheng C, Wang Y, Fang Z, Guo C, i sur. NEDD9 promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition. *Int J Cancer*. 2014;134(10):2294-304. doi: 10.1002/ijc.28568.
202. Khan MZ, Freshney RI, Murray AM, Merry S, Plumb JA, McNicol AM. Identification and characterisation in vitro of cells with a non-SCLC cell-like phenotype derived from a continuous SCLC line. *Anticancer Res*. 1991;11(5):1687-95.
203. Ito T, Kudoh S, Ichimura T, Fujino K, Hassan WA, Udaka N. Small cell lung cancer, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like cancer: significance of inactive Notch signaling and expression of achaete-scute complex homologue. *Human Cell*. 2017;30(1):1-10. doi: 10.1007/s13577-016-0149-3.
204. Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, i sur. A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2008;3(1):46-52. doi: 10.1097/JTO.0b013e31815e8577.
205. Kawase A, Yoshida J, Ishii G, Nakao M, Aokage K, Hishida T, i sur. Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42(3):189-95. doi: 10.1093/jjco/hyr188.
206. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, i sur. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518–24. doi: 10.1038/nature03799.
207. Carretero J, Shimamura T, Rikova K, Jackson AL, Wilkerson MD, Borgman CL, i sur. Integrative genomic and proteomic analyses identify targets for Lkb1-deficient metastatic lung tumors. *Cancer Cell*. 2010;17(6):547–59. doi: 10.1016/j.ccr.2010.04.026.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1970. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovno i srednješkolno obrazovanje i maturirala na Matematičko-informatičkom obrazovnom centru. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam u siječnju 1998. godine. Nakon pripravničkog staža u trajanju od dvije godine za Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu u Zagrebu sam u svibnju 2000. godine položila državni ispit. U ožujku 2005. položila sam specijalistički ispit iz interne medicine, a u siječnju 2009. subspecijalistički ispit iz pulmologije. Zaposlena sam u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti u Zagrebu. Objavila sam petnaest znanstvenih radova, od toga pet u bazi Current Contents. Članica sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog torakalnog društva Toraks, Hrvatskog pulmološkog društva i Europskog respiratornog društva.