

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena M. Stojšić

Prediktivni značaj PI3K/Akt signalnog puta i  
transportnih pumpi uključenih u razvoj  
rezistencije na lekove kod bolesnika sa  
nemikrocelularnim karcinomom pluća  
- *doktorska disertacija* -

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Jelena M. Stojšić

Predictive significance of PI3K/Akt signaling  
pathway and transport pumps involved in the  
development of drug resistance in patients with  
non small cell lung cancer  
*- doctoral dissertation -*

Belgrade, 2015.

***Mentor:***

**dr Jasna Banković, dr sci, viši naučni saradnik**, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beograd

***Komentori:***

**Prof. dr Ljiljana Marković Denić**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Vesna Škodrić Trifunović**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

***Članovi komisije:***

**Prof. dr Svetislav Tatić**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Doc. dr Anita Grgurević**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Doc. dr Maja Ercegovac**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**N. savetnik dr sc Nikola Tanić**, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beograd

**Prof. dr Žaklina Mijović**, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

## IZJAVE ZAHVALNOSTI

- Izražavam duboku zahvalnost svojoj mentorki *dr sci Jasni Banković* na podršci tokom aplikacije, a posebno tokom izrade rada i doktorske disertacije.
- Takođe se zahvaljujem na trudu *Prof dr sci Ljiljani Marković Denić*, naročito prilikom aplikacije teme doktorske disertacije i *Prof dr sci Vesni Škodrić Trifunović* na pomoći oko nabavke reagenasa potrebnih za izradu doktorske disertacije.
- Zahvaljujem se *dr sci Nikoli Taniću* i drugim članovima komisije na podršci prilikom odabira teme i sugestijama tokom izrade doktorske disertacije.
- Veliku zahvalnost dugujem *saradnicama* Odeljenja za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu *Tijani Stanković, Sonji Stojković, Vedrani Milinković, Jeleni Dinić i Zorici Milošević*, za pomoć bez čijih genetskih analiza ne bi ni bilo ni dela rezultata ovog istraživanja.
- Dugujem zahvalnost *dr sci Zorki Milovanović*, patologu i mojoj dragoj prijateljici, na zajedničkoj evaluaciji skora imunohistohemijskih bojenja i savetima oko izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se *Vesni Petronijević i Olga Zdjelar*, laboratorijskim tehničarima Odeljenja patologije, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu, na uloženom trudu i znanju prilikom izrade imunohistohemijskih preparata.
- Veliku zahvalnost dugujem svojim laboratorijskim tehničarima Odeljenja za torakopulmonalnu patologiju, Službe za patohistologiju, Kliničkog Centra Srbije, *Dragani Knežević, Danici Tomasović, Bosiljki Kojević Bojović, Jeleni Pavlović i Lidiji Vranjanin*, na velikoj, pomoći i znanju prilikom obrade preparata za genetsku i imunohistohemijsku analizu.
- Posebno se zahvaljujem svojoj sestri, *Prof dr sci Zorici Stojšić* na savetima oko izrade doktorske disertacije i svom sinu *Đorđu Kosanoviću* na strpljenju i ogromnoj tehničkoj podršci prilikom izrade doktorske disertacije.

## SAŽETAK

**Uvod:** Karcinom pluća je najčešći uzrok smrti od maligniteta globalno. Oko 80% svih karcinoma pluća su nesitnoćelijski karcinomi (NSCLC) kod kojih preovladavaju adenokarcinom (ADC) i skvamocelularni karcinom (SCC). Mada je hirurška resekcija najpovoljnija terapijska procedura u lečenju pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća, relaps tumora je i dalje visok, tako da je neoadjuvantna hemoterapija (NAC) prihvatljiv terapijski modalitet.

**Cilj:** Istražiti da li neki od ključnih molekula uključenih u RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/Akt/mTOR signalne puteve kao i transportne pumpe uključene u razvoj rezistencije na lekove mogu imati prediktivni i prognostički značaj u aplikaciji NAC kod bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća.

**Metod:** Ispitalivali smo status PTEN, pAkt, pERK, P-gp, MDR1 i BCRP proteinske ekspresije i gubitak heterozigotnosti *PTEN-a* u dve grupe pacijenata sa NSCLC, onih koji su primali i onih koji nisu primali NAC.

**Rezultati:** Utvrđeno je da LOH *PTEN-a* i niska pERK ekspresija koreliše sa dužim preživljavanjem pacijenata sa SCC odnosno ADC, koji su primali NAC. MRP1 ekspresija je statistički značajno povišena kod pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju, što znači da su posedovali urođenu rezistenciju na hemoterapiju i pre započinjanja iste. Takođe, MRP1 je značajno povišen kod pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju i imali su I ili II stadijum bolesti. BCRP je značajno viši kod pacijenata koji nisu primali terapiju i nisu imali tumorske promene u limfnim čvorovima. Pacijenti koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju i koji su imali smanjenu P-gp ekspresiju živeli su značajno duže od pacijenata koji su primali terapiju sa istom P-gp ekspresijom. Pored toga, pacijenti sa SCC, bez NAC i sa smanjenom P-gp ekspresijom živeli su značajno duže od pacijenata sa NAC.

**Zaključak:** Primena NAC je korisna kod pacijenata sa NSCLC i specifičnim molekularnim promenama koje ubuduće mogu pomoći da se poboljšaju stalna istraživanja za terapeutskim metama koje se koriste u personalizovanoj terapiji.

**Ključne reči:** nemikrocelularni karcinom pluća; neoadjuvantna hemoterapija; signalni putevi; LOH PTEN; PTEN; pERK; pAKT; P-gp; MRP1; BCRP.

**Naučna oblast:** medicina

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Lung cancer is the most common cause of neoplasia-related death worldwide. Approximately 80% of all lung carcinomas are the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with predominance of adenocarcinoma (ADC) and squamous cell carcinoma (SCC). Although surgical resection is the most favorable treatment for patients with NSCLC, relapse is still high, so neoadjuvant chemotherapy (NAC) is an accepted treatment modality.

**Aim:** To investigate whether some of the key molecules associated with the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways as well as efflux pumps P-gp, MRP1 and BCRP could have predictive and prognostic value for the NAC application in patients with NSCLC.

**Method:** We examined the expression status of PTEN, pAKT, pERK, P-gp, MRP1 and BCRP proteins and loss of heterozygosity (LOH) of *PTEN* gene in two groups of NSCLC patients, those who received and those who did not receive NAC.

**Results:** LOH *PTEN* and low pERK expression are shown to be correlated with the longest survival of patients with SCC and ADC, respectively, who received NAC. MRP1 expression is significantly higher in patients who did not receive NAC, which means that they had intrinsic resistance to chemotherapy. Also, MRP1 is significantly higher in patients who did not receive NAC and had I or II stage of the disease. BCRP was significantly higher in patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy and were without lymph node invasion. Patients who did not receive NAC had lower P-gp expression lived significantly longer than patients who received this therapy and had the same P-gp expression. Besides, patients with SCC, without NAC and with lower P-gp expression lived significantly longer than patients with NAC.

**Conclusion:** Application of NAC is beneficial in the NSCLC patients with specific molecular alterations which could further help to improve constant search for the molecular targets used in personalized therapy.

**Key words:** non-small cell lung cancer; neoadjuvant chemotherapy; signal pathways; LOH PTEN; PTEN; pERK; pAKT; P-gp; MRP1; BCRP.

**Scientific field:** Medicine

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1.</b> Epidemiologija karcinoma pluća .....	1
<b>1.2.</b> Faktori rizika za nastanak karcinoma pluća.....	3
<b>1.3.</b> Patohistologija karcinoma pluća .....	3
1.3.1. Histološki tipovi karcinoma pluća .....	3
1.3.2. Stadijum tumorske bolesti pluća – TNM klasifikacija.....	4
1.3.3. Histološki gradus karcinoma (g) .....	7
1.3.4. Stepen nekroze tumorske mase (n).....	7
1.3.5. Stepen vezivnotkivne reakcije pluća (dezmoplastična reakcija).....	7
1.3.6. Prisustvo ćelija zapaljenja u i oko tumora.....	7
1.3.7. Patohistološka dijagnostika nemikrocelularnog karcinoma pluća .....	8
<b>1.4.</b> Hemoterapija i hirurška terapija nemikrocelularnog karcinoma pluća.....	8
1.4.1. Preoperativna (neoadjuvantna) hemoterapija nemikrocelularnog karcinoma pluća .....	9
1.4.2. Ciljana terapija nemikrocelularnog karcinoma pluća.....	10
<b>1.5.</b> Genetika maligne ćelije .....	11
1.5.1. Onkogeni i tumor supresor geni .....	11
1.5.2. PI3K/Akt/mTOR i Ras/Raf/MEK/ERK signalni putevi .....	12
<b>1.6.</b> Geni uključeni u razvoj nemikrocelularnog karcinoma pluća .....	13
1.6.1. PI3K (engl. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase).....	13
1.6.2. PTEN (engl. phosphatase and tensin homolog detected on chromosome TEN/mutated in multiple advanced cancers) .....	14
1.6.3. Akt (engl. Protein Kinase B) .....	17
1.6.4. ERK (engl. Extracellular Signal- Regulated Kinases) .....	18
<b>1.7.</b> Rezistencija nemikrocelularnog karcinoma pluća na hemoterapiju .....	19
1.7.1. Signalni putevi i rezistencija na hemoterapiju .....	20
1.7.2. Transportne pumpe.....	21
1.7.2.1. P-glikoprotein (P-gp, ABCB1) .....	22
1.7.2.2. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1, ABCC1) .....	23
1.7.2.3. Breast cancer resistance protein (BCRP).....	24
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	26

<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	27
<b>3.1. Tip studije</b> .....	27
<b>3.2. Pacijenti</b> .....	27
<b>3.3. Tkivni uzorci</b> .....	28
<b>3.4. Izolacija nukleinskih kiselina</b> .....	29
3.4.1. Izolacija genomske DNK iz parifinskih preseka tumorskog i normalnog plućnog tkiva .....	29
3.4.2. Izolacija genomske DNK iz tumorskog i normalnog plućnog tkiva .....	29
3.4.3. Provera kvaliteta izolovane DNK .....	30
3.4.4. Izolacija RNK iz parifinskih preseka tumorskog i normalnog plućnog tkiva	31
3.4.5. Izolacija RNK iz tumorskog i normalnog plućnog tkiva .....	32
3.4.6. Provera kvaliteta RNK .....	33
<b>3.5. Analiza gubitka PTEN heterozigotnosti (LOH analiza)</b> .....	33
<b>3.6. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-   qPCR)</b> .....	34
<b>3.7. Imunohistohemijska bojenja</b> .....	35
3.7.1. Procedura imunohistohemijskog bojenja .....	35
3.7.2. Evaluacija ekspresije ispitivanih antitela .....	37
3.7.2.1. PTEN .....	37
3.7.2.2. pAkt .....	37
3.7.2.3. pERK .....	38
3.7.2.4. P-gp, MRP1 i BCRP .....	38
<b>3.8. Statistička analiza</b> .....	38
<b>4. REZULTATI</b> .....	40
<b>4.1. Kliničkopatološke karakteristike pacijenata</b> .....	40
<b>4.2. LOH analiza PTEN tumor supresor gena</b> .....	44
<b>4.3. Ekspresija PTEN, pAkt i pERK proteina</b> .....	45
<b>4.4. Korelacija LOH PTEN gena, pAkt, pERK i PTEN ekspresije sa   kliničkopatološkim parametrima pacijenata</b> .....	47
<b>4.5. LOH PTEN gena, pAKT, pERK i PTEN ekspresija i preživljavanje pacijenata</b>	48
<b>4.6. Ekspresija MDR1, MRP1 i BCRP na nivou informacione RNK (iRNK)</b> .....	49
<b>4.7. Ekspresija P-gp, MRP1 i BCRP proteina</b> .....	51

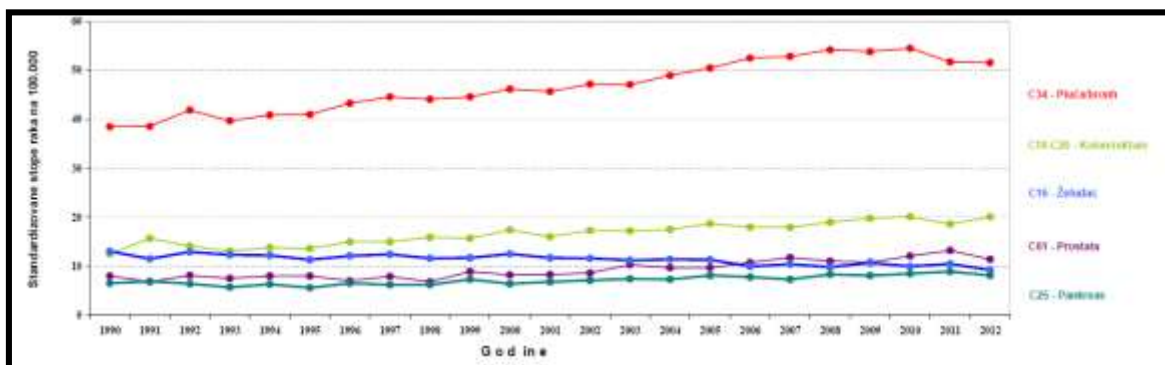


4.8. Korelacija P-gp, MRP1 i BCRP ekspresije sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata .....	53
4.9. P-gp, MRP1 i BCRP ekspresija i preživljavanje pacijenata .....	55
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>56</b>
5.1. Opšti pregled istraživanja .....	56
5.2. Interpretacija primenjene metodologije .....	58
5.2.1. Interpretacija metodologije detektovanja PTEN ekspresije .....	58
5.2.2. Interpretacija metodologije detektovanja pAkt ekspresije .....	58
5.2.3. Interpretacija metodologije detektovanja pERK ekspresije .....	59
5.2.4. Interpretacija metodologije detekcije ekspresije transportnih pumpi .....	59
5.3. Prediktivni značaj prisustva LOH PTEN gena i PTEN, pAkt i pERK ekspresije	60
5.4. Prediktivni značaj P-gp/MDR1, MRP1 i BCRP ekspresije .....	62
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>67</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>70</b>
<b>8. BIOGRAFIJA</b> .....	<b>80</b>

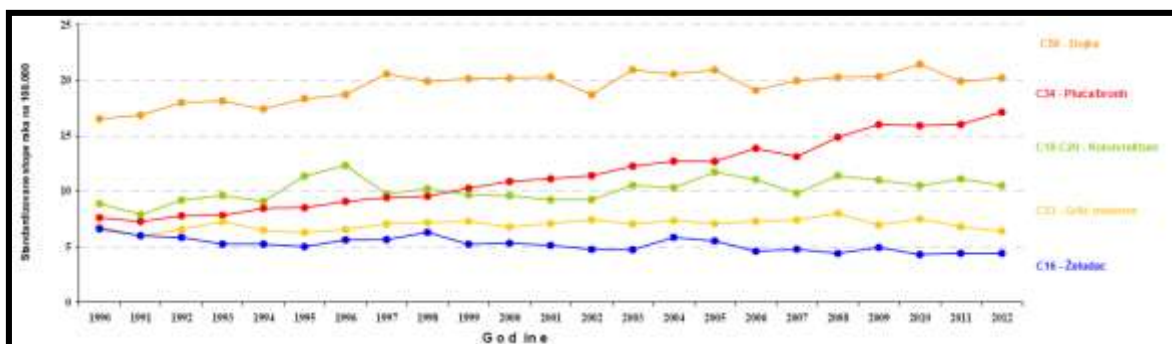
## 1. UVOD

### 1.1. Epidemiologija karcinoma pluća

Karcinom pluća je širom sveta najčešće dijagnostikovan karcinom kod muškaraca, a kod žena je najčešće dijagnostikovan posle karcinoma dojke i grlića materice. U svetu karcinom pluća je vodeći uzrok smrti od maligniteta kod oba pola<sup>1</sup>.



Slika 1. Standardizovana mortalitetna stopa kod vodećih lokalizacija raka na 100.000 stanovnika, kod muškaraca u centralnoj Srbiji, od 1990–2012 godine. Karcinom pluća je vodeći uzrok mortaliteta od maligniteta kod muškaraca. Preuzeto i modifikivano prema Registru za rak u centralnoj Srbiji. Beograd: Institut za Javno Zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović - Batut”; 2015.

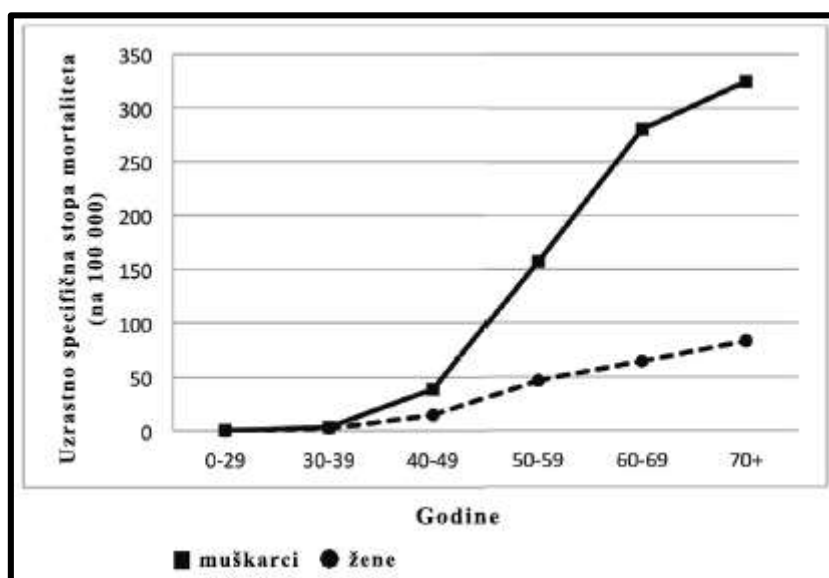


Slika 2. Standardizovana mortalitetna stopa kod vodećih lokalizacija raka na 100.000 stanovnika, kod žena u centralnoj Srbiji, od 1990–2012 godine. Mortalitet od karcinoma pluća kod žena raste, a dojke opada. Preuzeto i modifikivano prema Registru za rak u centralnoj Srbiji. Beograd: Institut za Javno Zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović - Batut”; 2015.

Incidencija karcinoma pluća je najveća u muškoj populaciji u centralnoj Srbiji prema registru za rak Instituta za zaštitu zdravlja Srbije “Dr Milan Jovanović - Batut”, Beograd. Prema ovom registru, mortalitet od karcinoma pluća je najveći kod oba pola (Slike 1 i 2)<sup>2</sup>.

U centralnoj Srbiji u muškoj populaciji raste broj obolelih od karcinoma pluća, od 32,1 na 100000 stanovnika u 1985.godini, do 52,5 na 100000 stanovnika u 2006 g., sa promenom procenta na godišnjem nivou od 2,31% (95% CI, 1,03-3,59) (Slika 3). Stopa

smrtnosti kod pacijenata muške populacije i starosti između 60 do 69 godine života u centralnoj Srbiji od 1985 g. do 2006 g. iznosi 3,83 (95% CI, 2,73-4,92;  $P < 0.001$ )<sup>3</sup>.



Slika 3. Uzrastno specifična stopa mortaliteta u obe populacije u centralnoj Srbiji od 1985-2006 g. Preuzeto i modifikivano prema Markovic - Denić, 2008.<sup>4</sup>g.

U periodu od 2002 g. do 2011 g. u centralnoj Srbiji je bio registrovan trend porasta stope mortaliteta od karcinoma u oba pola. Stopa mortaliteta je za jednu trećinu bila veća u muškoj u odnosu na žensku populaciju. Kod karcinoma pluća, primećeno je da stopa mortaliteta na osnovu starosti obolelih pacijenata muškog pola značajno raste u odnosu na pacijente ženskog pola posle pedesete godine života (Slika 3.)<sup>4</sup>.

Primećeno je da opada broj umrlih žena obolelih od karcinoma dojke i karcinoma grlića materice što znači da započeti projekti skrininga pomažu otkrivanje ovih tumora u ranom stadijumu tumorske bolesti i istovremeno produžavaju njihovo preživljavanje (Slika 2)<sup>2</sup>. Smanjenje broja obolelih od karcinoma pluća je moguće uklanjanjem faktora rizika za njegov nastanak, a efikasnost terapije se ogleda u produženom preživljavanju obolelih pacijenata i poboljšanju kvalitetu njihovog života. Zato je potrebno bolje razumeti mehanizme nastanka karcinoma pluća, razvoja puteva proliferacije malignih ćelija i njihovog receptorskog statusa kako bi se primenila adekvatna personalizovana terapija<sup>5</sup>.

## ***1.2. Faktori rizika za nastanak karcinoma pluća***

Za nastanak karcinoma pluća postoje mnogobrojni faktori rizika koji spadaju u uslove života, od zagađenosti vazduha u životnoj i radnoj sredini, stresa, načina ishrane u kojem dominira meso prženo u dubokom ulju, kao i jako začinjena i ljuta ishrana, do aktivnog ili pasivnog unošenja duvanskog dima i prekomernog konzumiranja alkohola<sup>5,6</sup>.

Duvanski dim je vodeći uzrok karcinoma pluća širom sveta. Nepušači takođe oboljevaju od karcinoma pluća, ali u poređenju sa nepušačima pušači poseduju 20 puta veći rizik da obole od ovog karcinoma<sup>7</sup>. Među nepušačima predominira adenokarcinom koji se češće dijagnostikuje kod žena. Smatra se da su molekularne razlike kod adenokarcinoma pušača i nepušača znak da se oni razvijaju različito. Kod pušača se aktivira ili mutira RAS gen, a kod nepušača EGFR mutacija. Ukoliko se nisu otkrile ove mutacije postoji mogućnost da su se pojavili i alternativni putevi širenja karcinoma i kod pušača i kod nepušača<sup>8</sup>.

## ***1.3. Patohistologija karcinoma pluća***

### ***1.3.1. Histološki tipovi karcinoma pluća***

Prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije iz 2004 g.<sup>8</sup> histološki tipovi karcinoma pluća su:

- skvamocelularni,
- sitnoćelijski (mikrocelularni) sa neuroendokrinom diferencijacijom,
- adenokarcinom,
- adenoskvamozni,
- karcinoid tumori,
- krupnoćelijski,
- sarkomatoidni,
- karcinomi bronhijalnih žlezda
- i preinvazivne lezije.

Oko 80% svih dijagnostikovanih karcinoma pluća spada u grupu nesitnoćelijskih karcinoma pluća u koje spadaju svi navedeni tipovi osim sitnoćelijskog karcinoma pluća sa neuroendokrinom diferencijacijom. Skvamocelularni karcinom i adenokarcinom pluća su najčešći histološki tipovi nemikrocelularnih karcinoma pluća<sup>9,10</sup>.

### ***1.3.2. Stadijum tumorske bolesti pluća – TNM klasifikacija***

Anatomska proširenost bolesti ili stadijum tumora određuje se pre operacije na snimku i biopsijom i označava se *c*TNM klasifikacijom. Patološki stadijum tumorske bolesti određuje patolog na operisanom karcinomu pluća i označava se kao *p*TNM. Slovo T označava veličinu tumora i njegov odnos sa pleurom, da li je zahvata ili ne, odnosno da li tumor zahvata okolne vitalne organe (Tabela 1). N označava prisustvo metastaza u regionalnim ili udaljenim limfnim čvorovima (Tabela 2), a M prisustvo metastaza u kontralateralnom plućnom krilu i udaljenim organima (Tabela 3).

Stadijum tumorske bolesti se primenjuje po revidiranoj klasifikaciji iz 2009 g., a koja se primenjuje od 2010 godine<sup>11,12</sup>.

Limfni čvorovi su deo imunog sistema i nalaze se u i oko sistema organa. Maligne ćelije zahvataju limfni čvor gde se umnožavaju. Prisustvo malignih ćelija u limfnim čvorovima grudnog koša koji su označeni kao intrapulmonalni, segmentalni, hilarni, interlobarni, medijastinalni i supraklavikularni tumači se kao regionalno širenje karcinoma (Tabela 2). Zahvatanje kontralateralnog plućnog krila i organa izvan grudnog koša smatra se proširenom bolesti (udaljene metastaze) što je prikazano u Tabeli 3.

Stadijum tumora pluća zavisi i od invazije tumora u visceralnu ili parijetalnu pleuru a klasifikacija je izneta u Tabeli 4.

**Tabela 1. Proširenost tumora**

<b>Tx</b> - primarni tumor ne može biti dokazan, ili je dokazan prisustvom malignih ćelija u sputumu ili bronhijalnom lavatu ali nije vizuelizovan radiološki ili bronhoskopijom
<b>T0</b> – bez evidencije primarnog tumora
<b>Tis</b> – karcinom <i>in situ</i>
<b>T1</b> - tumor $\leq 3$ cm u najvećem promeru, okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopske evidencije invazije više od proksimalno od lobarnog bronha (odnosno nije u glavnom bronhu)
<b>T1a</b> - tumor $\leq 2$ cm u najvećem promeru
<b>T1b</b> - tumor $> 2$ cm ali $\leq 3$ cm u najvećem promeru
<b>T2</b> - tumor $> 3$ cm ali $\leq 7$ cm ili tumor sa jednom od sledećih slika (T2 tumor sa ovim izgledom su klasifikovani kao T2a ako $\leq 5$ cm)
<b>T2a</b> - tumor $> 3$ cm do $\leq 5$ cm u najvećem promeru
<b>T2b</b> - tumor $> 5$ cm do $\leq 7$ cm u najvećem promeru
<b>T3</b> - tumor $> 7$ cm ili tumor koji zahvata jednu od sledećih struktura: zid grudnog koša (uključujući superior sulkus), dijafragmu, frenični nerv, mediastijastinalnu pleuru, parijetalni prikard, ili tumor u glavnom bronhu $< 2$ cm distalno od karine, ali bez zahvatanja karine; ili udružen sa atelektazom ili obstruktivnim pneumonitisom celog pluća ili separadni tumorski nodulus u istom režnju
<b>T4</b> - tumor bilo koje veličine koji zahvata neki od organa: medijastinum, srce, velike krvne sudove, rekurentni laringealni nerv, jednjak, telo pršljena, karinu, separadni tumorski nodulus(i) u drugom ipsilateralnom lobusu.

**Tabela 2. Invazija tumora u limfne čvorove**

<b>N0</b> - nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
<b>N1</b> - metastaze u limfnim čvorovima u peribronhijalnom ili hilarnom regionu iste strane, ili oba uključujući direktno širenje
<b>N2</b> - metastaze u medijastinalnim limfnim čvorovima iste strane i subkarinalnim limfnim čvorovima
<b>N3</b> - metastaze u medijastinalnim limfnim čvorovima suprotne strane, hilarnim limfnim čvorovima suprotne strane i supraklavikularnim limfnim čvorovima iste ili suprotne strane.
<b>Nx</b> – zahvaćenost limfnih čvorova se ne može odrediti

**Tabela 3. Metastaze**

Mx – udaljene metastaze nisu potvrđene
M0 – metastaze nisu utvrđene
M1 – metastaze u drugo plućno krilo
M1a – separadni tumorski nodus(i) u kontralateralnom lobusu, tumor sa nodusom u pleuri ili maligni pleuralni (ili perikardijalni) izliv
M1b –metastaze u udaljene organe

**Tabela 4. Klasifikacija zahvatanja visceralne pleure (modifikacija Hamarove klasifikacije zahvatanja visceralne pleure)**

PL0 - tumor lokalizovan uplućnom parenhimu ili samo površno zahvaćeno vezivno tkivo pleure, ali ne iznad elastičnog sloja visceralne pleure
PL1 – tumor zahvata visceralnu pleuru iznad elastičnog sloja
PL2 – tumor zahvata površinu visceralne pleure
PL3 – tumor zahvata parijetalnu pleuru ili zid grudnog koša

Svi navedeni parametri (T, N, M, PL) utiču na postavljanje kliničkog stadijuma tumora pluća koji je naveden u Tabeli 5.

**Tabela 5. Klinički stadijumi tumorske bolesti**

Stadijum 0	Carcinoma in situ		
Stadijum IA	T1 - N0 - M0		
Stadijum IB	T2- N0 – M0		
Stadijum IIA	T1-N1-M1		
Stadijum IIB	T2 - N1 - M0		
	T3 – N0 – M0		
Stadijum IIIA	T3 - N1 - M0		
	T1 – N2- M0	T2- N2- M0	T3 – N2-M0
Stadijum IIIB	T4 – N0 – M0	T4- N1 – M0	T4 – N2 –M0
	T1 - N3 – M0	T2-N3 –M0	T3 - N3 – M0
	T4 - N3 – M0		
Stadijum IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Parametri koji se navode u patohistološkom izveštaju su i histološki gradus tumora, stepen nekroze tumora i dezoplastične (vezivotkivne i zapaljenske) reakcije okolnog plućnog tkiva na prisustvo tumora.

### ***1.3.3. Histološki gradus karcinoma (g)***

Histološki gradus karcinoma se određuje mikroskopski, na osnovu razlike između tumorskih i zdravih ćelija istog tkiva, odnosno razlike u veličini i obliku jedra (jedarne hiperhromazije), broju mitozama, obliku i veličini ćelija, pa se u praksi patologa primenjuje sledeća klasifikacija:

- gx - nije moguće odrediti gradus tumora;
- g1 - dobro diferentovane ćelije;
- g2 - umereno diferentovane ćelije;
- g3 - slabo diferentovane ćelije.

### ***1.3.4. Stepen nekroze tumorske mase (n)***

Stepen nekroze karcinoma se u praksi gradi kao:

- n1 - nekroza oskudna ili je nema;
- n2 - nekrotično do 50% tumorske mase;
- n3 - nekrotično preko 50% tumorske mase.

### ***1.3.5. Stepen vezivnotkivne reakcije pluća (dezoplastična reakcija)***

Vezivnotkivna reakcija na prisustvo tumora se u praksi klasifikuje:

- d1 – slabo izražena;
- d2 – umereno izražena;
- d3 – jako izražena.

### ***1.3.6. Prisustvo ćelija zapaljenja u i oko tumora***

U praktičnom radu patologa se prilikom dijagnostike karcinoma pluća klasifikuje i stepen reakcije zapaljenskih ćelija unutar i oko tumora:

- z1 – slabo izražena;
- z2 – umereno izražena;
- z3 – jako izražena.



### ***1.3.7. Patohistološka dijagnostika nemikrocelularnog karcinoma pluća***

Na formalin fiksiranim i hematoksilin-eozin obojenim preparatima biopsijskih uzoraka se zbog heterogene, često slabo diferentovane morfološke slike, nalaz interpretira kao nemikrocelularni karcinom pluća. Za postavljanje precizne dijagnoze zahteva se imunohistohemijsko bojenje naročito ako se radi o slabo diferentovanom nemikrocelularnom karcinomu ili o diferencijaciji posebnih sitnoćelijskih varijanti skvamocelularnog i adenokarcinoma pluća i tipičnog i atipičnog karcinoida pluća od sitnoćelijskog karcinoma pluća<sup>6</sup>. Sitnoćelijski karcinom pluća se dijagnostikuje u oko 20% pacijenata sa karcinomom pluća. U vreme dijagnostike sitnoćelijski karcinom pluća je obično u uznapredovalom stadijumu, jer je metastazirao u limfne noduse medijastinuma i druge organe, uglavnom u jetru i proširio se u koštano srž, pa se smatra da se radi o “diseminovanoj malignoj bolesti” ili “sistemskom oboljenju”<sup>8,13</sup>. To je razlog što je sitnoćelijski karcinom pluća u vreme dijagnostike neoperabilan, a nemikrocelularni karcinomi mogu biti ili se neoadjuvantnom terapijom mogu dovesti u operabilan stadijum.

### ***1.4. Hemoterapija i hirurška terapija nemikrocelularnog karcinoma pluća***

Hirurška intervencija je terapija izbora za nemikrocelularne karcinome pluća pod uslovom da je tumor u operabilnom stadijumu i da je pacijent dobrog opšteg stanja. Hemoterapija udružena sa zračnom terapijom je do danas glavna terapija karcinoma pluća u uznapredovalom stadijumu tumora. Osnovna strategija u lečenju pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća je produžavanje njihovog preživljavanja i poboljšanje kvaliteta života. Standardni protokol lečenja karcinoma pluća dovodi do različitog preživljavanja što zavisi od histološkog tipa karcinoma nemikrocelularnog karcinoma pluća, stadijuma tumorske bolesti u vreme dijagnostike karcinoma i pridruženih oboljenja pacijenta<sup>14</sup>. Po praktičnim preporukama *ASCO* (engl. *American Society of Clinical Oncology*) iz 2009 g. kod pacijenata sa uznapredovalim, neoperabilnim nemikrocelularnim karcinomom pluća, čije je opšte stanje po *ECOG* (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*) skor 0, 1 ili 2, savetuje se započinjanje lečenja hemoterapijom. Kod prve linije hemoterapije se preporučuje kombinacija derivata platine (cisplatina ili karboplatina) sa citostatikom treće generacije (Gemcitabin, taksani, Pemetrekset, Vinolerbin), jer je pokazano da ovi protokoli daju bolji terapijski odgovor

kao i bolje preživljavanje u odnosu na druge tipove hemoterapije. U prvoj liniji hemoterapije obično se primenjuje 4 do 6 ciklusa. Posle svaka dva ciklusa procenjuje se odgovor karcinoma na hemoterapiju na osnovu *RECIST* (engl. *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*) kriterijuma, kao parcijalni odgovor (PR), stabilna bolest (SD), kompletan odgovor (CR), progresivna bolest (PD) i lokalni tumorski odgovor (LR). Na osnovu ovih kriterijuma prate se: promene u dijametru tumora, postojanje i proporcija intratumorske nekroze i ukupne redukcije tumorske mase na visokorezolutivnom CT skeneru. Ukoliko postoji parcijalni odgovor karcinoma na hemoterapiju i on pređe u klinički resektabilni i stanje pacijenta to dozvoljava postojanje indikacije za operaciju<sup>15,16</sup>. Ukoliko ne postoji parcijalni odgovor karcinoma na prvu liniju hemoterapeutika ili je prisutna njegova progresija primenjuje se druga linija hemoterapeutika. Kod neefikasne druge linije hemoterapije može se primeniti treća linija hemoterapije u vidu erlotiniba ukoliko je pacijent dobrog opšteg stanja (0 – 3) i prethodno nije primio erlotinib i gefitinib<sup>15</sup>.

#### ***1.4.1. Preoperativna (neoadjuvantna) hemoterapija nemikrocelularnog karcinoma pluća***

Određivanje kliničkog stadijuma tumorske bolesti ima za cilj da diferencira operabilne pacijente sa lokoregionalnom bolesti od onih koji su neoperabilni sa metastatskom bolesti ali kod kojih je opšte stanje zadovoljavajuće.

Preoperativna ili neoadjuvantna terapija ima za cilj da karcinom smanjenjem njegovih dimenzija i njegovog lokalnog širenja, prevedu iz neoperabilnog u operabilni stadijum. Primenjuje se prva linija hemoterapeutika baziranih na derivatima platine. Konkretno kod nemikrocelularnog karcinoma pluća cilj ove terapije je da se osim smanjenja dimenzija neoperabilni nodalni status N2 prevedene u operabilni stadijum N1. Smanjenjem dimenzija karcinoma radikalnost hirurške intervencije odnosno invazivnost resekcije je manja. Na ovaj način se i produžava preživljavanje pacijenata<sup>17</sup>. Međutim, efekat ove terapije može biti nedovoljan, dimenzije tumora mogu biti neznatno smanjene, nodalni status nije preveden u operabilni, nego da je, na protiv, došlo do progresije karcinoma.

#### **1.4.2. Ciljana terapija nemikrocelularnog karcinoma pluća**

Poslednjih godina je hemoterapija na bazi platine značajno produžila preživljavanje pacijenata, ali je i dovela do toksičnih efekata primenjenih lekova kod mnogih od njih. Ova činjenica je navela istraživače na ispitivanje individualnog pristupa lečenja pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća. Vršena su opsežna molekularna ispitivanja prognostičkih faktora i otpornosti malignih ćelija na dejstvo hemoterapeutika. Ne postoji isključivo jedan marker na kome bi se bazirala terapija i predvidela prognoza maligne bolesti<sup>18</sup>.

U poslednjih nekoliko godina se razvojem ciljane, individualizovane terapije nemikrocelularnih karcinoma pluća, epidermalni faktor rasta (EGFR) najviše ispituje jer se on sa svojim nishodnim putevima Ras/Raf/MEK/ERK i PI3/Akt/mTOR utiče na regulaciju opstanka malignih ćelija, njihovu proliferaciju i programiranu ćelijsku smrt (apoptozu). Ispituju se i molekuli koji se nalaze nishodno od EGFR-a. Na osnovu detaljnog razumevanja kinaza uključenih u EGFR signalni put identifikuju se i ispituju biomarkeri koji mogu biti potencijalni prediktori u osetljivosti inhibitora tirozin kinaza (TKI) u uznapredovalom, neoperabilnom stadijumu nemikrocelularnih karcinoma pluća<sup>19</sup>.

Ispituju se EGFR i K-ras mutacije kao i aktivacija PI3/Akt/mTOR signalnog puta jer i oni mogu da pomognu u predviđanju efikasnosti TKI tretmana i prognoze nemikrocelularnog karcinoma pluća. Malo se zna o korelaciji kinaza uključenih u EGFR put i efikasnosti hemoterapije kod pacijenata operisanih od nemikrocelularnog karcinoma pluća. Uočeno je da prekomerna ekspresija Raf produžava aktivnost Ras/Raf/MEK/ERK puta i dereguliše ekspresiju centralne fosfataze u PI3K/Akt/mTOR putu koja je povezana sa nastankom rezistencije na lekove u *in vitro* uslovima. Korelacija aktivacije Ras/Raf/MEK/ERK i PI3K/Akt/mTOR puta i i efekta adjuvantne terapije *in vivo* je i dalje nepoznata<sup>18,19</sup>.

Shi sa saradnicima (2011 g.) je u svojoj studiji zaključio da su pERK1/2 i pAkt nezavisni prognostički biomarkeri za utvrđivanje perioda nastanka recidiva kod pacijenata operisanih od nemikrocelularnog karcinoma pluća koji su lečeni adjuvantnom hemoterapijom, i da pERKi pAkt imaju karakteristično suprotnu vrednost u periodu nastanka recidiva. Ovi nalazi sugerišu da pacijenti koji su pERK pozitivni ili pAkt negativni mogu imati veći benefit od adjuvantne hemoterapije nego oni koji su pERK

negativni ili pAkt pozitivni. Ovi biomarkeri mogu biti od pomoći u izboru pacijenata za postoperativnu adjuvantnu hemoterapiju ili da predvide efekat iste<sup>19</sup>.

## ***1.5. Genetika maligne ćelije***

### ***1.5.1. Onkogeni i tumor supresor geni***

Većina kontrolnih mehanizama u rastu i razmnožavanju ćelija uključuje tumor supresor gene i proto-onkogene.

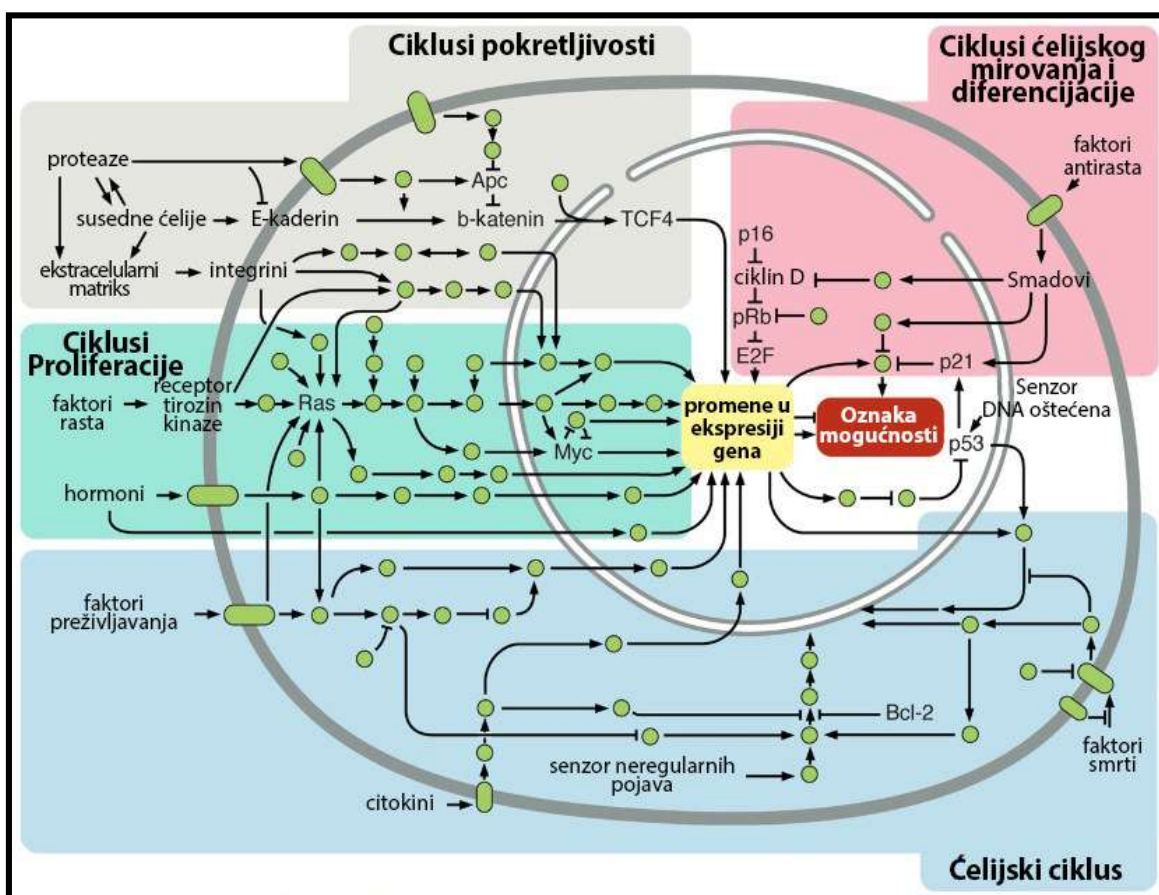
J.M.Bishop je 1991 g. prvi opisao onkogene, gene koji su odgovorni za nastanak tumora kod ptica i glodara. Ovi geni su po njegovom mišljenju mutirane forme gena domaćina (proto-onkogeni)<sup>21</sup>. Po mišljenju Cantley i saradnika (1991.g.) većina proto-onkogeni kodira proteine koji su uključeni u kaskadne događaje u kojima faktori rasta stimulišu normalnu ćelijsku deobu. Brojni faktori rasta su „okidači“ pomena u domenu svojih receptora koje rezultiraju nastankom signala u citoplazmi ćelije koji se prenose ka njenoj unutrašnjosti. Proteinski produkti onkogeni šalju signale sa površine ćelije ka jedru. U glavnom fokusu je velika familija proteina tirozin kinaza i onkoproteina u koje spadaju Ras i Raf<sup>22</sup>.

Proto-onkogeni normalno regulišu ćelijski rast. Kada proto-onkogeni mutiraju ili se umnože postaju „loši“ geni koji mogu da se trajno uključe ili aktiviraju ćelijski rast na mestima gde ne treba da ga bude. Ukoliko se to desi ćelijski rast je van kontrole što može dovesti do nastanka tumora. Ovako mutirani gen koji je odgovoran za nastanak karcinoma zove se onkogen<sup>21,22</sup>.

Tumor supresor geni usporavaju deobu ćelija, popravljaju greške u DNK ili regulišu ćelijsku smrt, proces poznat kao apoptoza ili regulisana ćelijska smrt. Kad tumor supresor geni pravilno ne funkcionišu, odnosno mutiraju, ćelije mogu rasti bez kontrole, koja dovodi do nastanka karcinoma. Nasledne ili urođene bolesti izazvane mutacijama tumor supresor gena su prisutne u nekim familijarnim kancerskim sindromima koji uzrokuju izvesne karcinome unutar porodice. Međutim, većina mutacija tumor supresor gena su stečene<sup>21</sup>.

Neki od važnih puteva u malignim ćelijama prenose signale iz okruženja ćelije, dok su drugi odgovorni za programe unutar ćelije koji kontrolišu ćelijski ciklus i njenu smrt.

Postoje i oni signalni putevi koji kontrolišu pokrete ćelija i interakcije sa okolnim ćelijama (Slika 4).



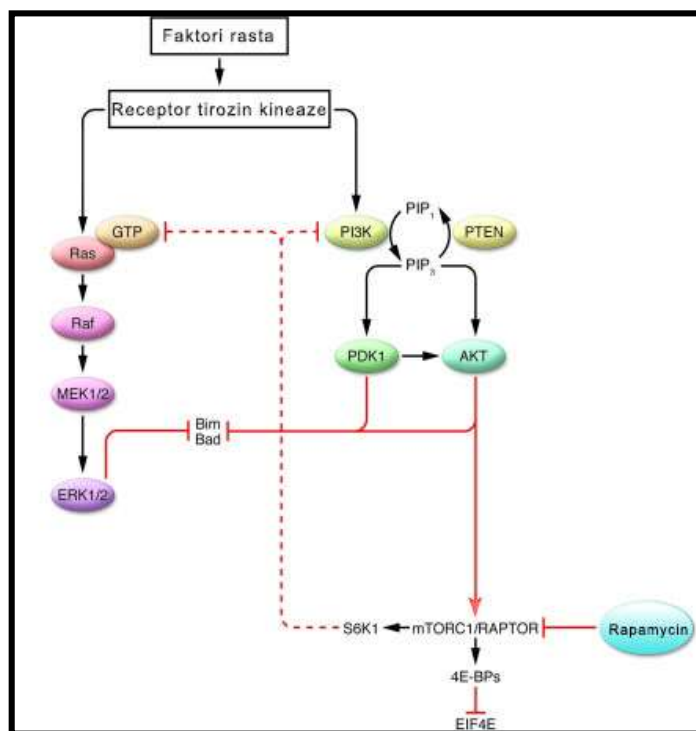
Slika 4. Mapa glavnih signalnih puteva koji su važni u nastanku maligne ćelije. Hanahan i Weinberg, 2011<sup>20</sup>

Različiti signalni putevi su međusobno povezani i zavisni na složen način, ali ono što o njima znamo su tek sporedna saznanja u istraživanjima maligniteta<sup>20</sup>.

### 1.5.2. PI3K/Akt/mTOR i Ras/Raf/MEK/ERK signalni putevi

PI3K/Akt/mTOR i Ras/Raf/MEK/ERK signalni putevi su dva najčešće izmenjena signalna puta kod humanih karcinoma, pa i kod karcinoma pluća, uglavnom kao rezultat genetskih promena u njima<sup>23</sup>. PI3K/Akt/mTOR signalni put reguliše proliferaciju ćelija i apoptozu, i ključan je za nastanak i progresiju maligniteta, produžavajući život ćelija stimulacijom njihove proliferacije i inhibicijom apoptoze<sup>24</sup>. Glavni regulator ovog puta je PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), često izmenjen kod karcinoma pluća, koji redukujući aktivnost Akt-a indukuje zastoje ćelijskog ciklusa i apoptozu. Drugi vrlo značajan signalni put u kancerogenezi je

Ras/Raf/MEK/ERK koji ubrzava proliferaciju ćelija, angiogenezu, njihovu diferencijaciju i migraciju<sup>25</sup>.



Slika 5. Dijagram signalnih puteva PI3/Akt/mTOR i RAS/MEK/ERK. Preuzeto i modifikivano prema Grant, 2008 .g.<sup>27</sup>

Aktivacija mutacija Ras i Raf gena nastaje i u solidnim i u hematološkim malignitetima, dovodeći do aktivacije njihovih nishodnih ciljeva MEK1/2 i ERK1/2. Signalni putevi su u međusobnoj interakciji regulišući ćelijski rast i kancerogenezu. Iz svega se zaključuje da PI3K/Akt/mTOR i Ras/Raf/MEK/ERK signalni putevi mogu igrati važnu ulogu u ciljanoj terapiji maligniteta<sup>26,27</sup> (Slika 5.).

## 1.6. Geni uključeni u razvoj nemikrocelularnog karcinoma pluća

### 1.6.1. PI3K (engl. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)

PI3K, poznat i kao fosfoinozimid 3-kinaza je lipidna kinaza koja pripada familiji srodnih intracelularnih signalnih enzima koji regulišu široki spektar ćelijskih procesa, kao što su rast, proliferacija, diferencijacija, pokretljivost, preživljavanje i intracelularni promet. PI3K/Akt/mTOR signalna kaskada je kritična pošto produžava preživljavanje ćelija i njihov rast, a somatska mutacija gena koji kodira p110 $\alpha$ , katalitičku podjedinicu, identifikovana je u različitim solidnim tumorima. Mutacije se mogu detektovati *in vivo* i

*in vitro*. Receptor tirozin-kinaze, na pr. EGFR, takođe aktivira PI3K/Akt/mTOR signalni put kod mnogo tipova karcinoma. Gubitak PTEN-a kod karcinoma dojke, endometrijuma i debelog creva, RAS mutacije kod karcinoma debelog creva i her-2 amplifikacija su često istovremeno udružene sa PIK3CA mutacijom<sup>28,29,30</sup>.

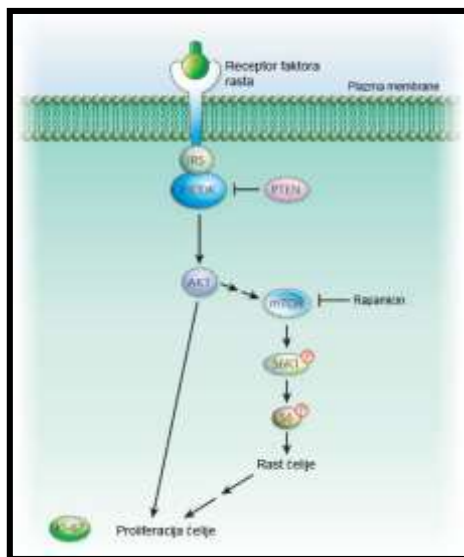
Gubitak PI3K funkcije može usporiti tumorogenezu, ali može poslužiti i kao efikasna strategija u hemoprevenciji kod pacijenata sa visokim rizikom za nastanak karcinoma pluća izazvanih *KRAS* mutacijom. Aktivnost PI3K mutacije nije esencijalna za održavanje i napredovanje dijagnostikovanih karcinoma. Visoko specifičan PI3K-mTOR inhibitor može dramatično smanjiti veličinu EGFR mutiranih adenokarcinoma. Kao pojedinačni faktor PI3K-mTOR može izazvati izraženu apoptotsku aktivnost u her-2 amplifikovanim karcinomima i PIK3CA mutiranim kancerskim ćelijama<sup>29,30</sup>.

Wang sa saradnicima (2014) je zaključio da su PI3K mutacije često udružene sa *EGFR/KRAS* mutacijama kod pacijenata sa nemikrocelularnom karcinomom pluća. Ukoliko je prisutna samo PI3K ili je ona udružena sa *EGFR/KRAS wild* podtipom prognoza kod ovih pacijenata je lošija. Takođe, prisustvo PIK3 mutacije može imati prognostički značaj kao i da pomogne u određivanju individualnog pristupa lečenju pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća<sup>31</sup>.

Jiang i saradnici (2014) smatraju da je prekomerna aktivnost PI3K/Akt/mTOR signalnog puta u nemikrocelularnim karcinomima pluća nepovoljan prognostički faktor. Takođe su utvrdili i da su prekomerna ekspresija PI3K i pAkt proteina pojedinačno loši prognostički markeri i u uznapredovalim nemikrocelularnim karcinomima pluća. Oni u ovom radu takođe zaključuju da PI3K i pAkt mogu biti moguće potencijalne mete za nemikrocelularni karcinom pluća<sup>32</sup>.

### ***1.6.2. PTEN (engl. phosphatase and tensin homolog detected on chromosome TEN/mutated in multiple advanced cancers)***

*PTEN* gen je otkriven 1997.g. na hromozomu 10 koji često nestane u kasnijim stadijumima tumorske bolesti. Pre toga je Ittmann (1996 g.) otkrio kompleksnu sliku gubitka heterozigotnosti (LOH, engl. *loss of heterozygosity*), na hromozomu 10 kod pacijenata obolelih od adenokarcinoma prostate<sup>33,34</sup> (Slika 6.).



Slika 6. PI3K/Akt/mTOR signalni put. Preuzeto i modifikivano prema Charles L i Sawyers CL, 2008<sup>34</sup>

Najčešći region za gubitak heterozigotnosti *PTEN* gena sadržavao je mikrosatelitne lokuse D10S608 i D10S185, u blizini 10q23.1. Još tri zahvaćena lokusa su otkrivena 10p, D10S192 (10q23.3) i D10S169 (10q26) u manje od 10% B stadijuma adenokarcinoma prostate. U oko 20-40 % karcinoma došlo je do LOH *PTEN* gena na dva lokusa ispitivanih pacijenata sa klinički uznapredovalom malignom bolesti, što dovodi do zaključka da dva alela sadrže tumor supresor gen. Gubitak heterozigotnosti u regionu D10S169 se javlja u klinički uznapredovalom stadijumu tumora<sup>33,34,35,36</sup>.

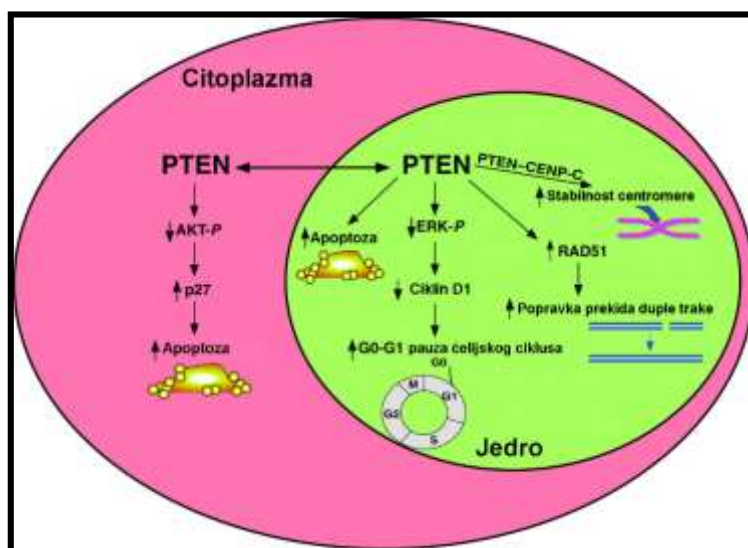
*PTEN* gen je kao nasledna mutacija uključen i u *Cowdenovu* bolest koja se karakteriše retkim autozomalnim familijarnim karcinom sindromom i nastankom karcinoma dojke. Kod ovih pacijenata nastaju hamartomi kože, dojki, štitnjače, sluzokože usne duplje i intestinalnog epitela<sup>37,38</sup>.

*PTEN* protein je odgovoran za defosforilaciju fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (PIP3) do fosfatidilinozitol 3,4-difosfata (PIP2) koji svoju fosfoinozimid-fosfataznu aktivnost ispoljava na ćelijskim membranama. Proizvod fosfatazne aktivnosti *PTEN* proteina je PIP2, a njegov glavni supstrat je PIP3 koji je sekundarni glasnik Akt signalne kaskade, koji će mitogeni signal sa receptora preneti na protein Akt familije: Akt1(PKB alfa), Akt2 (PKB beta), Akt3(PKB gama). Inaktivacija *PTEN* proteina izaziva aktivaciju PI3K/Akt/mTOR puta i posledično povećava sintezu proteina, ubrzava ćelijski ciklus, migraciju i preživljavanje (Slika 5). Gubitak finkcije *PTEN*-a povećava koncentraciju PIP-3, koji zauzvrat dovodi do prekomerne aktivacije Akt-a<sup>39</sup>.



PTEN je lokalizovan u jedru u ćelijama koje su u stanju mirovanja (G0-G1), a funkcionalan u citoplazmi ćelija koje su mitotski aktivne (S) (Slika 6). Jedrni PTEN je prvi put kompletno evidentiran u studiji o malignim melanomima<sup>40</sup>. Citoplazmatski PTEN je otkriven imunohistohemijskom metodom bojenja, prvenstveno kod njegove prekomerne ekspresije ili u tumorskim ćelijskim linijama i tkivima<sup>41</sup>. Lokalizacija PTEN proteina zavisi od njegove aktivnosti i stabilnosti koji se kontrolišu fosforilacijom. Fosforilisani PTEN je neaktivan i lokalizovan je u citoplazmi<sup>39</sup> (Slika 7).

U ćelijama karcinoma pluća prekomerna ekspresija PTEN proteina je ukazala da dolazi do inhibicije invazije. Smanjena ekspresija PTEN proteina je povezana sa povećanom proliferacijom ćelija i njihovim preživljavanjem i smatra se lošim prognostičkim faktorom. U normalnom tkivu kao i u tkivu pluća uz tumor PTEN nije ekspimiran<sup>40,41</sup>. Mutacije *PTEN* gena su često udružene sa mutacijama drugih tumor supresor gena. Kod nesitnoćelijskih karcinoma pluća PTEN korelira sa nivoom EGR1 (engl. *Early Growth Regulated Transcription Factor*). Yamamoto sa saradnicima (2010 g.) smatra da je povećana ekspresija ova dva proteina udružena sa boljom prognozom, jer je inhibirana invazija malignih ćelija<sup>38</sup>.



Slika 7.. PTEN je lokalizovan i u citoplazmi i u jedru a međusobno su povezani različitim mehanizmima. Preuzeto i modifikivano prema Planchon i saradnici, 2007<sup>39</sup>

Freeman sa saradnicima (2003 g.)<sup>41</sup> i Stambolić sa saradnicima (2001 g.)<sup>42</sup> su u svojim studijama ustanovili da je *p53* direktno vezan za PTEN promoter i da reguliše njegovu transkripciju. Anđelković sa saradnicima (2011 g.)<sup>43</sup> je zaključila da pacijenti sa nemikrocelularnim karcinomom pluća čija su oba tumor supresor gena, *p53* i PTEN,

mutirana imaju značajno kraće preživljavanje i da su oba kompleksno povezana u održavanju ćelijske homeostaze.

PTEN i p16 su povezani i koordinisani u ćelijama nemikrocelularnih karcinoma pluća. Malo je studija koje se bave ovom povezanošću. Anđelković sa saradnicima (2011/2012 g.)<sup>44</sup> je utvrdila da kod pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća kod kojih postoje mutacije oba supresor gena, *PTEN* i *p16*, postoji i značajna korelacija između prisustva metastaza u limfnim nodusima i značajno kratkog preživljavanja.

Ekspresija PTEN proteina često nestane kod uznapredovalih nemikrocelularnih karcinoma pluća. Ovaj gubitak nastaje usled inaktivacionih mutacija, gubitka heterozigotnosti ili hipermetilacije PTEN-a<sup>45</sup>.

### **1.6.3. Akt (engl. Protein Kinase B)**

Proto-onkogen, serin/treonin specifična protein kinaza Akt (poznata i kao protein kinaza B ili PKB) igra važnu regulatornu ulogu u različitim ćelijskim procesima, uključujući i progresiju karcinoma. Akt kaskada se aktivira putem tirozin-kinaznih receptora, integrina, B i T ćelijskih receptora, receptora citokina, i drugim stimulusima koji indukuju produkciju fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfata pomoću fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K). Signali se prenose preko Akt-a do milijarde molekula cilj je cilj mTOR (engl. *the mammalian target of rapamycin*)<sup>46</sup>.

Aktivacija mTOR-a a zatim nishodnih molekula: eukariotičnog faktora inicijacije 4E (eIF4E), vezujućeg proteina 1 (4EBP1) i p70 ribozomalnog proteina S6 kinaze (S6K) pokazala se kao kritični mehanizam koji leži u patologiji mnogih karcinoma kao što su karcinom pluća, bubrega, dojke, glave i vrata<sup>46,47</sup>.

Duvanski dim aktivira PI3K/Akt/mTOR signalni put i time povećava proliferaciju i preživljavanje epitelnih ćelija pluća i inhibira apoptozu kod oštećenja DNK. Komponente duvanskog dima aktiviraju ovaj signalni put promenjenom ekspresijom ili aktivnosti ushodnih regulatora. *In vitro* studije su pokazale da duvanskim dimom indukovana transformacija bronhijalnog epitela povećava tumorogenezu<sup>48</sup>.

Utvrđeno je da EGFR-Akt-mTOR put aktivan i definisan u podtipovima nemikrocelularnih karcinoma pluća, a da mTOR može biti determinanta metastaza u limfne noduse. Dobashi sa saradnicima (2011 g.)<sup>46</sup> i Suzuki sa saradnicima (2012 g.)<sup>49</sup>

smatraju da bi Akt i mTOR mogli biti pogodni terapijski ciljevi. Akt je prihvaćen kao dominantni medijator u signalima izazvanim mutacijom EGFR-a.

Al-Saad sa saradnicima (2009 g.)<sup>50</sup> je utvrdio da je fosforilisani Akt (pAkt) loš prognostički znak u nemikrocelularnim karcinomima pluća koji su metastazirali u limfne noduse, a da je njegova visoka ekspresija u ćelijama strome nemikrocelularnog karcinoma povoljan nezavisni prognostički pokazatelj.

#### **1.6.4. ERK (engl. *Extracellular Signal- Regulated Kinases*)**

Mitogen-aktivirane protein kinaze (engl. *MAPK*) čine porodicu protein kinaza čija je funkcija i regulacija prisutna tokom evolucije jednoćelijskih organizama poput pivskog kvasca do kompleksnih organizama uključujući humanu populaciju. Zbog mnogih važnih

ćelijskih funkcija pod kontrolom mitogen-aktiviranih protein kinaza, one su intenzivno proučavane radi definisanja svoje uloge u fiziologiji čoveka i njegovih bolesti. MAPK fosforiliše specifične serine i treonine ciljnih proteina i reguliše ćelijske aktivnosti u rasponu od ekspresije gena, mitoze, kretanja ćelija, njenog metabolizma i programirane smrti<sup>51</sup>. U radu Nijhara i saradnika (2001.g.)<sup>52</sup> mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK)/ekstracelularna regulisana kinaza (ERK) igra značajnu ulogu u transmisiji signala izazvanih različitim vrstama stimulacije koje dovode do proliferacije ćelija, apoptoze, diferencijacije, maligne transformacije, angiogeneze, smrti ćelije i rezistencije na lekove.

U višećelijskim organizmima postoje tri podfamilije MAPK-a. One uključuju ekstracelularne signal regulisane kinaze, ERK1 i ERK2. ERK1 i ERK2, koje su široko rasprostranjene i uključene u mejozu, mitozu i postmitotičke funkcije u diferencijaciji ćelija. Različiti stimulusi, uključujući faktore rasta, citokine, virusne infekcije, ligande za heterotrimere guanin nukleotid vezujuće proteine (G protein) – zajedničke receptore i kancerogene aktiviraju ERK1 i ERK2 signalne puteve. ERK1 i ERK2 su komponente tri-kinaze fosforilišuće module koji uključuju MKKK, c-Raf1, B-Raf1 ili A-Raf, koji aktiviraju proto-onkogen RAS čija se mutacija javlja u oko 30% svih humanih karcinoma<sup>53</sup>.

Davies sa saradnicima (2011 g.)<sup>53</sup> i Handra-Luca (2003 g.)<sup>54</sup> su u svojim radovima zaključili da je aktivacija ERK-a udružena sa povećanom agresivnosti karcinoma usled povećane proliferativne aktivnosti tumorskih ćelija.

### **1.7. Rezistencija nemikrocelularnog karcinoma pluća na hemoterapiju**

Stepen odgovora na primenjenu hemoterapiju iznosi 20-50% kod uznapredovalih nemikrocelularnih karcinoma pluća. Međutim, gotovo svi karcinomi vrlo brzo steknu višestruku rezistenciju na funkcionalno i strukturno različite lekove, takozvanu *multi-drug* rezistenciju (Tabela 6).

**Tabela 6.** Klasifikacija rezistencije na hemoterapiju kod nemikrocelularnih karcinoma pluća. *Preuzeto i modifikivano prema Stewart, 2010<sup>55</sup>*

<b>Princip klasifikacije</b>	<b>Tip rezistencije</b>
Vreme nastanka	Urođena ( <i>de novo</i> ) Stečena
Farmakodinamska	Aktivna ((konkurentna inhibicija)) Bez zasićenja, pasivna (smanjen afinitet) Sa zasićenjem (nekonkurentna inhibicija)
Kinetika ćelija	Stanje mirovanja Ubrzano
Genetska	Mutacije Epigenetska
Odnos domaćin/tumor	Faktor domaćina Faktor tumora
Tipovi uključenih ćelija	Ćelije tumora Mikrookruženje/faktor stromalnih ćelija Udaljeni efekti na rezistenciju tumora

Mnogi faktori rezistencije malignih ćelija su oni isti koji normalne ćelije koriste da bi se zaštitile od slobodnih radikala, toksina, zračenja ili ekstremnih temperatura. Problem rezistencije se uvećava ukoliko je tumor rezistentan na jedan lek, ali se ona istovremeno uvećava primenom drugih lekova. Rezistencija na hemoterapiju može da korelira sa statusom mutacija, ekspresijom iRNA i proteina unutar tumora ili genetskog polimorfizma organizma domaćina<sup>26,55</sup>.

Studije mehanizama rezistencije na lekove u malignoj ćeliji dovele su do identifikacije gena i njihovih produkata koji učestvuju u rezistenciji<sup>55,56</sup>.

Trenutno vlada veliko interesovanje za "ciljnu terapiju" karcinoma, ali i sami hemoterapeutici mogu postati "meta". Činjenica je da nekada postoji značajno smanjenje tumora kao odgovor na hemoterapiju odnosno da su oni manje otporni na neke hemoterapeutike. Tradicionalno je mišljenje da hemoterapija cilja na primer, na DNK, tubulin, topoizomerazu ćelija, ali njih poseduju i normalne ćelije. Sposobnost da se selektivno unište tumorske, ali ne i normalne ćelije organizma sugerise da osetljive tumorske ćelije mogu da poseduju dodatni target koji je potreban da bi bile osetljive na lek i stoga, otpornost može proisteći iz odsustva ili zasićenja maligne ćelije kao i iz prisustva faktora otpornosti<sup>56</sup>.

Koncentracije lekova koje su postignute u tumoru mogu odgovarati ili na "model ograničenog protoka" (proporcionalno protoku krvi kroz tumor) ili na "model ograničenja membrane" (neproporcionalni protok krvi kroz tumor i verovatno ograničena sposobnost leka da prođe kroz ćelijsku membranu)<sup>56</sup>.

Nekoliko faktora je povezano sa tumorima što može smanjiti protok krvi kroz tumor, uključujući visoki pritisak tkiva i povećani viskozitet krvi (na primer, zbog fibrinogena), a zbog smanjene vaskularne autoregulacije, protok krvi kroz tumor podložniji je promenama krvnog pritiska nego što je protok krvi u normalnom tkivu, a isporuka lekova, kao što je cisplatina se takođe može smanjiti brzim, nepovratnim vezivanjem za krvne i ekstracelularne proteine. Faktori koji ograničavaju protok krvi do tumora i sekundarno smanjuju isporuku kiseonika, odnosno nastanak hipoksije imaju različite efekte na hemoterapiju. Neki lekovi važni u lečenju raka pluća, npr. etopozid i paklitaksel, su manje efikasni u hipoksičnom tumorskom tkivu, dok je npr. topotekan efikasniji u hipoksičnim tkivima, a cisplatina je podjednako efikasna u hipoksičnim uslovima. Ćelije izložene hipoksiji mogu aktivirati antiapoptotske signalne puteve koji povećavaju rezistenciju na hemoterapiju<sup>56</sup>.

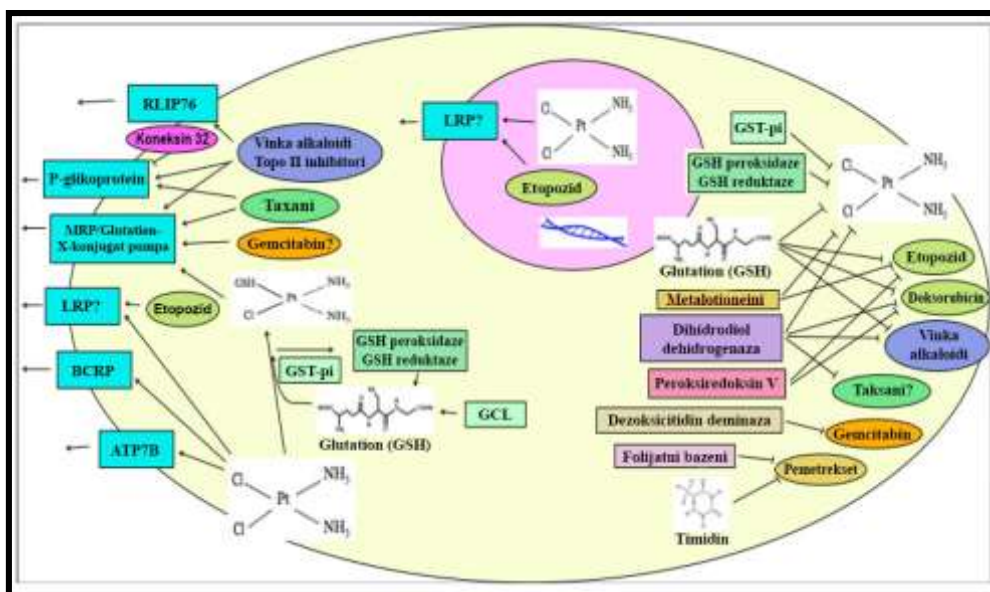
### ***1.7.1. Signalni putevi i rezistencija na hemoterapiju***

U nemikrocelularnim karcinomima pluća, PTEN inaktivacija povećava otpornost na paksitaksel. Hipoksija aktivira PI3K/Akt/mTOR put i indukuje otpornost na ultravioletnu svetlost i etopozid. Kod pacijenata sa uznapredovalim nemikrocelularnim karcinomom odgovor na prvu liniju hemoterapije ne korelira sa imunohistohemijskim pAkt statusom. U ćelijskim linijama nemikrocelularnog karcinoma pluća, Akt1 – indukovana redukovana

rezistencija na cisplatinu čini se da je posredovana kroz mTOR556, a mTOR inhibitor CCI-779 poboljšava efekat cisplatinu u ćelijskim linijama rezistentnim na cisplatinu<sup>56,57</sup>. Rodenhuis sa saradnicima (1997 g.) je KRAS mutaciju otkrio kod 21% nemikrocelularnih karcinoma pluća u svojoj studiji<sup>58</sup>, a Eberhard sa saradnicima (2005 g.) u 26% adenokarcinoma pluća<sup>59</sup>. Lee sa saradnicima (2006 g.)<sup>60</sup> je u kliničkoj studiji zaključio da odgovor na hemoterapiju baziranu na platini i paklitakselu kao i vreme progresije tumora kod pacijenata sa uznapredovalim nemikrocelularnim karcinomom pluća nema uticaja na imunohistohemijski dokazanu pERK ekspresiju. Ukoliko i postoji neka uloga Ras/Raf/MEK/ERK signalnog puta u rezistenciji na hemoterapiju, ona ostaje nerazjašnjena.

### 1.7.2. Transportne pumpe

Familija ATP-vezujućih (engl. *ATP-binding cassette, ABC*) transportera je odgovorna za aktivan transport velikog broja jedinjenja kroz ćelijsku membranu uključujući i fosfolipide, jone, peptide, steroide, polisaharide, amino-kiseline, organske anjone, žučne kiseline i lekove (Slika 8.).



Slika 8.: Koncentracija leka se može smanjiti dejstvom transportnih pumpi. Preuzeto i modifikivano prema Stewart, 2010<sup>55</sup>

Transportni proteini koji pripadaju ovoj familiji su P-glikoprotein (P-gp, ABCB1), MRP1 (engl. *Multidrug Resistance-associated Protein 1, ABCC1*), BCRP (engl. *Breast Cancer*

*Resistance Protein*, ABCG2). Oni izbacuju lekove koristeći energiju adenzin-tri-fosfatne hidrolize i dovode do rezistencije kancerskih ćelija na hemoterapeutike<sup>61,62</sup>.

#### **1.7.2.1. P-glikoprotein (P-gp, ABCB1)**

P-gp je membranski transportni glikoprotein poznat i pod imenom “*multidrug resistance protein 1 (MDR1)*” ili ATP-vezujući transporter (ABCB1) i predstavlja prvi značajan napredak u razumevanju *multi-drug* rezistencije. P-gp je sposoban da transportuje hemoterapeutike i prisutan je u tkivima uključenim u absorpciju, metabolizam i izlučivanje lekova. Redukovana akumulacija hemoterapeutika u malignim ćelijama je udružena sa porastom nivoa P-gp-a<sup>59</sup>.

P-gp je normalno prisutan u jetri, bubrezima, tankom i debelom crevu i hematoencefalnoj barijeri. Njegovo prisustvo je uočeno u plućima, i u bronhijalnom epitelu i u pneumocitima<sup>60,63</sup>.

Prekomerna P-gp ekspresija se najčešće uočava u kancerskim ćelijama izloženim tretmanu doksorubicinom ili paklitakselom (Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer* 2:48–58.). Povećano prisustvo P-gp pumpe imaju i one maligne ćelije koje su tretirane gemcitabinom<sup>56</sup>.

Cordon-Cordo je sa saradnicima (1990 g.)<sup>64</sup> imunohistohemijski uočio prisustvo P-gp proteina u 2 od 22 analizirana uzorka nemikrocelularnog karcinoma pluća. Ekspresija je bila prisutna u 20% tumorskih ćelija. Autori ovog rada su predložili praktičnu primenu ovog antitela u kliničkoj praksi radi boljeg razumevanja biološkog ponašanja tumora i u cilju efikasnije terapije.

Juranka sa saradnicima (1989 g.)<sup>65</sup> je u svojoj studiji primetio da je u izvesnom broju slučajeva P-gp na biopsijama recidivirajućeg tumora posle hemoterapije bio povećan u odnosu na isti tumor pre terapije. Međutim, isti autori su konstatovali i da je u nekim tumorima pre primenjene hemoterapije P-gp nivo bio visok, obrazlažući da je fenotip tih ćelija drugačiji nego kod drugih tumora što je bitno za dalja klinička ispitivanja efikasnosti hemoterapije. Roy sa saradnicima (2007 g.)<sup>66</sup> je u svom radu sugerisao da je *multi-drug* rezistencija, bilo urođena ili stečena, i P-gp posredovana, problem u lečenju nemikrocelularnog karcinoma pluća i da radi boljeg razumevanja mehanizma njenog

nastanka u istraživanjima treba ispitivati i prisustvo ekspresije gena koji kodiraju transportne pumpe i utvrditi nivo ovih proteina u malignim ćelijama.

#### ***1.7.2.2. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1, ABCC1)***

MRP1/ABCC1 transporter je široko rasprostranjen u normalnom tkivu, ali njegova prekomerna ekspresija je prisutna u karcinomima pluća, dojke i prostate gde je jasno da je njegova transportna uloga bitna u nastanku rezistencije na lekove. Po mišljenju Munoz i saradnika (2007 g.)<sup>66</sup> kod nemikrocelularnih karcinoma pluća često je prisutna prekomerna ekspresija MRP1-a pre početka hemoterapije. Prisustvo MRP1 u ćelijama nemikrocelularnog karcinoma pluća je visoko značajan indikator slabog odgovora na hemoterapiju i lošeg preživljavanja. Nivo ekspresije MRP1 raste kod metastatskih i recidivirajućih nemikrocelularnih karcinoma pluća. Ova transportna pumpa povećava izbacivanje hemoterapeutika na bazi platine, naročito cisplatine<sup>57</sup>.

Nooter sa saradnicima (1996 g.)<sup>68</sup> je konstatovao da je najsnažniji intenzitet MRP1 ekspresije prisutan u dobro diferentovanim karcinomima pluća, najčešće skvamocelularnog tipa. Wright sa saradnicima (1998 g.)<sup>69</sup> je, međutim, ustanovio da postoji heterogenost u ekspresiji MRP1-a među različitim histološkim tipovima, tačnije većina adenokarcinoma je umereno ili jako ekspimirala MRP1, dok ga skvamocelularni i krupnoćelijski karcinomi nisu ekspimirali. Nije utvrđena korelacija između histološkog gradusa i MRP1 nivoa u ćelijama svih tipova nemikrocelularnih karcinoma, ali jeste pronađena značajna korelacija između histološkog gradusa i MRP1 nivoa u adenokarcinomima posebno. MRP1 nivo u ćelijama nemikrocelularnih karcinoma pluća nije zavisio od kliničkopatoloških faktora koji su analizirani (pol, starost, prisustvo metastaza, stadijum bolesti i veličine). MRP1 nivo nije bio značajan marker za agresivnost tumora i preživljavanje pacijenata. Korelacija između nivoa MRP1 ekspresije i odgovora na hemoterapiju nije zavisila od ovih varijabli.

Lario sa saradnicima je (2007.g.)<sup>70</sup> upoređivao nivo MRP1 ekspresije prema histološkom tipu nemikrocelularnog karcinoma pluća. Ovom studijom je i pored malog broja ispitivanih nemikrocelularnih karcinoma pluća utvrđeno da je ekspresija MRP1 proteina visoko prisutna i da je od tri ispitivana proteina (MRP1, P-gp i LRP-engl. *lung resistance protein*), najčešće ekspimiran LRP, ali da je istovremena ekspresija sva tri proteina najčešće utvrđena kod skvamocelularnog karcinoma. P-gp ekspresija je bila uglavnom



udružena sa LRP ekspresijom i uzrok je nekompletnog odgovora karcinoma na hemoterapiju. Ekspresija sva tri proteina nije udružena sa prognostičkim faktorima kao što su stadijum tumora i ne utiče na preživljavanje i rizik od recidiva tumora.

### **1.7.2.3. Breast cancer resistance protein (BCRP)**

BCRP je polustransporter i izolovan je iz atipičnih rezistentih ćeliskih linija karcinoma dojke selektovanih dejstvom doksorubicina i verapamila. Prekomerna BCRP ekspresija u ćelijama ukazuje da postoji unakrsna rezistencija na mitoksantron i DNA topoizomerazu i inhibiše topotekan i SN-38, jako sugerišući da BCRP igra značajnu ulogu u stečenoj rezistenciji na ove lekove<sup>71</sup>.

BCRP je poznat i kao ABCG2, ABCP i MXP, ABC transporter sa N-terminalnim adenzin trifosfat-vezujućim domenom i C-terminalnim transmembranskim domenom<sup>66</sup>. BCRP je obično prisutan u različitim normalnim tkivima kao što su placenta, tanko crevo, bubreg, jetra, žlezdani epitel dojki, ovarijumi, testisi, endotelne ćelije i matične ćelije hematopoeze<sup>72,73,74</sup>. Prekomerna BCRP ekspresija kod nekih malignih ćelija može ograničiti efikasnost nekih antitumorskih lekova, odnosno dokazano je da je BCRP ekspresija odgovorna za njihovu rezistenciju na hemoterapeutike. BCRP posreduje u izbacivanju hemoterapeutika iz ćelija i tkiva, suprimira njihovu ulogu kompetitivnom inhibicijom menjajući im farmakokinetiku i farmakodinamiku. Porast koncentracije hemoterapeutika dovodi do sporednih efekata na hematopoetski i digestivni sistem<sup>75</sup>.

Yanase i saradnici (2004 g.)<sup>76</sup> su dokazali da gefitinib, EGFR inhibitor, inhibiše transportnu BCRP funkciju i vraća BCRP-posredovanu rezistenciju na lekove *in vitro* i *in vivo*. Nakamura sa saradnicima je (2005 g.)<sup>71</sup> je zaključio da gefitinib izaziva rezistenciju na lek inhibicijom izbacivanja leka kod tri *multi-drug* rezistentne kancerske linije prekomernom BCRP ekspresijom. Gefitinib inhibiše BCRP-posredovan transport topotekana u vezikulama plazma membrana kompetitivnom inhibicijom. Shi sa saradnicima (2007 g.)<sup>77</sup> navodi da erlotinib značajno vraća ABCB1- i ABCG2-posredovanu *multi-drug* rezistenciju u malignim ćelijama direktnom inhibicijom ABCB1 i ABCG2 funkcije, što dovodi do povećanja intracelularnog gomilanja antikancerskih lekova. Autori ovog rada zaključuju da je optimalna strategija kombinacija antikancer lekova koji su substrati ABCB1 i ABCG2 sa ovom klasom TKI kod pacijenata. Katayama sa saradnicima (2009 g.)<sup>78</sup> je ustanovio da BCRP ekspresija menja senzitivnost na

gefitinib u visoko gefitinib-senzitivnim kancerskim ćelijama. Povećana BCRP ekspresija u ćelijama nemikrocelularnog karcinoma pluća je loš prognostički znak, pošto ovaj protein ima afinitet za vezivanje i izbacivanje iz ćelije hemoterapeutika na bazi platine<sup>56</sup>. Svi navedeni autori u svojim radovima, bez obzira o kojoj transportnoj pumpi je reč, se slažu da su neophodna dalja istraživanja radi boljeg razumevanja nastanka *multi-drug* rezistencije i pronalaska leka koji će modifikovati signalne puteve i nastanak rezistencije na lekove bez obzira na histološki tip karcinoma i njegovo poreklo<sup>61-78</sup>.

Hemoterapija nemikrocelularnog karcinoma pluća je i dalje bazirana na derivatima platine. Znanja o hemoterapiji nemikrocelularnih karcinoma pluća se stalno razvijaju ali preživljavanje pacijenata nije značajno bolje njenom primenom. Novi biološki agensi i biomarkeri su poželjni u terapiji uznapredovalih nemikrocelularnih karcinoma pluća. Pu sa saradnicima (2011 g.)<sup>18</sup> je na nalazima baziranim na malim biopsijskim uzorcima ukazao da je homogena terapija pacijentima omogućila da se identifikuju genetske promene unutar PI3K/Akt/mTOR signalnog puta koji je udružen sa razvijanjem toksičnosti i kliničkim ishodom pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća. Ovi rezultati mogu obezbediti osnovu za izučavanje drugih biomarkera u individualizovanoj terapiji u cilju unapređenja efekata i redukcije toksičnosti hemoterapije u čijoj osnovi su agensi na bazi platine.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su da se ispita kakav je prediktivni značaj PI3K/Akt/mTOR signalnog puta i transportnih pumpi uključenih u urođenu i stečenu rezistencije na lekove kod pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća i to kroz:

1. Analizu PTEN, pAkt, pERK ekspresije na proteinskom nivou, kao i LOH *PTEN*-a kod 35 uzoraka nemikrocelularnog karcinoma pluća i uporednog normalnog tkiva dobijenih od pacijenata koji nisu dobijali neoadjuvantnu hemoterapiju kao i kod 35 uzoraka nemikrocelularnog karcinoma pluća i uporednog normalnog tkiva dobijenih od pacijenata koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju.
2. Analizu ekspresije transportnih pumpi P-gp, MRP1 i BCRP na RNA i proteinskom nivou kod 35 uzoraka nemikrocelularnog karcinoma pluća i uporednog normalnog tkiva dobijenih od pacijenata koji nisu dobijali neoadjuvantnu hemoterapiju kao i kod 35 uzoraka nemikrocelularnog karcinoma pluća i uporednog normalnog tkiva dobijenih od pacijenata koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju.
3. Korelaciju dobijenih promena međusobno kao i sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata i utvrđivanje njihove uloge u patogenezi nemikrocelularnog karcinoma pluća.
4. Sagledavanje dužine preživljavanja pacijenata u odnosu na dobijene promene analiziranih gena i proteina.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Tip studije**

U ovom istraživanju koristiće se prekinuta vremenska serija (engl. *interrupted time series*) po principu pre i posle intervencije. Intervencija u ovom slučaju bi bila uvođenje nove procedure u lečenju karcinoma pluća, odnosno primena preoperativne, neoadjuvantne hemoterapije koja je nedavno uvedena u našoj zemlji.

Prvu grupu pacijenata je činilo 35 bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća koji su bili operisani 2004 g. bez primene preoperativne, neoadjuvantne hemoterapije. Drugu grupu pacijenata je činilo 35 bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća koji su preoperativno bili podvrgnuti neoadjuvantnoj hemoterapiji a koji su operisani od nemikrocelularnog karcinoma pluća između 2007 i 2011 godine.

Odlukom Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu dobijena je dozvola za korišćenje navedenog materijala za izradu ove doktorske teze.

#### **3.2. Pacijenti**

Posmatrali smo dve grupe pacijenata operisanih na Klinici za grudnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije u naznačenom periodu. Kod svih pacijenata patohistološka dijagnoza je postavljena na Odeljenju za torakopulmonalnu patologiju Službe za patohistologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Genetska i imunohistohemijska ispitivanja su obavljena na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Dr Siniša Stanković“ u Beogradu.

Kliničko-patološke karakteristike pacijenata uključenih u ovu studiju su prikazane u Tabeli 7.

U prvoj grupi od 35 pacijenata sa neoadjuvantnom terapijom 16 je bilo operisano od adenokarcinoma, a 19 od skvamocelularnog karcinoma. Kod 35 pacijenata u drugoj grupi koji preoperativno nisu primali hemoterapiju, odnosno bez neoadjuvantne terapije, dijagnostikovano je 15 adenokarcinoma i 20 skvamocelularnih karcinoma.

Kod pacijenata obe grupe korišćena je histološka klasifikacija karcinoma pluća svetske zdravstvene organizacije iz 2004 g<sup>8</sup>. Patološki stadijum tumorske bolesti kod svih

karcinoma dijagnostikovanih pre 2010 g. je reklasifikovan po preporukama iz 2009 g<sup>11,12</sup>. Podaci o preživljavanju obe grupe pacijenata su dobijeni iz mortalitetne baze Instituta za zaštitu zdravlja Srbije “Dr Milan Jovanović – Batut”, Beograd, ili iz istorija bolesti operisanih pacijenata kod kojih je aplikovana neoadjuvantna hemoterapija u Dnevnoj bolnici Klinike za plućne bolesti Kliničkog centra Srbije, Beograd. Telefonski pozivi pacijenata ili njihovih porodica su korišćeni kad ovaj podatak nije postojao u navedenim bazama.

### **3.3. Tkivni uzorci**

Isečci tumora operativnog materijala pluća su korišćeni za patohistološku dijagnostiku koja je uključivala histološki tip karcinoma, histološki gradus i stadijum tumorske bolesti kojima se utvrđivalo prisustvo zahvaćenosti pleure, metastaze u limfne noduse, intrapulmonalne metastaze kao i stepen nekroze, vezivnotkivne i zapaljenske reakcije. Isečci su fiksirani u tkivnom procesoru (Leica Microsystems TP1020, Nemačka) po rutinskoj proceduri, dehidratacijom u alkoholima rastuće koncentracije, ksilolu i parafinu. Nakon fiksacije isečci tumora pluća su kalupljeni u parafinske blokove, pa su zatim mikrotomom (Leica Microsystems RM2245, Nemačka) sečeni preseki debljine 2 $\mu$ m, bojeni hematoksilin-eozin metodom i poklapani kanadabalzomom i prekrivani pločicom. Patohistološka dijagnostika tumora pluća je obavljena pregledom materijala pod mikroskopom (Leica Microsystems DM2500, Nemačka).

Imunohistohemijska bojenja su vršena na slajdovima debljine 3 $\mu$ m dobijenim iz parafinskih blokova tumora pluća obe ispitivane grupe, a rezultati su tumačeni pod mikroskopom kada su načinjene i mikrofotografije (Leica Microsystems DM2500, Nemačka). Rezultati imunohistohemijskih bojenja su tumačeni od strane dva nezavisna patologa koji su sve dileme rešavali dogovorom ukoliko je razlika u interpretaciji rezultata bila veća od 10%.

Za genetska ispitivanja su korišćeni drugi parafinski blokovi istog tumora kod prve ispitivane grupe, a kod druge su korišćeni sveži isečci tumora pluća, postoperativno zamrzavani i čuvani u tečnom azotu.

### **3. 4. Izolacija nukleinskih kiselina**

#### **3.4.1. Izolacija genomske DNK iz parafinskih preseka tumorskog i normalnog plućnog tkiva**

Genomska DNK je izolovana iz po 35 parafinskih preseka tumorskog tkiva pluća i okolnog normalnog tkiva prve grupe pacijenata korišćenjem kompleta proizvođača KAPA (KAPA Express Extract DNA Extraction Kit, SAD). DNK izolovana iz normalnog tkiva je objedinjena i korišćena u daljim ispitivanjima kao kontrolni uzorak. Procedura izolacije se sastojala iz sledećih koraka:

1. Tkivni preseci su postavljeni ( $\leq 80\mu\text{m}$ ) u 1,5ml tubicu.
2. Dodat je 10 $\mu\text{l}$  pufera za ekstrakciju DNK iz parafina, nakon toga je dodato 2 $\mu\text{l}$  enzima za ekstrakciju iz kompleta proizvođača KAPA, a zatim je dodata dejonizovana voda do ukupnog volumena od 100 $\mu\text{l}$ .
3. Smeša je inkubirana 10 minuta na 75°C u prethodno zagrejanom termobloku. Nakon inkubacije smeša je promešana i ponovo inkubirana 5 minuta na 95°C da bi se inaktivirao enzim za ekstrakciju DNK.
4. Smeša je zatim centrifugirana i prebačena u vodeni rastvor u novu tubicu od 0.5ml. Izolovana DNK je čuvana na – 20°C.

#### **3.4.2. Izolacija genomske DNK iz tumorskog i normalnog plućnog tkiva**

Prikupljeni uzorci tumorskog i normalnog tkiva pluća druge grupe od 35 pacijenata su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani do izolacije DNK.

Genomska DNK je izolovana po proceduri opisanoj od strane Sambrook i saradnika (1982)<sup>76</sup>. Postupak izolacije se sastojao u sledećem:

1. Približno 100mg tkiva se lizira u 1ml digestionog pufera (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 25mM EDTA pH=8) i odmah se doda finalno 0,5% SDS-a i 0,15mg/ml proteinaze K. Lizat se inkubira preko noći na 50°C.
2. Narednog dana pre početka ekstrakcije se ponovo dodaje ista količina proteinaze K i lizat inkubira još 1 sat na 50°C uz mešanje.
3. Ekstrakcija DNK započinje dodavanjem smeše fenol/hloroform/izoamil-alkohol (25:24:1) u tubice u zapremini u kojoj je dodat digestioni pufer prethodnog dana. Celokupna smeša se inkubira na sobnoj temperaturi 20 minuta i potom lagano

promućka i centrifugira na 10000rpm 10 minuta. Gornja vodena faza se odvoji u nove tube i postupak ekstrakcije se ponovi još 2 puta.

4. Ceo postupak se potom ponovi sa smešom hloroform/izoamilalkohol (24:1) pri čemu se ova smeša dodaje u zapremini izdvojene vodene faze iz prethodnog koraka.
5. Dodaje se RNA-za A 100g/ml finalno i inkubira 1h na 37°C.
6. Dodaje se proteinaza K finalno 0,15mg/ml i inkubira još 1h na 37°C.
7. Korak organske ekstrakcije se ponavlja najpre sa smešom fenol/hloroform/izoamilalkohol (25:24:1), a potom i sa smešom hloroform/izoamilalkohol (24:1). Obe smeše se dodaju u zapremini izdvojene vodene faze.
8. DNK se precipitira istovremenim dodavanjem ½ zapremine 3M natrijum-acetata i 2 zapremine 100% etanola, uz lagano mućkanje dok se ne pojave končići DNK. Ovako precipitirana DNK može se neograničeno dugo čuvati na -20°C. DNK se vadi staklenim stapićem, ispira u 70% etanolu i na kraju rastvara u TE puferu.
9. Koncentracija DNK se spektrofotometrijski određuje nakon potpunog rastvaranja u uzorcima (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

### **3.4.3. Provera kvaliteta izolovane DNK**

Očuvanost i kvalitet izolovane DNK je proverena elektroforezom uzoraka na 0.8% agaroznom gelu. Agarozni gel se pravi rastvaranjem 0,8g agaroze (AppliChem GmbH, Nemačka) u 100ml 1X TBE pufera, pH8.2 (0.09M Tris-borat, 0.02M EDTA), zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici do rastvaranja. U agarozni rastvor, ohlađen do 50°C, dodaje se finalno 0,4μg/ml etidijum-bromida, a zatim se gel izliva u kalup za elektroforezu i ostavi da polimeriše.

Uzorak DNK se priprema tako što se 5μl rastvora DNK pomeša sa 1μl boje (0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu) i zatim se nanosi na polimerizovan agarozni gel. Elektroforeza se vrši u 1XTBE puferu na 100V. Nakon elektroforeze DNK se vizuelizuje na Gel Doc sistemu (*Gel Doc 1000, Bio Rad, SAD*). Intaktna DNK daje jasne oštre trake, dok degradirani molekuli formiraju razmaz duž gela.

#### **3.4.4. Izolacija RNK iz parafinskih preseka tumorskog i normalnog plućnog tkiva**

RNK je izolovana iz parafinskih preseka tumorskog i normalnog tkiva pluća 35 pacijenata korišćenjem kompleta proizvođača AMBION (RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit, SAD). RNK izolovana iz normalnog tkiva pomešana je i korišćena u daljim eksperimentima kao kontrolni uzorak.

1. Deparafinizacija: staviti tkivne preseke ( $\leq 80 \mu\text{m}$ ) u 1,5ml tubu. Dodati 1ml 100 % ksilola, promešati na mešalici, kratko centrifugirati pa staviti 10 minuta u termo blok prethodno zagrejan na  $55^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga centrifugirati uzorke 2 minuta na maksimalnoj brzini. Pažljivo odliti gornju fazu (ksilol) pa dodati 1ml 100% etanola. Blago promešati na mešalici pa centrifugirati 2 minuta na maksimalnoj brzini centrifuge. Odliti etanol pa osušiti na vazduhu 15 do 45 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Digestija proteazama: dodati 100 $\mu\text{l}$  digestionog pufera iz kompleta za preseke tkiva manje od 40 $\mu\text{m}$  ili 200 $\mu\text{l}$  digestionog pufera za tkivne preseke debljine od 40 do 80 $\mu\text{m}$ . Inkubirati 15 minuta na  $50^{\circ}\text{C}$ , pa 15 minuta na  $80^{\circ}\text{C}$ u prethodno zagrejanom termo bloku. Nakon inkubacije u zavisnosti od zapremine digestionog pufera dodaju se različite zapremine izolacionog rastvora i 100% etanola. Na 100 $\mu\text{l}$  digestionog pufera dodati 120 $\mu\text{l}$  izolacionog rastvora iz kompleta kao i 275 $\mu\text{l}$  etanola. Na 200 $\mu\text{l}$  digestionog pufera dodati duplo veće zapremine izolacionog rastvora i etanola. Promešati smešu i sipati 700 $\mu\text{l}$  na kolonu sa filterom prethodno stavljenu u tubicu od 2ml. Centrifugirati pola minuta (10000rpm). Odliti svu tečnost koja je prošla kroz filter i ponoviti proceduru sve dok sva mešavina ne prodje kroz filter.
3. Ispiranje kolone: dodati 700 $\mu\text{l}$  pufera broj 1 iz kompleta na kolonu sa filterom, centrifugirati (10000rpm) 30 sekundi. Odbaciti tečnost koja je prošla kroz filter. Dodati 500 $\mu\text{l}$  pufera broj 2/3 iz kompleta na kolonu i ponovo centrifugirati 30 sekundi na brzini od 10000rpm. Ponoviti postupak centrifugiranja da bi se odstranio višak tečnosti.
4. Digestija nukleaza i prečišćavanje nukleinskih kiselina: napraviti smešu od sledećih komponenti iz kompleta: 6 $\mu\text{l}$  10x DNK-aza pufera, 4 $\mu\text{l}$  enzima DNK-aze kao i 50 $\mu\text{l}$  DEPC vode po uzorku. Dodati 60 $\mu\text{l}$  smeše na centar kolone sa filterom i inkubirati 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodati 500 $\mu\text{l}$  pufera broj 2/3 iz kompleta na kolonu i centrifugirati 30 sekundi na brzini od 10000rpm. Odbaciti tečnost koja je prošla kroz filter i ponoviti postupak ispiranja. Prebaciti kolonu sa filterom u novu



tubicu od 2ml i dodati 60 $\mu$ l DEPC vode, ostaviti 1 minut na sobnoj temperaturi i centrifugirati 1 minut na maksimalnoj brzini. U eluatu se nalazi RNK.

#### **3.4.5. Izolacija RNK iz tumorskog i normalnog plućnog tkiva**

Totalna RNK iz prikupljenih uzoraka tumorskog i normalnog tkiva pluća druge grupe od 35 pacijenata je izolovana korišćenjem TRIZOL reagensa (Invitrogen, SAD). Postupak izolacije se sastojao iz nekoliko koraka:

1. Homogenizacija: tkivo se usitni i lizira dodavanjem 1 ml TRIZOL-a i homogenizuje ponavljanim gnječenjem.
2. Faza razdvajanja: homogenizovani uzorci se inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali i potom se dodaje 0,2ml hloroforma na 1 ml TRIZOL-a. Tube se snažno protresu i zatim dodatno inkubiraju na sobnoj temperaturi 2 – 3 minuta. Uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 12000 x g na 4°C. Smeša se na taj način razdvaja na donju crvenu fenol-hloroformsku fazu, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalaze RNK molekuli. Zapremina vodene faze bi trebalo da bude 60% volumena TRIZOL-a korišćenog za homogenizaciju.
3. Precipitacija RNK: vodenu fazu preneti u nove tubice i dodati 0,5ml izopropanola na 1ml TRIZOL-a početno korišćenog. Inkubirati uzorke 10 minuta na sobnoj temperaturi i potom ih centrifugirati 10 minuta na 12000 x g na 4°C. RNK se na ovaj način istaloži i formira beličasti talog na dnu tubica.
4. Ispiranje RNK: ukloniti supernatant. Talog RNK jedan put isprati sa 1ml 75% etanola (rastvoren u 0.1% DEPC vodi). Vorteksovati uzorke i centrifugirati ih na 7500xg 5 minuta na 4°C. Na ovom koraku procedura može da se prekine i RNK u 75% etanolu može da se čuva na -20°C i do godinu dana.
5. Rastvaranje RNK: nakon centrifugiranja uzoraka odliti etanol i ostaviti tubice da se talog osuši. Ne dozvoliti da se talog u potpunosti sasuši jer se time značajno smanjuje njegova rastvorljivost. Na kraju rastvoriti RNK u 0.1% DEPC vodi (DEPC – dietil pirokarbonat, potentni inhibitor RNK-aze).
6. Nakon izolovanja i rastvaranja određena je koncentracija RNK u uzorcima spektrofotometrijski (*BioPhotometer, Eppendorf, Nemačka*).

### **3.4.6. Provera kvaliteta RNK**

Intaktnost i kvalitet izolovane RNK je proverena elektroforezom uzoraka na 1% agaroznom gelu. Agarozni gel se pravi po proceduri opisanoj u poglavlju 4.4.3. Uzorak RNK se priprema tako što se 1µl rastvora RNK pomeša sa 3µl boje (0.4% bromfenol plavo u 50% glicerolu) i zatim se nanosi na polimerizovan agarozni gel.

Elektroforeza se vrši u 1XTBE puferu na 70-100V. Nakon elektroforeze RNK se vizuelizuje na Gel Doc sistemu (*Gel Doc 1000, Bio Rad, SAD*). Intaktnost i kvalitet izolovane RNK se određuje na osnovu izgleda traka za 28S i 18S rRNK, kao i odnosa njihovog intenziteta koji bi trebalo da iznosi 1.6 – 2.0.

### **3.5. Analiza gubitka PTEN heterozigotnosti (LOH analiza)**

DNK dobijena iz malignog i odgovarajućeg normalnog tkiva pluća svakog od 70 pacijenata je korišćena za analiziranje gubitka heterozigotnosti *PTEN* tumor supresor gena (LOH analiza) koja se zasniva na korišćenju visoko polimorfni mikrosatelitskih markera vezanih za odgovarajući tumor supresor gen, njihovoj PCR amplifikaciji i kapilarnoj elektroforezi kako bi se utvrdio njihov gubitak delecijama, tj. gubitak tumor supresor gena za koji su vezani.

Pet polimorfni mikrosatelitski lokusa koji okružuju ili se nalaze unutar *PTEN* gena (D10S579, D10S1765, D10S215, AFM086wg9 i D10S541) je izabrano za analizu sa ciljem da se detektuju moguće delecije u okviru celog *PTEN* lokusa koji se nalazi na hromozomu 10q23 (Feilotter i saradnici, 1998<sup>80</sup>; Hahn i saradnici, 1999<sup>81</sup>). Uzvodni amplimeri za svaki od mikrosatelitski lokusa su obeležen na 5' kraju sa komercijalnim fluorescentnim bojama i to sledećim redom za pobrojane mikrosatelite Fam, Vic, Ned, Pet i Fam. Sekvence amplimera i opsezi očekivanih dužina proizvoda za svaki mikrosatelitski lokus su prikazani u Tabeli 7.

Svaki mikrosatelitski marker je umnožen iz genomske DNK pacijenata u 25µl reakcione smeše u prisustvu MgCl<sub>2</sub> u finalnoj koncentraciji 1,5mM i svakog od dNTPa u finalnoj koncentraciji 0,2mM prema sledećem amplifikacionom profilu: inicijalna denaturacija na 95°C 5 min, 40 ciklusa na 95°C 30s, 45s na 55°C i 72°C 45s, finalna elongacija 72°C 1 sat i na kraju 4°C neograničeno dugo, sa izuzetkom lokusa D10S215 kod koga su vremena denaturacije, hibridizacije i elongacije u ciklusima produžena na po 1 minut.

**Tabela 7. Sekvence amplimera i opseg dužina amplicona za mikrosatelitske markere *PTEN* lokusa**

Amplimeri	Dužina (bp)	Sekvence amplimera
D10S579-F <sup>a</sup> D10S579-R <sup>b</sup>	260-276	5'-FAM-CCGATCAATGAGGAGTGCC-3' 5'-ATACACCCAGCCAATGCTGC-3'
D10S1765-F D10S1765-R	166-184	5'-VIC-ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG-3' 5'-CAGCCTCCCAAAGTTGC-3'
D10S215-F D10S215-R	152-208	5'-NED-TGGCATCATTCTGGGGA-3' 5'-GCTTTACGTTTCTTCACATGGT-3'
AFM086wg9-F AFM086wg9-R	154-162	5'-PET-AAATGTACGGTTCATTGACTT-3' 5'-GACTGACTACAAATGGGCA-3'
D10S541-F D10S541-R	108-130	5'-FAM-TTTTGAGTTTCTGTACCCATCCC-3' 5'-ATCCACAAGTAACAGAAAGCC-3'

<sup>a</sup> F, uzvodni amplimer (engl. *forward*); <sup>b</sup> R, nizvodni amplimer (engl. *reverse*)

### **3.6. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)**

Reverzna transkripcija je urađena upotrebom kompleta *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputstvu proizvođača. Reakcije su izvedene pod sledećim uslovima: 65°C 10min, 37°C 2h i 85°C 5 min.

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu je korišćena za određivanje nivoa iRNK *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* gena u malignom i odgovarajućem normalnom tkivu pluća svakog od 70 pacijenata. Kvantitativne reakcije su rađene metodologijom *TaqMan Real Time PCR*-a. Za izvođenje reakcija korišćeni su eseji koji su sadržavali amplimere za amplifikaciju ciljnog gena kao i *TaqMan MGB* (engl. *Minor Groove Binder*) probu obeleženu 6-FAM-om za kvantifikacioni korak. Korišćeni eseji su bili *Assay Inventored Gene Expression Products* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i to: za *MDR1 Assay* ID Hs00324085m1, za *MRP1 Assay* ID Hs00219905m1 i za *BCRP Assay* ID Hs01053790m1. Reakcije su izvođene u finalnom volumenu od 25µl: 1 × *TaqMan Universal Master Mix* sa AmpErase UNG, 1 × *Assay Mix* i cDNK (2µg RNK prevedene

u cDNK). QPCR reakcije su izvedene u *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* na 50°C 2min, 95°C 10min, praćeno sa 40 ciklusa na 95°C 15s i na 60°C 1min. Reproducibilnost rezultata proveravana je izvođenjem barem tri nezavisne reakcije za svaki uzorak. U svaki eksperiment je bila uključena endogena kontrola i *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* ekspresije su normalizovane u odnosu na *HPRT1* ekspresiju (Assay ID Rn00567901m1). Za kvantifikaciju je rađen validacioni eksperiment kako je opisano kod drugih autora (Tanić i saradnici, 2007)<sup>82</sup>. Kvantifikacija je rađena po metodi  $2^{-\Delta\Delta C^t}$  (Livak i Schmittgen, 2001)<sup>83</sup>. Dobijeni rezultati su analizirani u softveru *RQ Study Add ON* na 7000v 1.1 SDS instrumentu (*ABI Prism Sequence Detection System*, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) u intervalu poverenja od 95% ( $P < 0,05$ ).

### **3. 7. Imunohistohemijska bojenja**

#### **3.7.1. Procedura imunohistohemijskog bojenja**

Priprema preparata za sva imunohistohemijska bojenja su vršena na isti način. Korišćeni su preseci iz parafinskih blokova karcinoma pluća debljine od 3 do 5µm koji su postavljeni na *Super-Frost* pločice za imunohistohemijska bojenja. Dobijeni preseci su tokom noći sušeni u inkubatoru na temperaturi od 56°C. Deparafinizacija je vršena u ksilolu (2 puta po 15 minuta), dehidracija u 100% alkoholu (2 puta po 15 minuta), pa u 96% alkoholu (2 puta po 15 minuta), a zatim u destilovanoj vodi (2 puta po 2minuta). Zatim je sledilo demaskiranje antigena vršeno *Target Retrieval Solution*, pH 9 (10x) (DAKO Cytomation, Danska, kod S2367), u vodenom kupatilu na temperaturi od 95°C u trajanju od 45 minuta. Posle hlađenja preparata u istom puferu na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta, izvršilo se kratko uklanjanje rastvora destilovanom vodom i TBS puferom (kod S3001, DAKO Cytomation, Danska), u trajanju 2 po 2 minuta. Blokiranje endogene peroksidaze je vršeno u 3% vodonik peroksidu u trajanju od 5 minuta. Zatim je sledilo uklanjanje ovih reagenasa rastvora destilovanom vodom i TBS puferom u trajanju 2 puta po 2 minuta.

**Tabela 8. Primenjena antitela, klon, proizvođač, razblaženje, dužina inkubacije i mesto reakcije u ćeliji**

Antitelo	Klon	Proizvođač	Razblaženje	Inkubacija	Reakcija
PTEN	PN37	Invitrogen, SAD	1:50	30´	citoplazma ili jedro
pAkt	HCL-1 AKT-Phos	Novocastra, Leica Biosystem, SAD	1:40	30´	jedro
pERK	P44/42-MAPK-ERK1/2(137 FS)	Cell Signaling, SAD	1:100	30´	citoplazma
P-gp	MSm Ab+p-JSB-1	Abcam, SAD	„ready to use“	60´	ćelijska membrana
MRP1	MRPm5(ab24102)	Abcam, SAD	1:100	30´	ćelijska membranai citoplazma
BCRP	ABCG2(BYP-22)	Abcam, SAD	1:40	30´	ćelijska membrana

Za sva primenjena antitela poštovana je receptura proizvođača, a njihov klon, proizvođač, primenjeno razblaženje, dužina inkubacije antitela i karakteristično mesto reakcije antitela u ćeliji su izneti u Tabeli 8.

Posle inkubacije primarnog antitela dva puta je uklanjan reagens TBS puferom u trajanju od po 2 minuta, a zatim je na preparat nalivan detekcioni sistem za vizuelizaciju. Prvo je nalivana prva komponenta sekundarnog antitela LSAB+ sistem čija je inkubacija trajala 30 minuta, koji je potom 2 puta uklanjan TBS puferom u trajanju od po 2minuta, posle čega je nalivan HRP polimer čija je inkubacija trajala 30 minuta. Njegovo uklanjanje TBS puferom je vršeno dva puta u trajanju od po 2 minuta. Ove komponente su proizvodi firme DAKO Cytomation, Danska, kod K0690.

Primenjen je sistem za vizuelizaciju reakcije DAB+hromogen (1ml supstrat + 1 kap hromogena), takođe proizvod DAKO Cytomation, Danska, kod K0673. Inkubacija ovog sistema je trajala 5 minuta, pa je reagens uklonjen destilovanom, a zatim običnom vodom uz 2 nalivanja TBS puferom u trajanju po dva minuta. Preparati su kontrastirani Mayerovim hematoksilinom (*Lillie* modifikacija, kod S3309, „*Ready-to-use*“), u trajanju od 2 do 5 minuta, koji je zatim uklonjen destilovanom vodom po 2 minuta. Svaki preparat je dehidriran u 96% i 100% alkoholu 2 puta po 5 minuta, prosvetlјivan u ksilolu 2 puta po 5 minuta i pokrivan glicerol medijumom za pokrivanje (DAKO Cytomation, Danska, kod C0563).

Pre započinjanja imunohistohemijskog bojenja na ispitivanim uzorcima, određivanje adekvatnog razblaženja antitela i potvrđivanje njihove ekspresije u karakterističnoj

organeli ćelije vršeno je na tkivu koje je preporučio proizvođač kao “pozitivnu kontrolu” (Tabela 9).

**Tabela 9. Ekspresija ispitivanih antitela u tkivima koja su poslužila kao “pozitivna kontrola” po preporuci proizvođača**

Antitelo	PTEN	pAkt	pERK	P-gp	MRP1	BCRP
Tkivo	duktalni epitel dojke	epiderm kože	duktalni epitel dojke	periferni nerv	hepatociti	trofoblasti placentе

### 3.7.2. Evaluacija ekspresije ispitivanih antitela

#### 3.7.2.1. PTEN

Po uzoru na rad Shoman i saradnika iz 2005 g.<sup>84</sup>, PTEN imunoreaktivnost je semikvantitativno određivana, kao H-skor (engl. *histo-scor*) i bila je bazirana na procentu ćelija (P) na analiziranom tkivnom uzorku čija je citoplazma ili jedro ekspimiralo PTEN i intenzitetu bojenja (SI). P – procenat imunoreaktivnih ćelija – “0”, nema imunoreaktivnosti; “1”, 1–10% tumorskih ćelija je imunoreaktivno; “2”, 11–50% tumorskih ćelija je imunoreaktivno; “3”, 51–100% tumorskih ćelija je imunoreaktivno. SI – intenzitet bojenja – “0”, nema imunoreaktivnosti; “1”, intenzitet bojenja je redukovan u odnosu na odgovarajuće normalne ćelije; “2”, intenzitet bojenja je isti kao kod normalnih ćelija; “3”, intenzitet bojenja je snažniji nego kod normalnih ćelija. PTEN status je bio definisan na sledeći način: smanjena ekspresija  $\leq 4$ , “L”; povećana ekspresija  $> 4$ , “H”. “Pozitivna kontrola” je bio duktalni epitel dojke (Tabela 10).

#### 3.7.2.2. pAkt

Po uzoru na rad Esteve i saradnika iz 2010 g.<sup>85</sup>, pAkt bojenje je bilo evaluirano takođe kao H-skor koji se izračunavao na osnovu proizvoda tumorskih ćelija koje su ekspimirale pAkt (P) i intenziteta bojenja antitela, SI (“0”,nema imunoreaktivnosti; “1”, slaba imunoreaktivnost, “2”, umerena imunoreaktivnost, i “3”, snažna imunoreaktivnost). Tako je maksimalni proizvod bio 300, a skor veći od 50 je bio smatran pozitivnim i označavan je kao “H”, a ukoliko je bio  $\leq 50$  označavan je kao “L”. Epiderm kože je služio kao “pozitivna kontrola” (Tabela 10).

### **3.7.2.3. pERK**

Nivo imunoreaktivnosti pERK-a je mikroskopski utvrđivana na osnovu prosečnog intenziteta bojenja antitela na skali od 0 do 3 i procenta imunoreaktivnih ćelija. Intenzitet bojenja (SI) je gradiran na sledeći način: “0”, nema imunoreaktivnosti; “1”, slaba imunoreaktivnost; “2”, umerena imunoreaktivnost i “3”, jaka imunoreaktivnost. Procenat malignih ćelija čija citoplazma eksprimira antitelo (P) je označavana na sledeći način: “0”, nema imunoreaktivnih ćelija; “0,1”, kod manje od desetine ćelija je prisutna imunoreaktivnost; “0,5”, kod manje od polovine ćelija je prisutna imunoreaktivnost; i “1”, kod više od polovine malignih ćelija je prisutna imunoreaktivnost. Proizvod intenziteta i skora su davali H-skor (Al-Haddad i saradnici, 1999g)<sup>86</sup>, a smatran je kao povećana imunoreaktivnost pERK-a ukoliko je skor bio veći od 1 – “H”, a ukoliko je skor bio  $\leq 1$ , označavan je kao “L” (Handra-Luca i saradnici, 2003.g.)<sup>54</sup>. Za “pozitivnu kontrolu” je korišćen preparat na kome je bio prisutan duktalni epitel dojke (Tabela 10).

### **3.7.2.4. P-gp, MRP1 i BCRP**

Ekspresija proteina sve tri analizirane transportne pumpe je posmatrana istom metodologijom. U ovom istraživanju korišćena je metodologija koju su primenili u svom radu Lario i saradnici (2007 g.)<sup>70</sup>. Ekspresija svake pojedinačne pumpe u više od 10% malignih ćelija na svakom preseku ispitivanog karcinoma je označena kao “H”, a  $\leq 10\%$  kao “L”. Analizirana je ekspresija svakog proteina pojedinačno, a nakon toga i prisustvo koekspresije dva ili sva tri proteina. Za prisustvo P-gp i BCRP ekspresije smatraju se površina ćelijske membrane, a za MRP1 i citoplazma i površina ćelijske membrane (Tabela 9). Izvršeno je i testiranje kvaliteta antitela na tkivima koje je preporučio proizvođač. Detalji se nalaze u Tabeli 10.

## **3.8. Statistička analiza**

Analizirani podaci su bili šifrirani, podaci o obeležjima kodirani, napravljena je baza podataka u *Excel* programu. Dobijeni rezultati obrađeni su softverom STATISTIKA 6.0 (*StatSoft, Inc., Tulsa, SAD*).

- a) Posmatrani su kliničko-patološki i genetski parametri: histološki tip karcinoma pluća, histološki gradus, klinički i patološki stadijum tumora, invazija limfnih nodusa,

reaktivni inflamatorni odgovor na prisustvo karcinoma, stepen nekroze, gubitak *PTEN* heterozigotnosti, PTEN, pAkt, pERK, P-gp, MRP1, BCRP ekspresija i ishod bolesti.

- b) Korišćeni su *Mann-Whitney* i *Fisher exact* test da bi se ispitala korelacija između različitih parametara.
- c) *Kaplan-Meier* statistička metoda je korišćena za ispitivanje preživljavanja, a *log rank* test je korišćen da bi se utvrdilo ukupno preživljavanje pacijenata koje je računato od prvog dana posle hirurške intervencije do smrtnog ishoda ili datuma poslednjeg kontrolnog pregleda.
- d) Statistička razlika je smatrana značajanom ako je  $P \leq 0,05$ .



## 4. REZULTATI

### 4.1. Kliničkopatološke karakteristike pacijenata

**Tabela 10.** Kliničkopatološke karakteristike obe grupe pacijenata

		Sa NAHT		Bez NAHT	
		N	%	N	%
Histološki tip					
	ADC	16	45.7	15	42.9
	SCC	19	54.3	20	57.1
Histološki gradus					
	1	10	28.6	7	20.0
	2	15	42.8	23	65.7
	3	10	28.6	5	14.3
Stadijum tumora					
	T1a	0	0.0	0	0.0
	T1b	2	5.8	1	2.8
	T2a	4	11.4	11	31.4
	T2b	4	11.4	8	22.9
	T2	10	28.6	0	0.0
	T3	11	31.4	15	42.9
Zahvatanje limfnih nodusa					
	N0	9	25.7	6	17.1
	N1	14	40.0	14	40.0
	N2	11	31.4	14	40.0
	N3	0	0.0	1	2.9
	Nx	1	2.9	0	0.0
Zahvatanje pleure					
	PL0	12	34.3	12	34.3
	PL1	12	34.3	14	40.0
	PL2	1	2.8	4	11.4
	PL3	10	28.6	5	14.3
Klinički stadijum					
	Ia	2	5.6	0	0.0
	Ib	3	8.6	2	5.7
	IIa	8	22.9	7	20.0
	IIb	7	20.0	5	14.3
	IIIa	12	34.3	20	57.1
	IIIb	3	8.6	1	2.9
	IV	0	0.0	0	0.0
Veličina tumora (najveći promer)					
	≤ 30mm	4	11.4	2	5.7
	31 to 70mm	24	68.6	24	68.6
	≥ 71mm	7	20.0	9	25.7
Stepen nekroze					
	no or scarce	27	77.1	25	71.5
	≤ 50%	5	14.3	6	17.1
	≥ 51%	3	8.6	4	11.4
Vezivnotkivna reakcija					
	slaba	5	14.3	6	17.1
	umerena	18	51.4	24	68.6
	izražena	12	34.3	5	14.3
Reakcija zapaljenskih ćelija					
	bez ili retka	9	25.7	15	42.8
	umerena	6	17.1	17	48.6
	izražena	20	57.1	3	8.6
Pol					
	muški	25	71.4	23	71.4
	ženski	10	28.6	12	34.3
Starost prosečna starost					
		57.5±13.5		55±19	
Pušački status					
	pušač	27	77.2	16	45.7
	nepušač	1	2.8	0	0.0
	bivši pušač	3	8.6	1	2.8
	bez podataka	4	11.4	18	51.4

Skraćenice: SSC –skvamocelularni karcinom; ADC – adenokarcinom, NAHT–neoadjuvantna hemoterapija

U prvoj grupi od 35 pacijenata sa neoadjuvantnom terapijom 45,7% (16/35) je bilo operisano od adenokarcinoma, a 54,3% (19/35) od skvamocelularnog karcinoma. Kod 35 pacijenata u drugoj grupi dijagnostikovano je 42,9% (15/35) adenokarcinoma i 57,1% (20/35) skvamocelularnih karcinoma.

Pacijenti prve grupe su bili dominantno muškog pola 71,4% (25/35), a prosečna starost ove grupe je iznosila 57,5 godina. U drugoj grupi pacijenti su dominantno bili muškog pola 65,7% (23/35), prosečne starosti 55,0 godina.

Najveći broj pacijenata ove grupe je imao T2 stadijum tumorske bolesti, 28,6% (10/35). Kod 40% (14/35) su dijagnostikovane metastaze u intrapulmonalne, hilarne i interlobarnelinfne noduse (N1), dok su metastaze i u medijastinalne limfne noduse (N2) dijagnostikovane kod 31,4% (11/35) pacijenata.

U ovoj grupi pacijenti su dominantno bili muškog pola 65,7% (23/35), a prosečna starost ove grupe je iznosila 55,0 godina. Dominantni patološki stadijum tumorske bolesti je bio T3 kod 42,9% (15/35) pacijenata.

Kod podjednakog broja pacijenata 40,0% (14/35), dijagnostikovane su metastaze u intrapulmonalne, hilarne i interlobarne limfne noduse (N1), odnosno metastaze u medijastinalne limfne noduse (N2).

Na osnovu ovih parametara i ostalih navedenih u Tabeli 10. određeni su patološki i klinički stadijum tumorske bolesti u trenutku operacije. Iz navedenih podataka najviše pacijenata je operisano u IIIa stadijumu – 34,3% (12/35) kod prve, kao i kod druge grupe pacijenata, 57,1% (20/35).

U Tabelama 11 i 12 su prikazane grupe ispitivanih pacijenata sa njihovim kliničkopatološkim parametrima kao i promenama dobijenim analizom ispitivanih gena i proteina.

**Tabela 11. Patohistološke karakteristike tumora, prisustvo LOH PTEN gena i PTEN, pAkt i pERK ekspresija**

Br.	Sa neoadjuvantnom terapijom										Bez neoadjuvantne terapije																					
	H. tip	Pol	Starost	g	T	N	PL	n	d	z	Velčina/mm	Pusački status	LOH-PTEN	PTEN	pAkt	pERK	H. tip	Pol	Starost	g	T	N	PL	n	d	z	Velčina/mm	Pusački status	LOH-PTEN	PTEN	pAkt	pERK
1	SCC	m	56	1	T2a	N0	PL0	1	2	2	45x35x25	pušač	LOH	L	L	L	ADC	m	58	1	T2b	N0	PL0	2	2	2	50x50x45	pušač	NI	L	L	L
2	SCC	m	52	3	T1b	N0	PL0	1	2	2	do 30	pušač	NI	L	L	L	SCC	m	51	2	T2b	N2	PL0	1	2	2	60x50x40	bez podataka	LOH	L	L	L
3	ADC	ž	63	2	T2a	N0	PL0	1	2	2	32x30x30	pušač	NI	L	L	L	SCC	ž	66	1	T2b	N0	PL0	1	1	2	60x50x35	pušač	NI	H	H	L
4	ADC	m	36	3	T3	N0	PL3	1	2	2	105x75x65	pušač	NI	L	L	L	SCC	m	56	1	T1b	N1	PL0	1	2	3	do 30	bez podataka	NI	L	L	L
5	ADC	m	57	2	T4	N2	PL3	2	2	2	65x60x55	pušač	LOH	H	H	H	SCC	m	48	2	T3	N2	PL2	1	2	1	50x30x15	bez podataka	LOH	H	L	H
6	SCC	m	56	3	T2	N0	PL1	1	3	2	65x50x35	pušač	NI	L	L	L	SCC	m	48	1	T3	N1	PL1	1	2	2	50x45x40	bez podataka	LOH	L	H	L
7	ADC	ž	61	3	T2	N0	PL1	1	2	3	60x40x30	bivši pušač	NI	L	L	L	ADC	m	59	2	T2b	N1	PL0	1	3	2	70x60x60	pušač	LOH	H	H	H
8	ADC	m	62	1	T2	N1	PL1	1	3	2	40x40x35	pušač	LOH	H	H	H	SCC	m	50	2	T3	N2	PL1	1	1	1	50x50x40	pušač	NI	L	L	L
9	SCC	m	59	3	T3	N2	PL1	3	1	1	112x95x73	pušač	LOH	H	H	H	SCC	m	71	2	T3	N1	PL3	1	3	3	90x60x50	pušač	NI	L	L	L
10	ADC	m	58	1	T3	Nx	PL3	1	1	1	80x70x50	pušač	LOH	H	H	H	SCC	m	67	3	T2b	N1	PL1	1	2	1	60x60x40	pušač	NI	L	L	L
11	SCC	m	52	3	T3	N1	PL3	2	2	2	40x30x30	bivši pušač	LOH	L	L	L	ADC	ž	48	1	T3	N3	PL1	1	2	1	70x60x60	bez podataka	NI	L	L	L
12	SCC	m	59	2	T4	N2	PL3	1	2	2	50x50x40	pušač	?	L	L	L	ADC	m	53	2	T2a	N1	PL2	2	2	1	40x35x20	bez podataka	NI	L	L	L
13	SCC	ž	58	3	T2b	N1	PL0	1	3	2	60x50x40	pušač	LOH	H	L	L	ADC	ž	51	3	T2a	N2	PL1	1	2	1	40x35x30	bez podataka	NI	L	L	L
14	SCC	m	56	2	T2	N1	PL1	1	2	3	65x50x45	pušač	NI	H	L	L	ADC	ž	52	2	T2a	N1	PL2	2	2	1	30x30x20	bez podataka	LOH	H	L	L
15	SCC	ž	54	2	T2	N0	PL1	1	2	2	30x25x22	bez podataka	LOH	L	L	L	SCC	m	44	2	T3	N2	PL3	1	2	3	65x60x40	pušač	NI	L	H	H
16	ADC	m	72	1	T2a	N1	PL0	1	2	3	38x33x22	pušač	NI	L	L	L	SCC	ž	71	2	T2a	N1	PL1	1	2	1	35x20x20	pušač	NI	L	L	L
17	ADC	ž	59	1	T2	N1	PL1	1	2	2	50x40x35	bez podataka	NI	L	H	H	SCC	ž	50	2	T2a	N2	PL1	2	1	2	60x50x50	pušač	LOH	H	H	L
18	ADC	m	54	1	T4	N1	PL3	1	2	2	55x50x40	pušač	NI	L	L	L	SCC	m	50	2	T2a	N1	PL0	1	2	1	32x20x15	bez podataka	NI	L	L	L
19	ADC	m	70	1	T2a	N1	PL0	1	3	2	50x40x30	bez podataka	NI	L	L	L	ADC	m	55	1	T2a	N2	PL1	1	2	1	40x35x30	pušač	NI	H	H	L
20	SCC	ž	65	2	T2	N0	PL1	3	2	2	52x50x45	pušač	NI	L	L	L	SCC	m	49	2	T2a	N2	PL0	1	3	1	40x40x30	bez podataka	LOH	L	L	L
21	SCC	ž	43	1	T2b	N1	PL0	1	2	2	60x40x40	bivši pušač	LOH	L	H	L	SCC	m	68	3	T3	N2	PL3	3	3	1	160x120x100	bez podataka	LOH	H	H	H
22	ADC	m	56	3	T4	N2	PL1	1	2	2	35x35x32	pušač	NI	L	H	H	SCC	m	57	2	T3	N0	PL0	3	2	1	80x70x60	bez podataka	LOH	H	H	H
23	ADC	m	53	1	T3	N1	PL0	2	2	1	90x65x60	bivši pušač	I	L	L	L	ADC	m	71	2	T2b	N2	PL0	1	2	1	60x55x50	bez podataka	NI	H	H	L
24	SCC	m	59	1	T3	N2	PL0	1	3	1	35x30x20	pušač	LOH	L	L	L	SCC	m	48	2	T2b	N1	PL1	1	3	1	60x55x50	bez podataka	LOH	H	L	L
25	ADC	m	66	2	T3	N2	PL3	1	3	1	55x50x50	pušač	?	H	H	L	SCC	m	56	3	T3	N1	PL0	3	1	2	110x100x90	bez podataka	NI	L	H	H
26	SCC	m	48	2	T3	N1	PL3	1	3	1	80x80x70	pušač	LOH	L	L	H	SCC	m	53	3	T3	N2	PL3	3	2	2	60x40x35	bez podataka	LOH	L	L	H
27	SCC	m	67	2	T2	N2	PL1	2	3	3	65x65x55	nepušač	NI	L	H	H	SCC	m	51	2	T3	N1	PL2	1	2	2	90x80x60	pušač	LOH	H	L	H
28	ADC	m	63	3	T2b	N2	PL0	1	3	3	65x40x40	bivši pušač	I	L	L	L	SCC	m	44	2	T3	N0	PL1	2	2	2	80x60x60	bez podataka	NI	L	L	H
29	SCC	m	74	2	T2b	N0	PL0	2	1	1	70x40x40	pušač	NI	L	H	L	ADC	ž	53	2	T3	N1	PL0	1	2	2	80x75x60	pušač	NI	L	H	L
30	SCC	m	47	2	T2	N1	PL2	1	3	2	50x40x30	pušač	LOH	L	H	L	ADC	ž	71	2	T2a	N0	PL0	1	2	2	50x40x30	pušač	LOH	L	H	L
31	ADC	m	63	3	T1b	N1	PL0	3	1	1	30x20x20	pušač	NI	L	L	L	ADC	ž	56	2	T2b	N1	PL1	1	2	2	65x60x45	pušač	NI	H	L	L
32	ADC	ž	68	2	T3	N2	PL1	1	2	2	75x70x45	pušač	LOH	L	L	L	ADC	ž	60	2	T3	N2	PL1	1	2	1	75x75x55	bez podataka	LOH	L	L	L
33	SCC	ž	50	2	T4	N2	PL3	1	3	1	40x40x30	pušač	NI	L	L	L	ADC	ž	54	2	T2a	N2	PL1	1	2	1	50x30x15	pušač	LOH	H	H	L
34	SCC	m	67	2	T2	N1	PL1	1	3	2	do 30	pušač	I	L	L	L	ADC	m	68	2	T3	N2	PL3	2	2	2	100x100x90	pušač	NI	L	H	H
35	SCC	m	42	2	T3	N2	PL3	1	1	3	90x90x70	pušač	?	L	L	L	ADC	ž	49	1	T2a	N0	PL1	1	2	2	40x35x25	pušač	LOH	L	L	L

*Skratnice:* ADC – adenokarcinom; SCC – skvamocelularni karcinom; H.tip – histološki tip karcinoma; m – muški pol; ž – ženski pol; g – histološki gradus; T – proširenost tumora; PL – zahvatanje pleure; N – zahvaćenost limfnih čvorova tumorom („nodalni status“); n – stepen nekroze; d – stepen dezomplastične reakcije; z – stepen zapaljenske reakcije; LOH- prisustvo gubitka heterozigota LOH PTEN gena; ? NI- neinformativno; I – informativno; DNK nije izolovana; L – „low“ skor; H – „high“ skor.

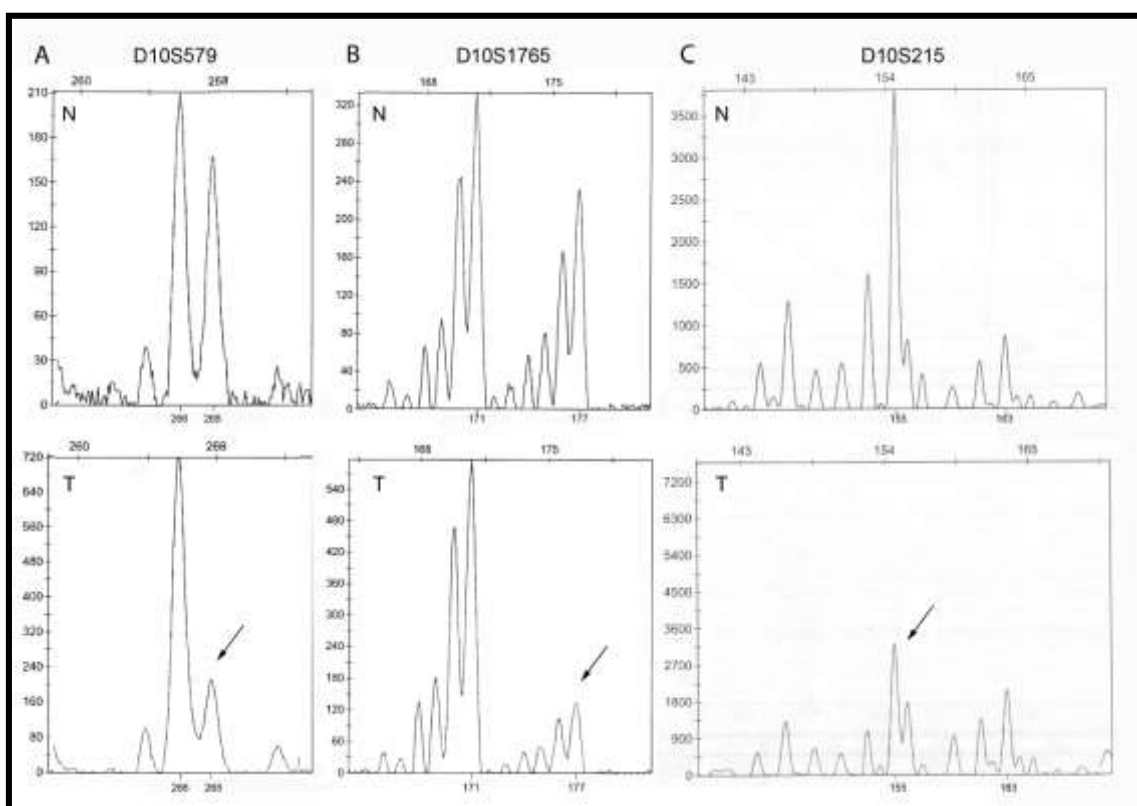
**Tabela 12. – Patohistološke karakteristike tumorozora i ekspresija transportnih pumpi**

Br.	Sa neoadjuvantnom hemoterapijom										Bez neoadjuvantne hemoterapije																			
	H. tip	Pol	Starost	T	N	PL	n	d	z	Veličina/mm	Pušački status	P. gp	MRP1	BCRP	H. tip	Pol	Starost	g	T	N	PL	n	d	z	Veličina/mm	Pušački status	P. gp	MRP1	BCRP	
1	SCC	m	56	1	T2a	N0	PL0	1	2	2	45x35x25		pušač	L	L	ADC	m	58	g1	T2b	N0	PL0	2	2	2	50x50x45	pušač	H	H	H
2	SCC	m	52	3	T1b	N0	PL0	1	2	2	do 30		pušač	H	H	SCC	m	51	g2	T2b	N2	PL0	1	2	2	60x50x40	bez podataka	L	H	L
3	ADC	z	63	2	T2a	N0	PL0	1	2	2	32x30x30		pušač	L	H	SCC	ž	66	g2	T2b	N0	PL0	1	2	2	60x50x35	pušač	H	H	H
4	ADC	m	36	3	T3	N0	PL3	1	2	2	105x75x65		pušač	H	H	SCC	m	56	g1	T1b	N1	PL0	1	2	3	20 do 30	bez podataka	H	H	L
5	ADC	m	57	2	T4	N2	PL3	2	2	2	65x60x55		pušač	H	H	SCC	m	48	g2	T3	N2	PL2	1	2	1	50x30x15	bez podataka	H	H	L
6	SCC	m	56	3	T2	N0	PL1	1	3	2	65x50x35		pušač	H	L	SCC	m	48	g1	T3	N1	PL1	1	2	2	50x45x40	bez podataka	L	H	L
7	ADC	z	61	3	T2	N0	PL1	1	2	3	60x40x30		bivši pušač	H	H	ADC	m	59	g2	T2b	N1	PL0	1	3	2	70x60x60	pušač	H	H	L
8	ADC	m	62	1	T2	N1	PL1	1	3	2	40x40x35		pušač	H	L	SCC	m	50	g2	T3	N2	PL1	1	1	1	50x50x40	pušač	H	H	H
9	SCC	m	59	3	T3	N2	PL1	3	1	1	112x95x73		pušač	L	H	SCC	m	71	g2	T3	N1	PL3	1	3	3	90x60x50	pušač	H	L	L
10	ADC	m	58	1	T3	Nx	PL3	1	1	1	80x70x50		pušač	L	H	SCC	m	67	g3	T2b	N1	PL1	1	2	1	60x60x40	pušač	H	H	L
11	SCC	m	52	3	T3	N1	PL3	2	2	2	40x30x30		bivši	L	L	ADC	ž	48	g1	T3	N3	PL1	1	2	1	70x60x60	bez podataka	L	H	L
12	SCC	m	59	2	T4	N2	PL3	1	2	2	50x50x40		pušač	H	H	ADC	m	53	g2	T2a	N1	PL2	2	2	1	40x35x20	bez podataka	H	H	H
13	SCC	z	58	3	T2b	N1	PL0	1	3	2	60x50x40		pušač	L	H	ADC	ž	51	g3	T2a	N2	PL1	1	1	2	40x35x30	bez podataka	H	H	H
14	SCC	m	56	2	T2	N1	PL1	1	2	3	65x50x45		pušač	H	L	ADC	ž	52	g2	T2a	N1	PL2	2	2	1	30x30x20	bez podataka	H	H	L
15	SCC	z	54	2	T2	N0	PL1	1	2	2	30x25x22		bez podataka	H	H	SCC	m	44	g2	T3	N2	PL3	1	2	3	65x60x40	pušač	H	H	H
16	ADC	m	72	1	T2a	N1	PL0	1	2	3	38x33x22		pušač	L	L	SCC	ž	71	g2	T2a	N1	PL1	1	1	2	35x20x20	pušač	L	H	H
17	ADC	z	59	1	T2	N1	PL1	1	2	2	50x40x35		bez podataka	H	H	SCC	ž	50	g2	T2a	N2	PL1	2	1	2	60x50x50	pušač	H	H	H
18	ADC	m	54	1	T4	N1	PL3	1	2	2	55x50x40		pušač	H	H	SCC	m	50	g2	T2a	N1	PL0	1	2	1	32x20x15	bez podataka	L	H	H
19	ADC	m	70	1	T2a	N1	PL0	1	3	2	50x40x30		bez podataka	H	H	ADC	m	55	g1	T2a	N2	PL1	1	2	1	40x35x30	pušač	L	H	H
20	SCC	z	65	2	T2	N0	PL1	3	2	2	52x50x45		pušač	L	L	SCC	m	49	g2	T2a	N2	PL0	1	3	1	40x40x30	bez podataka	H	H	L
21	SCC	z	43	1	T2b	N1	PL0	1	2	2	60x40x40		bivši pušač	H	H	SCC	m	68	g3	T3	N2	PL3	3	3	1	160x120x100	bez podataka	H	H	L
22	ADC	m	56	3	T4	N2	PL1	1	2	2	35x35x32		pušač	L	L	SCC	m	57	g2	T3	N0	PL0	3	2	1	80x70x60	bez podataka	H	H	H
23	ADC	m	53	1	T3	N1	PL0	2	2	1	90x65x60		bivši pušač	H	L	ADC	m	71	g2	T2b	N2	PL0	1	2	1	60x55x50	bez podataka	L	H	L
24	SCC	m	59	1	T3	N2	PL0	1	3	1	35x30x20		pušač	H	H	SCC	m	48	g2	T2b	N1	PL1	1	3	1	60x55x50	bez podataka	L	H	L
25	ADC	m	66	2	T3	N2	PL3	1	3	1	55x50x50		pušač	H	H	SCC	m	56	g3	T3	N1	PL0	3	1	2	110x100x90	bez podataka	H	H	L
26	SCC	m	48	2	T3	N1	PL3	1	3	1	80x80x70		pušač	L	L	SCC	m	53	g2	T3	N2	PL3	3	2	2	60x40x35	bez podataka	H	H	L
27	SCC	m	67	2	T2	N2	PL1	2	3	3	65x65x55		nepušač	L	H	SCC	m	51	g2	T3	N1	PL2	1	2	2	90x80x60	pušač	H	L	L
28	ADC	m	63	3	T2b	N2	PL0	1	3	3	65x40x40		bivši pušač	H	H	SCC	m	44	g2	T3	N0	PL1	2	2	2	80x60x60	bez podataka	L	H	H
29	SCC	m	74	2	T2b	N0	PL0	2	1	1	70x40x40		pušač	H	H	ADC	ž	53	g2	T3	N1	PL0	1	2	2	80x75x60	pušač	L	H	H
30	SCC	m	47	2	T2	N1	PL2	1	3	2	50x40x30		pušač	L	L	ADC	ž	71	g2	T2a	N0	PL0	1	2	2	50x40x30	pušač	H	H	H
31	ADC	m	63	3	T1b	N1	PL0	3	1	1	30x20x20		pušač	H	H	ADC	ž	56	g2	T2b	N1	PL1	1	2	2	65x60x45	pušač	H	H	L
32	ADC	z	68	2	T3	N2	PL1	1	2	2	75x70x45		pušač	H	H	ADC	ž	60	g2	T3	N2	PL1	1	2	1	75x75x55	bivši pušač	H	H	H
33	SCC	z	50	2	T4	N2	PL3	1	3	1	40x40x30		pušač	H	L	ADC	ž	54	g2	T2a	N2	PL1	1	2	1	50x30x15	pušač	H	H	H
34	SCC	m	67	2	T2	N1	PL1	1	3	2	manji od 30		pušač	H	H	ADC	m	68	g2	T3	N2	PL3	2	2	2	100x100x90	pušač	H	H	H
35	SCC	m	42	2	T3	N2	PL3	1	1	3	90x90x70		pušač	H	H	ADC	ž	49	g1	T2a	N0	PL1	1	2	2	40x35x25	pušač	H	H	H

*Skraćivanje:* ADC – adenokarcinom; SCC – skvamocelularni karcinom; H.tip – histološki tip karcinoma; m – muški pol; ž – ženski pol; g – histološki gradus; T – proširenost tumora; N – zahvaćenost limfnih čvorova tumorom („nodalni status“); PL – zahvaćanje pleure; n – stepen nekroze; d – stepen dezmoplastične reakcije; z – stepen zapaljenske reakcije; L – „low“ skor; H – „high“ skor.

#### 4.2. LOH analiza *PTEN* tumor supresor gena

Gubitak heterozigotnosti *PTEN* gena je utvrđena fragmentnom analizom (Slika 9). U grupi pacijenata koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju 19 je bilo neinformativno za svih pet testiranih markera. Ostalih 16 informativnih slučajeva je pokazalo gubitak jednog alela (45,7%, Tabela 13). U grupi pacijenata koji su dobili neoadjuvantnu hemoterapiju analizirano je 32 uzorka i 16 je bilo neinformativno za *PTEN* markere. Od 16 informativnih slučajeva, koji su bili heterozigoti za barem jedan ispitivani lokus, 13 je pokazalo gubitak alela (40,6%, Tabela 13).



Slika 9. Analiza gubitka heterozigotnosti (LOH) *PTEN* gena. A) LOH *PTEN*-a uočen analizom D10S579 mikrosatelitskog markera u uzorku obeleženom brojem 9 dobijenom od pacijenta koji je dobio NAHT, B) LOH *PTEN*-a uočen analizom D10S1765 mikrosatelitskog markera u uzorku obeleženom brojem 33 dobijenom od pacijenta koji nije dobio NAHT, C) LOH *PTEN*-a uočen analizom D10S215 mikrosatelitskog markera u uzorku obeleženom brojem dobijenom od pacijenta koji je dobio NAHT. Strelice pokazuju gubitak alela u tumorskim uzorcima.

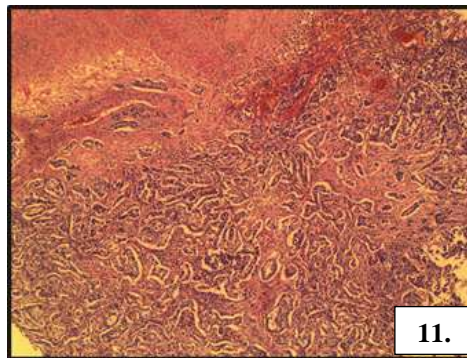
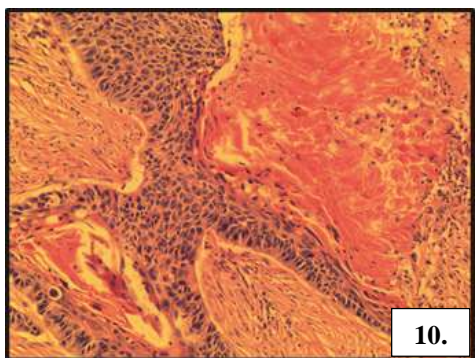
### 4.3. Ekspresija PTEN, pAkt i pERK proteina

Prema primenjenom imunohistohemijskom skoru imunohistoheksijska studija na tumorskim uzorcima pacijenata koji nisu dobili neoadjuvantnu terapiju je pokazala visok nivo ekspresije PTEN proteina kod 13 (37,1%) pacijenata, pAkt kod 18 (51,4%) pacijenata i pERK kod 11 (31,4%) pacijenata od njih 35 sa dijagnostikovanim nemikrocelularnim karcinomom pluća (Tabela 13). Dobijeni rezultati u grupi pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju su bili slični, sa visokom pAkt ekspresijom kod 19 (54,3%) pacijenata i pERK kod 9 (25,7%) od 35 pacijenata, dok je ekspresija PTEN proteina bila neznatno različita: visoka kod 7 (20%) od 35 pacijenata (Tabela 13).

**Tabela 13. Genske promene i imunofenotip u tumorskim uzorcima pacijenata obolelih od nemikrocelularnog karcinoma pluća**

Pacijenti	LOH <i>PTEN-a</i>	Visoka PTEN ekspresija	Visoka pAkt ekspresija	Visoka pERK ekspresija
Sa hemoterapijom	13/32 (40,6%)	7/35 (20%)	19/35 (54,3%)	9/35 (25,7%)
Bez hemoterapije	16/35 (45,7%)	13/35 (37,1%)	18/35 (51,4%)	11/35 (25,7%)

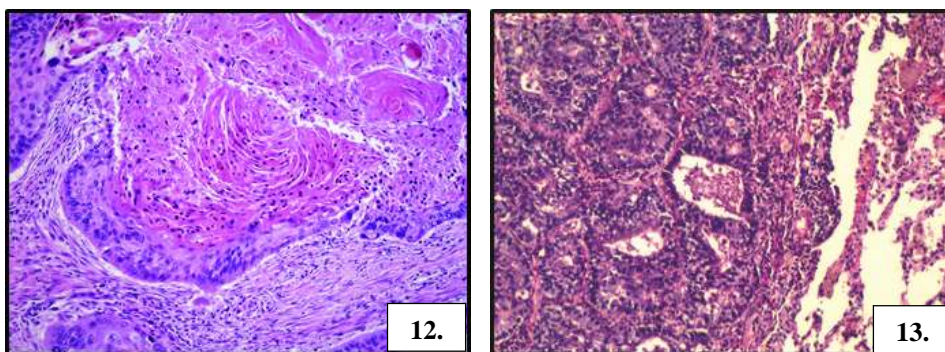
Morfološka slika skvamocelularnog i adenokarcinoma pluća kod obe grupe pacijenata je prikazana na slikama 10–13. Kod oba histološka tipa karcinoma pluća je utvrđen povećan stepen nekoze kod pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju. Reprezentativni primeri imunohistohemijskih bojenja PTEN-a, pAkt-a i pERK-a kod skvamocelularnog ili adenokarcinoma su prikazani na slikama 14–16, a njihove pozitivne kontrole su prikazane na slici 17.



Slika 10. Delimično nekrotisali skvamocelularni karcinom pluća kod pacijenta koji je primio neoadjuvantnu hemoterapiju, H&Ex40.

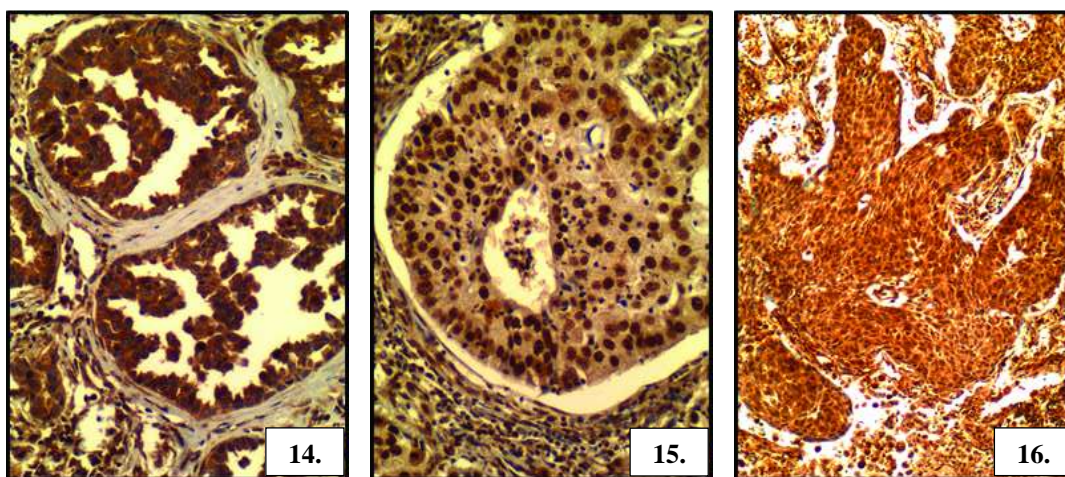


Slika 11. Delimično nekrotisali adenokarcinom pluća kod pacijenta koji je primio neoadjuvantnu hemoterapiju, H&Ex10.



Slika 12. Dobro diferentovan skvamocelularni karcinom pluća sa orožavanjem kod pacijenta koji nije primio neoadjuvantnu hemoterapiju, H&Ex10;

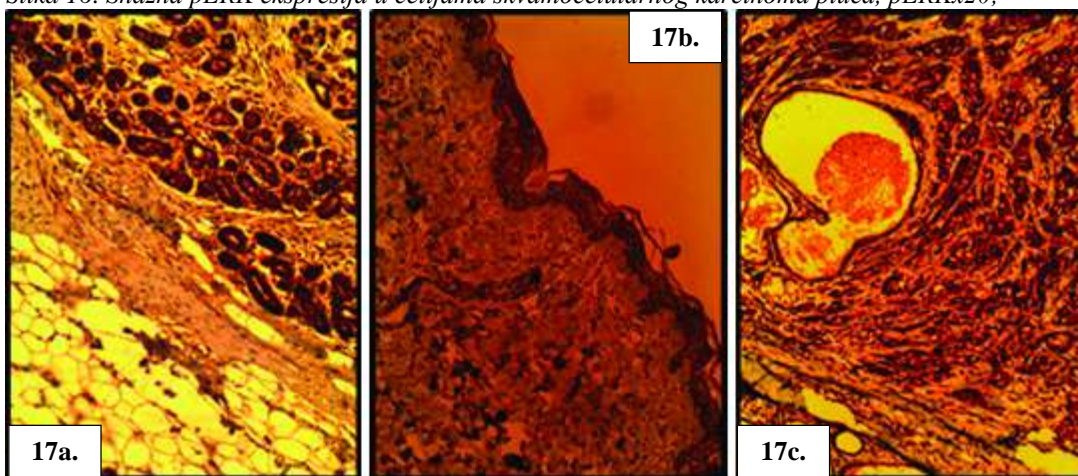
Slika 13. Umereno diferentovan adenokarcinom pluća kod pacijenta koji nije primio neoadjuvantnu hemoterapiju, H&Ex10;



Slika 14. Snažna PTEN ekspresija u ćelijama adenokarcinoma pluća, PTENx20;

Slika 15. Snažna pAkt ekspresija u ćelijama skvamocelularnog karcinoma pluća, pAktx20;

Slika 16. Snažna pERK ekspresija u ćelijama skvamocelularnog karcinoma pluća, pERKx20;



Slika 17. Pozitivna kontrola: a) PTEN ekspresija u citoplazmi dukalnog epitela dojke, PTENx4; b) pAkt ekspresija u jedrima ćelija epiderma, pAktx10; c) pERK ekspresija u citoplazmi dukalnog epitela dojke, pERKx10.

#### ***4.4. Korelacija LOH PTEN gena, pAkt, pERK i PTEN ekspresije sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata***

Korelacija LOH *PTEN* gena, pAkt, pERK, PTEN ekspresije i kliničkopatoloških parametara je ispitivana u odnosu na dve grupe pacijenata, onih koji jesu i onih koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju. Uzorci su bili grupisani prema sledećim kliničkopatološkim parametrima: histološkom tipu, histološkom gradusu, stadijumu tumora, invaziji u limfne noduse, stepenu nekroze tumora i reaktivnoj inflamatornoj reakciji. Broj pacijenata bez invazije karcinoma u limfne noduse koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju i imali nisku pAkt ekspresiju je bio značajno viši od broja onih pacijenata koji su imali visoku ekspresiju ovog proteina (Tabela 14, P = 0,01).



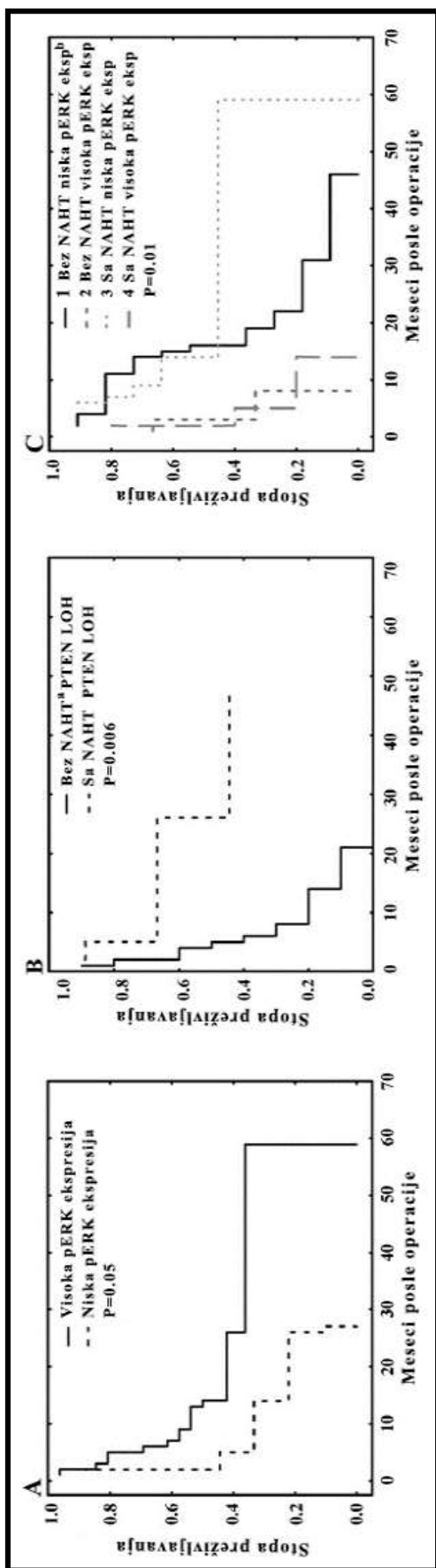
**Tabela 14. pAkt ekspresija kod pacijenata bez invazije karcinoma u limfne noduse**

Varijable	pAkt ekspresija		<i>P</i>
	Niska BP <sup>a</sup> (%)	Visoka BP(%)	
Neoadjuvantna hemoterapija			
Bez	1 (16,7)	5 (83,3)	<b>0,01<sup>c</sup></b>
Sa	8 (88,9)	1 (11,1)	

<sup>a</sup>BP, broj pacijenata<sup>c</sup>Podebljani broj pokazuje statistički značajnu vrednost,  $P \leq 0.05$ 

#### **4.5. LOH PTEN gena, pAKT, pERK i PTEN ekspresija i preživljavanje pacijenata**

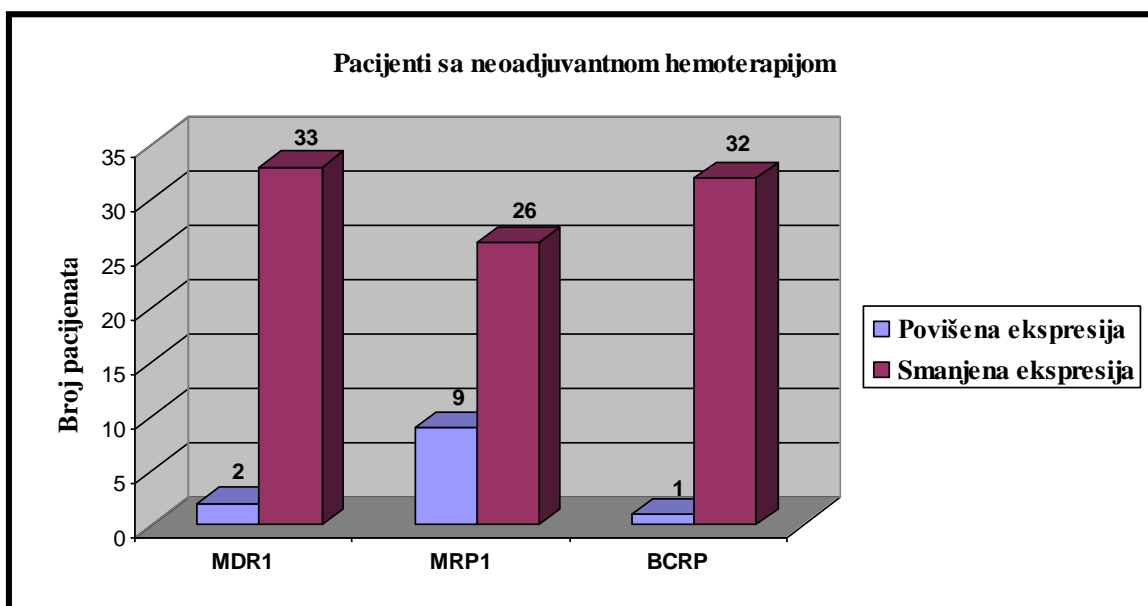
Ukupno preživljavanje pacijenata sa ili bez neoadjuvantne hemoterapije procenjivano je u odnosu na LOH *PTEN* gena, pAkt, pERK i PTEN ekspresiju u uzorcima nemikrocelularnog karcinoma pluća (Slika 18). pERK ekspresija se pokazala značajnom za preživljavanje pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju. Naime, pacijenti iz ove grupe koji su imali nisku ekspresiju ovog proteina živeli su značajno duže (Slika 18A,  $P = 0,05$ ). Zatim, su svi pacijenti grupisani prema histološkom tipu karcinoma. Kod pacijenata koji su oboleli od skvamocelularnog karcinoma i imali LOH *PTEN* gena, neoadjuvantna hemoterapija je imala pozitivan efekat, tačnije pacijenti koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju su živeli značajno duže (Slika 18B,  $P = 0,006$ ). Pacijenti sa adenokarcinomom pluća, niskom pERK ekspresijom i neoadjuvantnom hemoterapijom živeli su najduže, zatim pacijenti koji su imali nisku pERK ekspresiju i nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju, a zatim pacijenti sa visokom pERK ekspresijom i koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju i na kraju pacijenti sa visokom pERK ekspresijom i bez primljene neoadjuvantne hemoterapije (Slika 18C,  $P = 0,01$ ).



Slika 18. Kaplan-Meier krive koje prikazuju preživljavanje pacijenata u zavisnosti od različitih parametara. Pacijenti koji su dobili NAHT i imali nisku pERK ekspresiju živeli su značajno duže (A,  $P = 0,05$ ). Pacijenti sa skvamocelularnim karcinomom, LOH-om PTEN-a, a koji su dobili NAHT živeli su značajno duže u odnosu na one bez NAHT (B,  $P = 0,006$ ). Pacijenti koji su imali adenokarcinom, nisku pERK ekspresiju i primili NAHT živeli su najduže, zatim pacijenti koji su imali nisku pERK ekspresiju i nisu dobili NAHT, zatim pacijenti sa visokom pERK ekspresijom i NAHT-om i na kraju pacijenti sa visokom pERK ekspresijom i bez terapije (C,  $P = 0,01$ ). Razlika između preživljavanja analiziranih grupa smatrana je značajnom ako je  $P \leq 0,05$ . <sup>a</sup>NAHT-neoadjuvantna hemoterapija <sup>b</sup> eksp - ekspresija

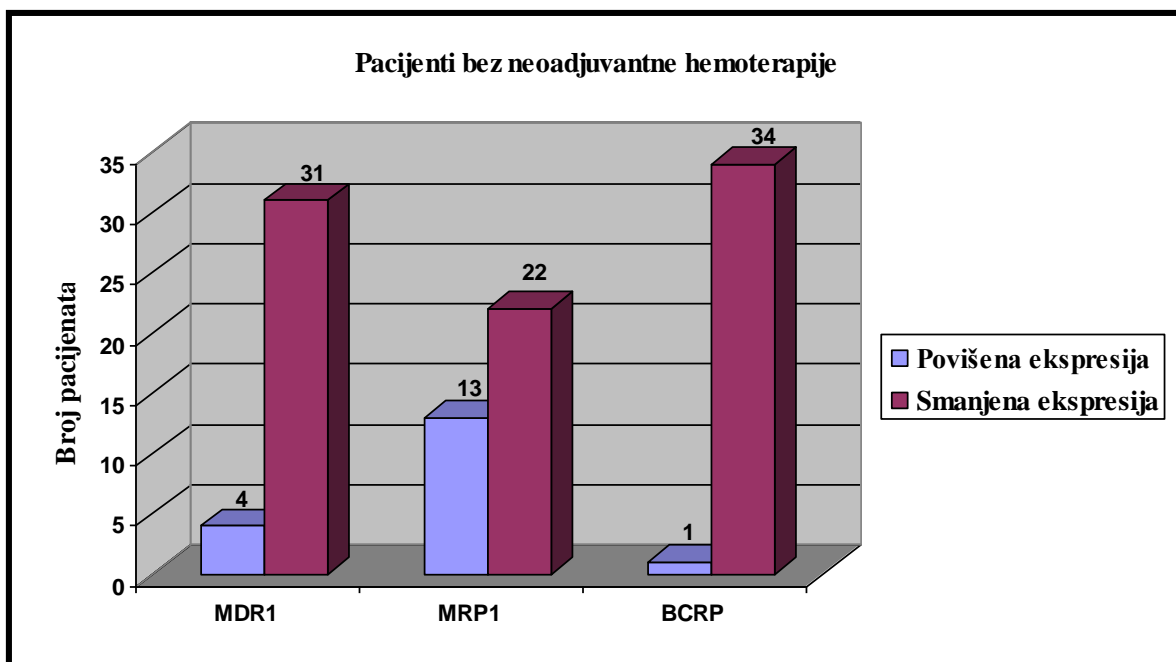
#### 4.6. Ekspresija *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* na nivou informacione RNK (iRNK)

Genska ekspresija *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* ispitivana je u obe grupe pacijenata lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu. U grupi pacijenata koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju povišena ekspresija *BCRP* gena uočena je kod samo jednog pacijenta (1/32, 3.125%), povišena ekspresija *MDR1* gena kod 2 pacijenta (2/35, 5,71%) i a povišena ekspresija *MRP1* gena kod 9 pacijenata (9/35, 25,71%) (Slika 19).



Slika 19. Ekspresija *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* gena kod pacijenata koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju.

Povišena ekspresija *BCRP* gena uočena je kod samo jednog pacijenta koji nije dobio neoadjuvantnu hemoterapiju (1/35, 2.86%), povišena ekspresija *MDR1* gena kod 4 pacijenta (4/35, 11,4%) i a povišena ekspresija *MRP1* gena kod 13 pacijenata (13/35, 37,14%) (Slika 19).



Slika 20. Ekspresija MDR1, MRP1 i BCRP gena kod pacijenata koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju.

#### 4.7. Ekspresija P-gp, MRP1 i BCRP proteina

Prema primenjenom imunohistochemijskom skor u imunohistochemijskoj studiji na tumorskim uzorcima pacijenata koji su dobili neoadjuvantnu terapiju je pokazala ujednačen nivo ekspresije sve tri transportne pumpe P-gp, MRP1 i BCRP: 20/35 pacijenata (57,1%) je imalo P-gp visoku ekspresiju, 20/35 pacijenata MRP1 visoku ekspresiju i 24/35 pacijenata BCRP visoku ekspresiju (Tabela 15). Dobijeni rezultati u grupi pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju su bili slični kada je u pitanju P-gp i BCRP ekspresija: 21/35 (60%) pacijenata je imalo visoku P-gp ekspresiju, a 18/35 (51,4%) pacijenata visoku BCRP ekspresiju (Tabela 15). Ekspresija MRP1 transportne pumpe je bila izrazito veća u odnosu na ekspresiju ostale dve, naime kod 32/35 (91,4%) pacijenata je MRP1 bila visoko eksprimirana (Tabela 15).

Kada se upoređuje ekspresija transportnih pumpi između dve ispitivane grupe pacijenata uočava se da pacijenti koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju imaju značajno veću MRP1 ekspresiju u odnosu na pacijente koji su ovu terapiju primali (Tabela 16,  $P = 0,03$ ).

**Tabela 15. Ekspresija transportnih pumpi u tumorskim uzorcima pacijenata obolelih od nemikrocelularnog karcinoma pluća**

Pacijenti	Visoka P-gp ekspresija	Visoka MRP1 ekspresija	Visoka BCRP ekspresija
Sa hemoterapijom	20/35 (57,1%)	20/35 (57,1%)	24/35 (68,6%)
Bez hemoterapije	21/35 (60%)	32/35 (91,4%)	18/35 (51,4%)

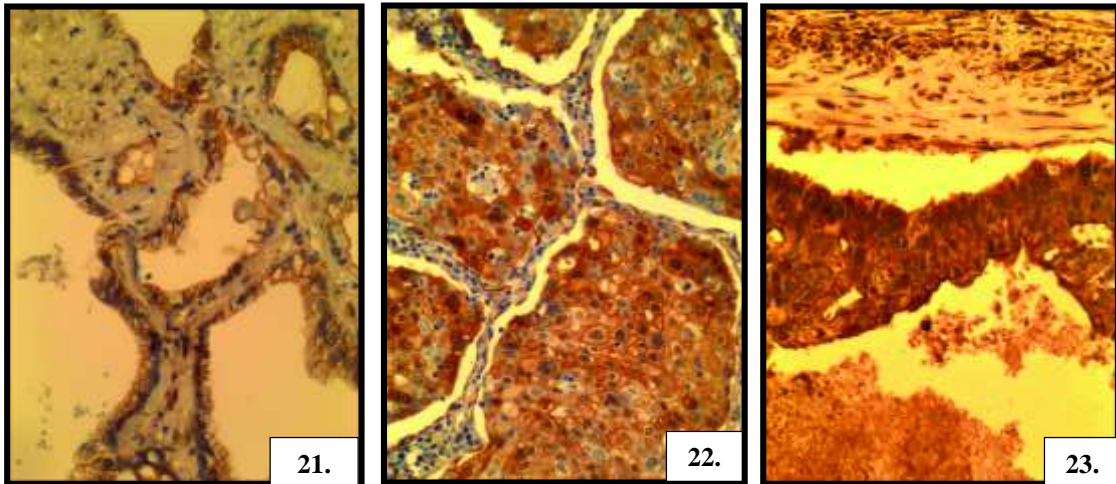
**Tabela 16. MRP1 ekspresija kod pacijenata sa i bez neoadjuvantne hemoterapije**

Varijable	MRP1 ekspresija		<i>P</i>
	Niska BP <sup>a</sup> (%)	Visoka BP(%)	
Neoadjuvantna hemoterapija			
Bez	3 (8,6)	32 (91,4)	<b>0,03<sup>c</sup></b>
Sa	11 (31,4)	24 (68,6)	

<sup>a</sup>BP, broj pacijenata

<sup>c</sup>Podebljani broj pokazuje statistički značajnu vrednost,  $P \leq 0.05$

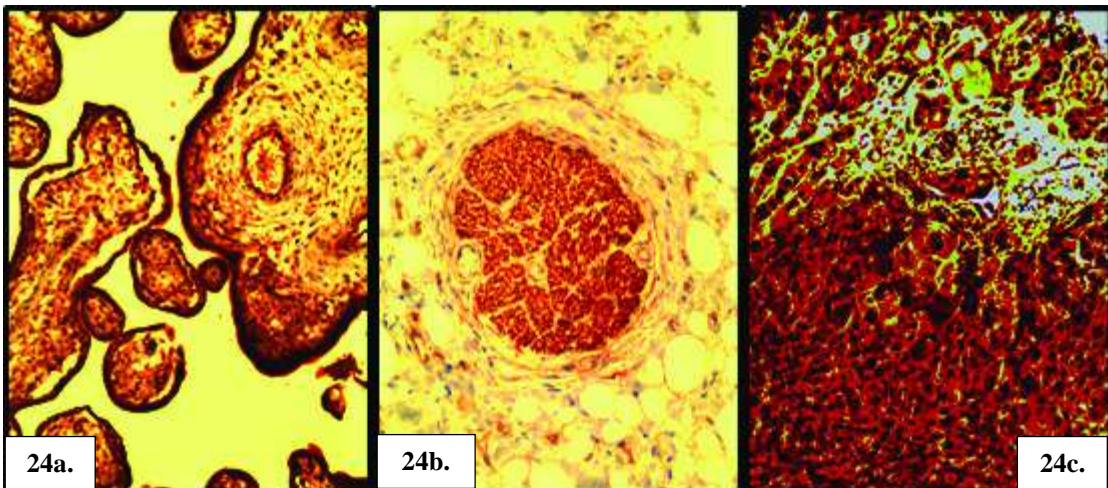
Reprezentativni primeri P-gp, MRP i BCRP ekspresije imunohistochemijskim metodama bojenja su prikazani na slikama 21.–23., a njihove “pozitivne kontrole” su prikazane na Slici 24.



Slika 21. P-gp ekspresija je prisutna na površini ćelijske membrane adenokarcinoma pluća, P-gpx20

Slika 22. Prisutna je heterogena MRP1 ekspresija od negativne i slabo pozitivne do snažne u ćelijama skvamocelularnog karcinoma pluća. Uočavaju se linearna ekspresija na površini ćelijske membrane i difuzna u citoplazmi malignih ćelija, MRP1x20;

Slika 23. BCRP ekspresija na površini ćelijske membrane skvamocelularnog karcinoma pluća kod pacijenta koji je primao neoadjuvantnu hemoterapiju, BCRPx20;



Slika 24. "Pozitivna kontrola": a) BCRP ekspresija u citoplazmi trofoblastima placente, BCRPx10; b) Pg-p ekspresija u citoplazmi ćelijama perifernog nerva, Pg-px20; c) MRP1 ekspresija u citoplazmi hepatocita, MRP1x20.

#### **4.8. Korelacija P-gp, MRP1 i BCRP ekspresije sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata**

Korelacija P-gp, MRP1 i BCRP ekspresije i kliničkopatoloških parametara je ispitivana grupisanjem pacijenata iz obe ispitivane grupe prema različitim kliničkopatološkim parametrima. Uzorci su bili grupisani prema sledećim kliničkopatološkim parametrima: histološkom tipu, histološkom gradusu, stadijumu tumora, invaziji u limfne noduse, stepenu nekroze tumora i reaktivnoj inflamatornoj reakciji. Značajno više pacijenata koji

su u I ili II stadijumu maligne bolesti i nisu dobili neoadjuvantnu hemioterapiju imalo je visoku ekspresiju MRP1 (Tabela 17, P = 0,03). Pored toga, značajno veći broj pacijenata bez invazije u limfne čvorove i bez neoadjuvantne terapije imao je visoku ekspresiju BCRP proteina (Tabela 18, P = 0,03).

**Tabela 17. MRP1 ekspresija kod pacijenata sa I i II stadijumom maligne bolesti**

Varijable	Ekspresija MRP1		<i>P</i>
	Niska BP <sup>a</sup> (%)	Visoka BP(%)	
Neoadjuvantna hemoterapija			
Bez	0 (0)	13 (100)	<b>0,03<sup>c</sup></b>
Sa	7 (35)	13 (65)	

<sup>a</sup>BP, broj pacijenata

<sup>c</sup>Podebljani broj pokazuje statistički značajnu vrednost, P≤0.05

**Tabela 18. BCRP ekspresija kod pacijenata bez invazije karcinoma u limfne čvorove**

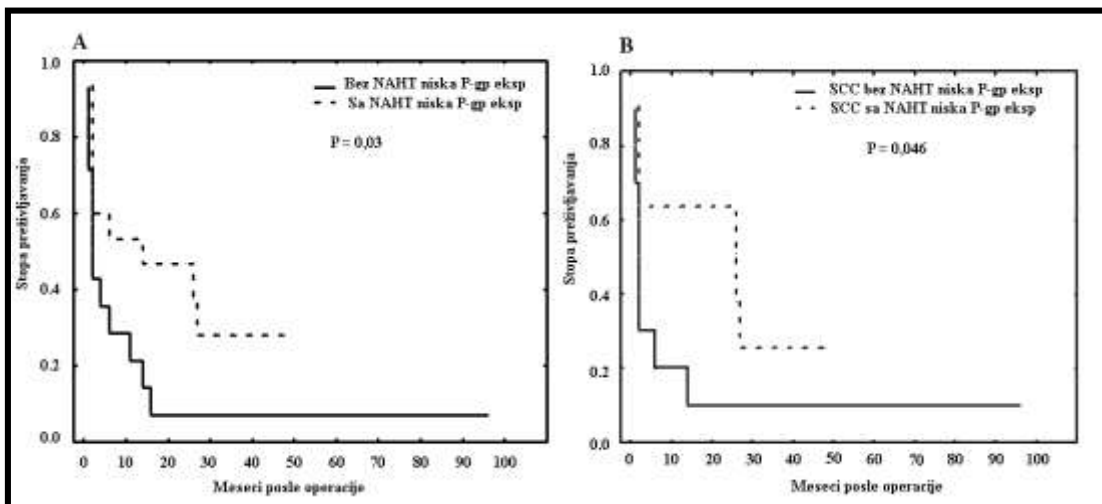
Varijable	Ekspresija BCRP		<i>P</i>
	Niska BP <sup>a</sup> (%)	Visoka BP(%)	
Neoadjuvantna hemoterapija			
Bez	0 (0)	6 (100)	<b>0,03<sup>c</sup></b>
Sa	6 (60)	4 (40)	

<sup>a</sup>BP, broj pacijenata

<sup>c</sup>Podebljani broj pokazuje statistički značajnu vrednost, P≤0.05

#### 4.9. P-gp, MRP1 i BCRP ekspresija i preživljavanje pacijenata

Ukupno preživljavanje pacijenata sa ili bez neoadjuvantne hemoterapije procenjavano je u odnosu na P-gp, MRP1 i BCRP ekspresiju u uzorcima nemikrocelularnog karcinoma pluća (Slika 25). Značajnom za preživljavanje pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju pokazala se P-gp ekspresija. Naime, pacijenti iz ove grupe koji su imali nisku ekspresiju ovog proteina živeli su značajno duže u odnosu na pacijente koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju i imali nisku P-gp ekspresiju (Slika 25A,  $P = 0,03$ ). Zatim, su svi pacijenti grupisani prema histološkom tipu karcinoma. Pacijenti koji su oboleli od skvamocelularnog karcinoma, sa niskom P-gp ekspresijom i bez neoadjuvantne hemoterapije živeli su značajno duže od pacijenata sa istim karakteristikama, a koji su ovu terapiju primili (Slika 25B,  $P = 0,046$ ).



Slika 25. Kaplan-Meier krive koje prikazuju preživljavanje pacijenata u zavisnosti od različitih parametara. Pacijenti koji nisu primali NAHT i sa niskom P-gp ekspresijom živeli su značajno duže od pacijenata sa niskom P-gp ekspresijom, ali koji su istu terapiju primili (A,  $P = 0,03$ ). Pacijenti sa skvamocelularnim karcinomom, niskom P-gp ekspresijom i koji nisu primali NAHT živeli su značajno duže od pacijenata sa istim karakteristikama a koji su tu terapiju primili (B,  $P = 0,046$ ). Razlika između preživljavanja analiziranih grupa smatrana je značajnom ako je  $P \leq 0,05$ . NAHT – neoadjuvantna hemoterapija, eksp – ekspresija, SCC – skvamocelularni karcinom.



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Opšti pregled istraživanja

Karcinom pluća je najčešće dijagnostikovano malignitet kod muškaraca i vodeći je uzrok smrti od maligniteta kod oba pola širom sveta, ali i u Srbiji. U cilju produženja preživljavanja i poboljšanja kvaliteta života tokom i posle hemoterapije postignut je veliki napredak u ispitivanju nastanka karcinoma pluća i razvika rezistencije na primenjenu terapiju. Razlog brojnih istraživanja je razvoj i primena ciljane, personalizovane terapije karcinoma pluća. Osim patohistoloških karakteristika nemikrocelularnog karcinoma pluća potrebno je u svakom pojedinačnom slučaju ispitati mogućnost ekspresije pojedinih molekula koji dovode do ubrzane proliferacije, smanjene diferencijacije, migracije i gubitka sposobnosti kontrolisane smrti maligno izmenjene ćelije. Mogućnost razvoja ciljane terapije nemikrocelularnih karcinoma pluća je moguća ukoliko se na primer utvrdi prekomerna ekspresija gena koji regulišu sintezu proteina odgovornih za disregulaciju ćelijskog ciklusa ili ukoliko se utvrdi da je došlo do gubitka heterozigotnosti tumor supresor gena odgovornih za proliferaciju ćelija.

Postignut je veliki napredak u istraživanju PI3K/Akt/mTOR i RAS/RAF/MEK/ERK signalnih puteva i razrešavanju njihove uloge u nastanku nemikrocelularnih karcinoma pluća, u poslednjih nekoliko godina. Sprovedena su brojna istraživanja i objavljeni radovi koji se bave analizom ekspresije PTEN-a, pAkt-a i ERK-a i prisustvom LOH *PTEN* gena, ključnih molekula u ovim signalnim putevima u nemikrocelularnim karcinomima pluća. Cilj ovog istraživanja je bio da utvrdi da li ključni molekuli PI3K/Akt/mTOR i RAS/RAF/MEK/ERK signalnih puteva mogu imati prediktivni i prognostički značaj kod lečenja neoadjuvantnom hemoterapijom nemikrocelularnih karcinoma pluća. Zato je ispitivan status PTEN, pAkt i pERK ekspresije i LOH *PTEN* gena kod dve grupe pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća, onih koji su primali i onih koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju.

Takođe, sa druge strane, vršena su brojna istraživanja o uzrocima nastanka rezistencije na primenjenu hemoterapiju. Otkriveni su geni odgovorni za sintezu proteina koji izbacuju hemoterapeutik iz maligne ćelije. Sposobnost tumorskih ćelija da izbace lek se postiže preko tzv. proteina-transportera. Najviše proučavani transportni proteini su prvenstveno P-glikoprotein (P-gp), zatim protein *multi-drug* rezistencije 1 (MRP1) i

protein vezan za rezistenciju karcinoma dojke (BCRP) koji je otkriven u navedenom tkivu, ali se kasnije došlo do saznanja da je prisutan i u karcinomima drugih organa. Rezistencija na hemoterapeutike može biti urođena ili stečena. Fenomen rezistencije na širok spektar funkcionalno i strukturno nesrodnih lipofilnih hemoterapeutika je označen kao višestruka rezistencija (engl. *multi-drug resistance-MDR*). Urođena višestruka rezistencija se razvija u toku nastanka tumora (kancerogeneze), dok stečena (*de novo*) rezistencija predstavlja odgovor tumorskih ćelija na primenu hemoterapije. *Multi-drug* rezistencija je skup različitih faktora koji dovode do: povećane sposobnosti tumorskih ćelija da izbace lek, redistribucije leka unutar ćelije što onespoblijava njegov kontakt sa ciljnim molekulom, unutarćelijske detoksikacije, smanjene sinteze specifičnih ciljnih molekula i izbegavanja apoptoze. Usled slabe unutarćelijske akumulacije, hemoterapeutici nisu u mogućnosti da ostvare svoje specifično dejstvo i oštete tumorske ćelije sa razvijenim *multi-drug resistance* fenotipom.

Cilj ovog istraživanja je bio i da se utvrdi prisustvo ekspresije transportnih pumpi P-gp, MDR1 i BCRP na RNK i proteinskom nivou kod dve grupe pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća.

Zatim je izvršena korelacija promena svih navedenih ispitivanih proteina međusobno i sa kliničkopatološkim parametrima pacijenata. Uočene promene takođe su korelisane sa dužinom preživljavanja obe grupe pacijenata kako bi se sagledalo da li su one u vezi sa primenom neoadjuvantne terapije.

U ovom istraživanju obe grupe je činilo po 35 pacijenata, operisanih od skvamocelularnog karcinoma ili adenokarcinoma pluća. Skvamocelularni karcinom je dominirao u obe grupe pacijenata – 19 (54,3%) vs. 20 (57,1%), umereni histološki gradus – 15 (42,8%) vs. 23 (65,7%), T3 stadijum proširenosti karcinoma – 11 (31,4%) vs. 15 (42,9%), N1 nodalni status – 14 (40,0%) vs. 14 (40,0%) i IIIa klinički stadijum tumorske bolesti – 12 (34,3%) vs. 20 (57,1%).

## **5.2. Interpretacija primenjene metodologije**

### **5.2.1. Interpretacija metodologije detektovanja PTEN ekspresije**

Ne postoje tačno definisane granične vrednosti (engl. *cut off*) kojima se ekspresija proteina može definisati kao pozitivna ili negativna. U literaturi postoje različite skale imunoreaktivnog bojenja i različiti imunohistohemijski skorovi. U ovom istraživanju je primenjena skala Shomana i saradnika (2008.g.)<sup>84</sup> u kome je granični skor imunoreaktivnosti bio 4, odnosno  $\leq 4$  je bio označen kao smanjena ekspresija – “L”, a  $>4$  je bio označen kao povećana ekspresija – “H”. Sniženu ekspresiju PTEN-a smo utvrdili kod 7 (20%), a povišenu kod 28 (80%) pacijenata u prvoj analiziranoj grupi. U drugoj grupi smo utvrdili sniženu PTEN ekspresiju kod 22 (62,9%), a povišenu kod 13 (37,1%) pacijenata.

Međutim, Perren i saradnici (1999 g.)<sup>86</sup> i Soria sa saradnicima (2002 g.)<sup>35</sup> su gradirali samo intenzitet bojenja u ćelijama dukalnog karcinoma dojke, odnosno nemikrocelularnog karcinoma pluća. Oni su poredili intenzitet PTEN bojenja okolnog regularnog epitela dojke odnosno pluća sa intenzitetom bojenja u malignim ćelijama. Tako je “-“ označavano odsustvo bojenja u malignim ćelijama, “+“, slabiji intenzitet bojenja nego u okolnom tkivu, “++“, istovetan intenzitet bojenja u odnosu sa okolnim tkivom i “+++“, pojačan intenzitet bojenja u odnosu na okolno tkivo.

### **5.2.2. Interpretacija metodologije detektovanja pAkt ekspresije**

Definisanje granične vrednosti pAkt ekspresije takođe još uvek nije utvrđeno. U ovom istraživanju je korišćena metodologija Esteve i saradnika (2010.g.)<sup>84</sup> koji su za graničnu vrednost smatrali skor „50“, odnosno  $\leq 50$  je bila nižena „L“, a  $>50$  povišena „H“ ekspresija pAkt-a. Koristeći navedenu graničnu vrednost ekspresije u prvoj grupi je utvrđeno da je povišena vrednost („H“) prisutna kod 19 (54,3%), a snižena („L“) kod 16 (45,7%) pacijenata. U drugoj grupi povišena vrednost („H“) je ekspimirana kod 18 (51,4%), a snižena („L“) kod 17 (48,6%) pacijenata.

U literaturi postoje i drugi primenjivani skorovi. Suzuki sa saradnicima (2012.g.)<sup>87</sup> je u svom istraživanju značajnom smatrao pAkt ekspresiju u više od 10% malignih ćelija na jednom preseku. Shi sa saradnicima (2011.g.)<sup>18</sup> je u radu o nemikrocelularnim karcinomima pluća tretiranim hemoterapijom, smatrao da ukoliko skor varira od 0 do

300, granična vrednost treba da bude 150. Isti skor sistem, od 0 do 300, je primenio Davies sa saradnicima (2011 g.)<sup>52</sup> na preparatima rektalnog karcinoma takođe tretiranim hemoterapijom, ali je granična vrednost iznosila 80. Dobashi sa saradnicima (2011 g.)<sup>45</sup> je koristio tzv. trostepeni sistem baziran na procentu pozitivno obojenih ćelija: 0, nema skora, odnosno nema imunoreaktivnosti; 1, nizak skor, do 10% imunoreaktivnih ćelija; 2, visok skor, od 10% do 50% imunoreaktivnih ćelija, preko 50% imunoreaktivnih ćelija “značajna” imunoreaktivnost ćelija. Skor “1” i “2” su smatrani pozitivnim.

### ***5.2.3. Interpretacija metodologije detektovanja pERK ekspresije***

Granična vrednost pERK ekspresije još uvek nije definisana. U ovom istraživanju smo koristili skor sistemu koji su primenili Al-Haddad i saradnici (1999.g.)<sup>86</sup> i Handra-Luca i saradnici (2003.g.)<sup>54</sup>. U prvoj grupi ispitivanih pacijenata 29 (82,6%) je imalo sniženu („L“), a 6 (17,1%) povišenu („H“) ERK ekspresiju. U drugoj grupi snižena vrednost („L“) je bila kod 24 (68,6%), a povišena („H“) kod 11 (31,4%) pacijenata. Davies sa saradnicima (2011 g.)<sup>53</sup> je i za pERK koristio skor sistem od 0 do 300, a granična vrednost je iznosila 80.

Međutim, i pored primene istovetne metodologije na tkivu tumora na biopsiji i operativnom materijalu kod istih pacijenata kod kojih nije prethodno sprovedena hemoterapija može se doći do različitih rezultata što govori u prilog heterogenosti populacije malignih ćelija, odnosno da različitih mutacija u genomu malignih ćelija koje dovode do različite ekspresije proteina. U prilog ovoj činjenici govori rad Shao i saradnika (2008.g.)<sup>89</sup> koji su zaključili da se pAkt i pERK ekspresija značajno razlikuje na biopsiji i operativnom isečku jetre kod istih pacijenata.

### ***5.2.4. Interpretacija metodologije detekcije ekspresije transportnih pumpi***

Ekspresija transportnih pumpi se može interpretirati različitom metodologijom, na osnovu intenziteta bojenja, gradiranog od 0 do 3 (Wright i saradnici, 1998.g.)<sup>69</sup>, do procenta imunoreaktivnih ćelija na analiziranom isečku (Kreisholt i saradnici, 1998.g.)<sup>90</sup>. U oba rada je poređenje intenziteta bojenja i prisustvo imunoekspresije u malignim ćelijama vršeno prema okolnom tkivu pluća. U ovom istraživanju korišćena je metodologija Laria i saradnika<sup>70</sup>.

Filipits i saradnici (2007.g.)<sup>91</sup> su smatrali pozitivnom P-gp ekspresiju u više od 20% tumorskih ćelija, a negativnu  $\leq 20\%$  tumorskih ćelija.

U ovom istraživanju je u prvoj grupi pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju sa povećanom ekspresijom bilo više pacijenata nego sa smanjenom, odnosno odsutnom: P-gp 12 (34,3%), MDR1 – 10 (28,6%) i BCRP – 11 (31,4%), vs. P-gp – 23 (65,7%), MDR1 – 25 (71,4%) i BCRP – 24 (68,6%). U drugoj grupi pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju sa povećanom ekspresijom je bilo više pacijenata nego sa smanjenom, odnosno odsutnom: P-gp 10 (28,6%), MDR1 – 2 (5,7%) i BCRP – 17 (48,6%) pacijenata vs. P-gp – 25 (71,4%), MDR1 – 33 (94,3%) i BCRP – 18 (51,4%).

Standardizacija granične vrednosti ekspresije ovih proteina je neophodna ukoliko se ovaj podatak želi iskoristiti kod personalizovane terapije nemikrocelularnog karcinoma pluća. Takođe je potrebno da nivo ekspresije nezavisno interpretiraju dva patologa i da razlika u evaluaciji ne bude veća od 10% ćelija (Kreisholt i saradnici, 1998.g.)<sup>90</sup>. Na ovaj način smo u našem istraživanju izbegli mogući *bias*.

### **5.3. Prediktivni značaj prisustva LOH *PTEN* gena i *PTEN*, *pAkt* i *pERK* ekspresije**

Nivo *pAkt* i *pERK* ekspresije kao i prisustva LOH *PTEN* gena je bio sličan u obe grupe ispitanika, kod one koja je primala i one koja nije primala neoadjuvantnu hemoterapiju. Samo je *PTEN* ekspresija bila lagano povišena u grupi bez neoadjuvantne hemoterapije (37,1% vs. 20%) ali bez statističke značajnosti. Slično su pokazali Yonemori i saradnici 2009 g.<sup>92</sup> i Barbareschi sa saradnicima 2012 g.<sup>93</sup> na uzorcima karcinoma dojke i Erben sa saradnicima 2011 g.<sup>93</sup> na uzorcima karcinoma rektuma – snižena *PTEN* ekspresija ili njegovo odsustvo nisu korelirali sa primenjenom hemoterapijom. Dalja istraživanja su uključila ispitivanje prisustva korelacije LOH *PTEN* gena i *pAkt*, *pERK* i *PTEN* ekspresije i kliničkopatoloških parametara ispitanika koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju i onih koji je nisu primali. Dobijeni rezultati su pokazali da je u grupi pacijenata koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju i kod kojih nisu dijagnostikovane metastaze u limfne noduse broj onih sa sniženom *pAkt* ekspresijom bio statistički značajno veći nego broj onih sa visokom *pAkt* ekspresijom. Zato bi se moglo reći da neoadjuvantna hemoterapija snižava ekspresiju ovog proteina sugerišući njegovu korisnu ulogu kod karcinoma kod kojih je aktiviran PI3K/Akt/mTOR signalni put i kod kojih nisu

bili zahvaćeni limfni nodusi, što se obično očekuje u ranim stadijumima tumorske bolesti. Ovaj rezultat je u skladu sa činjenicom da je ekspresija PI3K and pAkt-a već detektovana u ranom stadijumu tumorske bolesti nemikrocelularnih karcinoma pluća (Al-Saadi saradnici, 2009 g.<sup>50</sup> i David i saradnici, 2004 g.)<sup>95</sup>. Pored toga, Yip sa saradnicima je (2014 g.)<sup>96</sup> prokazao da pacijenti sa ranim stadijumom tumorske bolesti nemikrocelularnog karcinoma i povišenom pAkt ekspresijom imaju lošiju prognozu nego oni sa niskim nivoom ekspresije. Takođe, Long sa saradnicima (2013 g.)<sup>97</sup> je pokazao da snižena pAkt regulacija može suprimirati invaziju i migraciju ćelija osteosarkoma. Cotler i saradnici (2008 g.)<sup>98</sup> su utvrdili da je gubitak heterozigotnosti *PTEN* gena bio udružen sa višim stadijumom hepatocelularnog karcinoma, a da je pAkt aktivacija ubrzala ćelijski ciklus hepatocita, progresiju karcinoma, poništavajući kontrolu ćelijskog ciklusa.

Analizirajući preživljavanje ispitanika u odnosu na status *PTEN*, pAkt, pERK ekspresije i LOH *PTEN* gena, uočeno je da su pacijenti koji su bili u grupi koja je primala neoadjuvantnu hemoterapiju i imala snižen nivo pERK ekspresije živeli značajno duže od onih sa povišenom pERK ekspresijom.

Istraživanje Chenga sa saradnicima (2014 g.)<sup>98</sup> na ćelijskim linijama A549 je takođe pokazalo da njihova migracija i invazija može biti suprimirana PKC- $\alpha$ -ERK1/2-NF- $\kappa$ B putem. Slične rezultate je prikazao i Miao sa saradnicima (2014 g.)<sup>100</sup> kod ćelija osteosarkoma čiji su rast i invazija bili inhibirani MAPK/ERK signalnim putem. Pored toga, neoadjuvantna hemoterapija primana zbog karcinoma kože i kolorektalnog adenokarcinoma indukuje istovremenu citotoksičnost posle produžene ERK inhibicije prema rezultatima Weyergang i saradnika (2013 g.)<sup>101</sup>. Svi ovi rezultati sugerišu da snižen ERK nivo može biti važan faktor za produženo preživljavanje naših ispitanika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju, bez obzira na histološki tip.

Najinteresantniji rezultati su dobijeni kada su uzorci sa nemikrocelularnim karcinomom bili grupisani prema histološkom tipu. Naime, ispitanici sa skvamocelularnim histološkim tipom karcinoma, LOH-om *PTEN* gena koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju su živeli znatno duže od onih koji nisu primali ovu terapiju. Ispitanici sa adenokarcinomom, koji su imali nisku pERK ekspresiju i primali neoadjuvantnu hemoterapiju su imali najduže preživljavanje, zatim ispitanici sa niskom pERK ekspresijom bez neoadjuvantne

hemoterapije, a zatim ispitanici sa visokom pERK ekspresijom i hemoterapijom i konačno ispitanici sa visokom pERK ekspresijom i bez neoadjuvantne hemoterapije.

Ovi rezultati su vrlo značajni jer ukazuju na mogućnost grupisanja pacijenata prema histološkom tipu nemikrocelularnog karcinoma pluća pre primene personalizovane terapije.

Autori studija, Milošević i saradnici (2014 g.)<sup>102</sup> i Rommela i saradnici (1999 g.)<sup>103</sup>, su zaključili da aktivacija PI3K/Akt/mTOR signalnog puta inhibiše ERK1/ERK2 aktivaciju ukoliko je prisutan LOH *PTEN* gena i da možemo očekivati visoku pAkt ekspresiju. Pošto smo pokazali da neoadjuvantna hemoterapija ima pozitivan efekat kod ispitanika sa aktiviranim PI3K/Akt/mTOR signalnim putem, povišen pAkt nivo bi mogao postati pozitivan prediktor za primenu hemoterapije kod nemikrocelularnih karcinoma pluća. Takođe, kod svih naših pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća bila je primenjena hemoterapija bazirana na platini što ukazuje na to da je antitumorska aktivnost bila sprovedena kroz Akt i ERK1/ERK2 signalne puteve (Zhang, 2014.g.<sup>104</sup>, Zhang, 2014.g.<sup>105</sup>).

Otkriće “vođećih mutacija” kao kod epidermalnog faktora rasta (EGFR) i kinaze anaplastičnih limfoma (ALK) vodilo je do poboljšanja u personalizovanoj terapiji adenokarcinoma pluća, sudeći po radovima Giaccone i saradnika, (2005 g.)<sup>106</sup> i Kwakai saradnika (2010 g.)<sup>107</sup>.

Istovetna ili slična molekularna terapija za skvamocelularni karcinom ne postoji. Iz tih razloga bi identifikacija ciljane molekularne terapije trebalo da postane prioritet u istraživanjima.

#### **5.4. Prediktivni značaj P-gp/MDR1, MRP1 i BCRP ekspresije**

Rezultati studije Roya i saradnika iz 2007 g.<sup>66</sup> su ukazali da su P-gp i MRP1 često ekspimirani u nemikrocelularnim karcinomima pluća. Osim na nemikrocelularnom karcinomu pluća istraživanja uloge P-gp-a se vrše i na karcinomima drugih lokalizacija. Prisustvo P-gp ekspresije na prethodno hemoterapijom tretiranom karcinomu dojke je loš prognostički faktor i povećava šansu za nastanak relapsa, utvrdili su Burger i saradnici (2003 g.)<sup>108</sup>. Takođe su pacijenti koje smo mi ispitivali a koji su imali smanjenu P-gp ekspresiju i nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju živeli značajno duže on onih koji su tu terapiju primili. Isti trend je uočen u kod pacijenata obolelih od skvamocelularnog

karcinoma pluća. Pacijenti sa ovom dijagnozom bez neoadjuvantne hemoterapije i sa smanjenom P-gp ekspresijom su živeli značajno duže od onih koji su ovu terapiju primili. Prisustvo P-gp-a je već dovedeno u vezu sa povećanim rizikom od smrti kod pacijenata obolelih od NSCLC<sup>109</sup>.

Roy i saradnici su pokazali da je MRP1 najčeće eksprimirana pumpa kod nemikrocelularnih karcinoma pluća, odnosno bila je prisutna kod 87% ispitivanih pacijenata. To je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji gde je na nivou iRNK najviše eksprimiran MRP1 kod obe grupe pacijenata. Kada govorimo o proteinskoj ekspresiji, dobijeni rezultati su još ubedljiviji. Naime, MRP1 je prisutan kod značajno većeg broja pacijenata koji nisu primili neoadjuvantnu hemoterapiju. Ovaj rezultat jasno ukazuje na potrebu za testiranjem pacijenata na prisustvo ove transportne pumpe pre primene terapije, s obzirom da se većina terapijskih protokla NSCLC bazira na preparatima platine koji se iz ćelije prvenstveno izbacuju upravo MRP1 pumpom.

U revijalnom radu Munoz i saradnika iz 2007.g.<sup>67</sup> konstatovano je da je MRP1 često prekomerno eksprimiran u velikom broju ćelija nemikrocelularnog karcinoma pluća i pre započinjanja hemoterapije i da je visoko značajni indikator lošeg odgovora na hemoterapiju i lošeg preživljavanja. Rezultati naše studije pokazuju da je MRP1 ekspresija bila viša kod pacijenata koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju a imali su I ili II stadijum tumorske bolesti.

U velikoj studiji na pacijentima kod kojih je dijagnostikovao nemikrocelularni karcinom pluća na operativnom materijalu, Filipits i saradnici (2007 g.)<sup>91</sup> su zaključili da je ekspresija bila češće pozitivna kod pacijenata kod kojih su limfni nodusi bili zahvaćeni, kod kojih je utvrđen II I III klinički stadijum tumora i sa lošijim opštim zdravstvenim stanjem, ali nije bio značajno udružen sa histološkim tipom karcinoma, starosti i polom ispitivanih pacijenata, invazijom limfnih i krvnih sudova, zahvatanjem pleure, zapaljenskim infiltratom u stromi karcinoma. Autori su, takođe, zaključili da MRP1 ekspresija nije imala prediktivni značaj kod operisanih pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu terapiju.

U radu Nootera i saradnika iz 1996 g.<sup>68</sup> uočeno je da je u dobro diferentovanim skvamocelularnim karcinomima pluća slabije izražena MRP1 ekspresija u ćelijama na periferiji nego u centralnom delu gde je izražena keratinizacija. Ova činjenica takođe govori u prilog heterogenosti populacije kancerskih ćelija, odnosno da se na jednom



preseku mogu javiti dve populacije ćelija, jedne koje ekspimiraju, a druge koje ne ekspimiraju protein, odnosno da nije u pitanju različit senzibilitet RT-PCR i imunohistohemijske metode.

Wright sa saradnicima (1998)<sup>69</sup> je zaključio da postoji heterogenost ekspresije transportnih pumpi između različitih histoloških tipova nemikrocelularnih karcinoma pluća. Ćelije dobro diferentovanog adenokarcinoma i hiperplastični pneumociti ekspimiraju znatno snažnije MRP1 od ćelija skvamocelularnog karcinoma i krupnoćelijskog karcinoma pluća. Nije uočena korelacija između MRP1 ekspresije i histološkog gradusa, veličine i stadijuma karcinoma, kao i pola, starosti i prisustva metastaza.

O ulozi MRP1 u nastajanju *multi-drug* rezistencije na karcinomima drugih lokalizacija takođe su vršena ispitivanja. Burger i saradnici (2003 g.)<sup>108</sup> su utvrdili da MRP1 ekspresija ima samo dodatni prognostički značaj u karcinomima dojke koji su lečeni prvom linijom hemoterapije.

Yoh sa saradnicima (2004 g.)<sup>110</sup> je smatrao da postoji značajna povezanost između BCRP ekspresije i loše prognoze i terapijskog odgovora na primenjenu hemoterapiju baziranu na derivatima platine kod uznapredovalog nemikrocelularnog karcinoma pluća. Naši rezultati prate ova istraživanja, jer je značajno povišena BCRP ekspresija detektovana kod pacijenata koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju i nisu imali prisutno tumorsko tkivo u limfnim čvorovima.

Li sa saradnicima (2009 g.)<sup>111</sup> je u svojoj studiji prikazao da visoka BCRP ekspresija u nemikrocelularnim karcinomima pluća nije imala negativan uticaj na odgovor tumora na hemoterapiju baziranu na cisplatini, kao ni na preživljavanje bez progresije tumora niti na njihovo ukupno preživljavanje. Autori ovog rada su došli do istog zaključka kao i Faneyte sa saradnicima (2002 g.) u svom radu<sup>112</sup>, naglašavajući da su do njega došli različitim metodologijom ispitivanja BCRP ekspresije, imunohistohemijski, odnosno RT-PCR metodom.

Li sa saradnicima (2010 g.)<sup>113</sup> nije našao korelaciju u ekspresiji BCRP u nemikrocelularnom karcinomu pluća pre i posle primenjene hemoterapije bazirane na derivatima platine. Ekspresija BCRP na proteinskom i iRNK nivou u grupama pacijenata koje smo mi ispitivali takođe je ujednačena. Kao i u našem slučaju, ni u citiranom radu nije utvrđena povezanost BCRP i MRP1 ekspresije sa histološkim tipom karcinoma,

starosti, polom i opštim stanjem pacijenata obolelih od nemikrocelularnog karcinoma pluća. Utvrđeno je jedino da nivo BCRP ekspresije pozitivno korelira sa nivoom MRP1 ekspresije, dovodeći do istovetnog zaključka kao u svom prethodnom radu da je samo MRP1 prediktor za odgovor na hemoterapiju baziranu na derivatima platine.

Do istog zaključka su došli Kim i saradnici (2009 g.)<sup>114</sup> ispitujući BCRP ekspresiju u ćelijama mikrocelularnog karcinoma pluća kod pacijenata koji su takođe primali hemoterapiju na bazi derivata platine. Korelacija između nivoa BCRP ekspresije na biopsijama istih pacijenata, pre i posle primenjene hemoterapije nije utvrđena. Međutim, utvrđeno je da je BCRP ekspresija značajno povezana sa preživljavanjem bez progresije tumora i da je prediktor odgovora tumora na primenjenu hemoterapiju, ali ne i sa ukupnim preživljavanjem. Autori zato smatraju da BCRP igra bitnu ulogu u nastanku *multi-drug* rezistencije i da može da posluži kao idealna molekularna meta u terapiji mikrocelularnog karcinoma pluća.

Ekspresija BCRP kod karcinoma dojke ima negativan prediktivni značaj u proceni ishoda bolesti po mišljenju Burgera i saradnika (2003 g.)<sup>108</sup>, ali po mišljenju Faneyte i saradnika (2002 g.)<sup>112</sup> nema negativan uticaj na odgovor tumora na hemoterapiju i ne utiče na ukupno preživljavanje pacijenata.

Lario sa saradnicima (2007 g.)<sup>70</sup> je zaključio da postoji moguća povezanost *multi-drug* rezistencije i rezistencije karcinoma pluća na hemoterapiju. Utvrđena je česta istovremena udruženost prisustva P-gp i MRP1 u malignim ćelijama, naročito kod skvamocelularnog karcinoma. P-gp je često udružen sa drugim *multi-drug* proteinima recimo LRP (*lung resistance protein*). Autori ovog rada zaključuju da udruženost ovih proteina nije prognostički faktor kao što je stadijum tumorske bolesti, kao i da nema efekta na preživljavanje pacijenata obolelih od nemikrocelularnog karcinoma pluća i ne predstavlja rizik od relapsa bolesti.

Autori ovog rada smatraju da treba da bude postavljena dobro dizajnirana studija upravo na nemikrocelularnim karcinomima pluća koja bi odgovorila na sledeća pitanja: 1. Da li je metod detekcije proteina uključenih u *multi-drug* rezistenciju dobar; 2. Koliki je minimum koncentracije, odnosno količine proteina dovoljan da izazove rezistenciju? 3. Da li imamo pouzdane analize za otkrivanje proteina uključenih u *multi-drug* rezistenciju? 4. Da li su ovi specifični inhibitori kandidati za primenu u kliničkoj praksi?

Karcinom pluća je malignitet sa visokom prevalencom i visokim mortalitetom i značajnom ekspresijom proteina uključenih u *multi-drug* rezistenciju i zato je dobar uzorak za ispitivanje iste. Evidentno je da je rezistencija na hemoterapiju rezultat mnogih faktora i da samo ovi proteini ne igraju ulogu u relapsu nemikrocelularnog karcinoma pluća. Potrebno je istovremeno identifikovati i druge posebne mehanizme za nastanak rezistencije na hemoterapiju.

Stvaranje individualnog profila rezistencije na hemoterapiju nemikrocelularnog karcinoma pluća kod svakog pacijenta treba da postane posebna strategija lečenja. Ovakav cilj možda izgleda jako daleko, ali je moguće bliži nego što mislimo.

Iz prezentovanih rezultata, kao i njihovog tumačenja u odnosu na postojeću literaturu, proizilaze sledeći zaključci ove doktorske disertacije:

## 6. ZAKLJUČCI

1. U grupi pacijenata koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju 19 je bilo neinformativno za svih pet testiranih markera za gubitak heterozigotnosti *PTEN* gena. Ostalih 16 informativnih slučajeva je pokazalo gubitak jednog alela (45,7%). U grupi pacijenata koji su dobili neoadjuvantnu hemoterapiju 16 je bilo neinformativno za *PTEN* markere. Od 16 informativnih slučajeva, koji su bili heterozigoti za barem jedan ispitivani lokus, 13 je pokazalo gubitak alela (40,6%).
2. Imunohistohemijska analiza je pokazala da su promene u komponentama PI3K/Akt/mTOR i RAS/RAF/MEK/ERK signalnih puteva važne u genezi NSCLC. Pokazana je visoka pAkt ekspresija u obe grupe pacijenata, sa i bez neoadjuvantne hemoterapije (54,3% i 51,4%). Ekspresija pERK proteina je bila ujednačena (25,7%) dok je broj pacijenata sa povišenom PTEN ekspresijom bio neznatno veći u grupi koja nije dobila neoadjuvantnu hemoterapiju (37,1% vs. 20%).
3. Analiza povezanosti dobijenih promena i kliničkopatoloških parametara pacijenata pokazala je da je broj pacijenata bez invazije karcinoma u limfne noduse koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju i imali nisku pAkt ekspresiju je bio značajno viši od broja onih pacijenata koji su imali visoku ekspresiju ovog proteina.
4. Analiza ukupnog preživljavanja pacijenata sa ili bez neoadjuvantne hemoterapije pokazala je da su pacijenti koji su primali neoadjuvantnu hemoterapiju sa smanjenom pERK ekspresijom živeli značajno duže. Zatim, su svi pacijenti grupisani prema histološkom tipu karcinoma. Pacijenti koji su oboleli od skvamocelularnog karcinoma, imali LOH *PTEN* gena i primali neoadjuvantnu hemoterapiju su živeli značajno duže. Pacijenti sa adenokarcinomom pluća, niskom pERK ekspresijom i neoadjuvantnom hemoterapijom živeli su najduže, zatim pacijenti koji su imali nisku pERK ekspresiju i nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju, a zatim pacijenti sa visokom pERK ekspresijom i koji suprimali neoadjuvantnu hemoterapiju i na kraju pacijenti sa visokom pERK ekspresijom i bez primljene neoadjuvantne hemoterapije.

5. Ispitivanjem ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* gena pokazano je da je u obe grupe pacijenata povišena ekspresija *BCRP* gena uočena je kod samo jednog pacijenta, povišena ekspresija *MDR1* gena kod 2 pacijenta koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju i 4 pacijenta bez terapije, a povišena ekspresija *MRP1* gena kod 9 pacijenata sa hemoterapijom i 13 pacijenata bez hemoterapije.

6. Imunohistohemijska studija na tumorskim uzorcima pacijenata koji su dobili neoadjuvantnu terapiju je pokazala ujednačen nivo ekspresije sve tri transportne pumpe P-gp, *MRP1* i *BCRP*: 57,1% je imalo P-gp visoku ekspresiju, 57,1% pacijenata *MRP1* visoku ekspresiju i 68,6% pacijenata *BCRP* visoku ekspresiju. Dobijeni rezultati u grupi pacijenata koji nisu primali neoadjuvantnu hemoterapiju su bili slični kada je u pitanju P-gp i *BCRP* ekspresija: 60% pacijenata je imalo visoku P-gp ekspresiju, a 51,4% pacijenata visoku *BCRP* ekspresiju. Ekspresija *MRP1* transportne pumpe je bila izrazito veća u odnosu na ekspresiju ostale dve, naime kod 91,4% pacijenata je *MRP1* bila visoko ekspimirana.

Pacijenti koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju imaju značajno veću *MRP1* ekspresiju u odnosu na pacijente koji su ovu terapiju nisu primali.

7. Analiza povezanosti P-gp, *MRP1* i *BCRP* ekspresije i kliničkopatoloških parametara je pokazala da značajno više pacijenata koji su u I ili II stadijumu maligne bolesti i nisu dobili neoadjuvantnu hemioterapiju imaju visoku *MRP1*ekspresiju. Pored toga, značajno veći broj pacijenata bez invazije u limfne čvorove i bez neoadjuvantne terapije imao je visoku ekspresiju *BCRP* proteina.

8. Analizom ukupnog preživljavanja pacijenata sa ili bez neoadjuvantne hemoterapije u odnosu na P-gp, *MRP1* i *BCRP* ekspresiju uočeno je da su pacijenti koji nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju i koji su imali nisku P-gp ekspresiju živeli značajno duže u odnosu na pacijente koji su primili neoadjuvantnu hemoterapiju i imali nisku P-gp ekspresiju. Zatim, su svi pacijenti grupisani prema histološkom tipu karcinoma. Pacijenti koji su oboleli od skvamocelularnog karcinoma, imali nisku P-gp ekspresiju i nisu dobili neoadjuvantnu hemoterapiju živeli su značajno duže od pacijenata sa istim karakteristikama, a koji su ovu terapiju primili.

9. Sumirano, u skladu sa ostalim studijama ovi rezultati pokazuju da primena neoadjuvantne hemoterapije može biti korisna u lečenju nemikrocelularnog karcinoma pluća uz dodatne terapeutske mete za adenokarcinom, a za ispitivanje novih za

skvamocelularni karcinom, što bi koristilo razvoju personalizovanog lečenja ovih pacijenata.

## 7. LITERATURA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12):2893-917.
2. Institut za Javno Zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanovic – Batut". Centar za prevenciju i kontrolu nezaraznih bolesti. Incidencija i mortalitet od raka 2012. U: registar za rak u centralnoj Srbiji. Beograd: Institut za Javno Zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanovi - Batut"; 2015.
3. Marković-Denić L, Vlajinac H, Zivković S, Miljus D. Cancer mortality among men in Central Serbia: 1985-2006 survey study. *Croat Med J* 2008; 49(6):792-8.
4. Markovic-Denic L, Cirkovic A, Zivkovic S, Stanic D, Skodric-Trifunovic V. Cancer mortality in central Serbia. *J BUON* 2014; 19(1):273-7.
5. Molina JR, Yang P, Cassavi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(5): 584-94.
6. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123:21–49.
7. Gazdar AF, Thun MJ. Lung cancer, smoke exposure and sex. *J Clin Oncol* 2007; 25(5):469–71.
8. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, editors. World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC; 2004.
9. Janssen-Heijnen M, Coebergh JW. The changing epidemiology in Europe. *Lung Cancer* 2003; 41(3):245–58.
10. Stojšić J, Adžić T, Marić D, Radojičić J, Marković J, Milovanović I, Milenković B. Gender and age trends of histological type of lung cancer in twenty years period – pathological perspective. *J BUON* 2010; 15(1):136-40.
11. Travis WD. Reporting lung cancer pathological specimens. Impact of the anticipated 7<sup>th</sup> Edition TNM Classification based on recommendation of the IASLC Staging Committee. *Histopathology* 2009; 54: 3-11.
12. Vallières E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, Chansky K, Shaikh Z, Goldstraw P; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4(9):1049-59.

13. Wallace WA. The challenge of classifying poorly differentiated tumours of lung. *Histopathology* 2009; 54(1): 28-42.
14. Daly BD, Cerfolio RJ, Krasna MJ. Role of surgery following induction therapy for stage III non-small cell lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2011; 20(4): 721-32.
15. Azzoli CG, Baker S Jr, Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, Johnson DH, Laskin JL, Masters G, Milton D, Nordquist L, Pfister DG, Piantadosi S, Schiller JH, Smith R, Smith TJ, Strawn JR, Trent D, Giaccone G; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(36): 6251-66.
16. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45(2):228-47.
17. Lococo F, Cesario A, Margaritora S, Dall'Armi V, Nachira D, Cusumano G, Meacci E, Granone P. Induction therapy followed by surgery for T3-T4/N0 non-small cell lung cancer: long-term results. *Ann Thorac Surg* 2012; 93(5):1633-40.
18. Pu X, Hildebrandt MAT, Lu C, Lin J, Stewart DJ, Ye Y, Gu J, Spitz MR, Wu X. PI3K/PTEN/mTOR pathway genetic variation predicts toxicity and distant progression in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2011; 71(1): 82-8.
19. Shi Y, Chen L, Li J, Lv YL, Sun Q, Wang LX, Jiao SC. Prognostic and predictive values of pERK1/2 and pAkt-1 expression in non-small cell lung cancer patient treated with adjuvant chemotherapy. *Tumor Biol* 2011; 32:381-90.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 4; 144(5):646-74.
21. Bishop JM. Molecular themes in carcinogenesis. *Cell* 1991; 64(2):235-48.
22. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. Review. *Cell* 1991; 64(2):281-302.
23. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16(Suppl 2):S17-27.
24. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001; 114:1439-45.
25. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007; 26:3113-21.



26. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro B, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advan Enzyme Regul* 2006; 46:249-79.
27. Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer. *J Clin Invest* 2008; 118(9):3003-6.
28. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(1):87-90.
29. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol* 2004; 4:64.
30. Liu S, Knapp S, Ahmed AA. The structural basis of PI3K cancer mutations: from mechanism to therapy. *Cancer Res* 2014; 74(3):641-6.
31. Wang L, Hu H, Pan Y, Wang R, Li Y, Shen L, Yu Y, Li H, Cai D, Sun Y, Chen H, PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wild type subgroup. *PloS One* 2014; 9(2): e88921.
32. Jiang AG, Yu H, Huang JA. Expression and clinical significance of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal transduction pathway in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Lett* 2014; 8(2): 601-7.
33. Ittmann M. Allele loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:2143-7.
34. Charles L., Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008; 452(7187):548-52.
35. Ittmann M. Allele loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:2143-7.
36. Soria JC, Lee HY, Lee JI, Wang L, Issa JP, Kemp BL, Liu DD, Kurie JM, Mao L, Khuri FR. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 2002;8 (5):1178-84.
37. Dahia PLM. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *ENDOCR-RELAT CANCER* 2000; 7:115-29.
38. Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, Nakashima K, Kage M, Izumi H, Kohno K, Uramoto H, Yasumoto K, Kuwano M, Ono M. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 2010; 70(21): 8715-25.

39. Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* 2007; 121(1):249-53.
40. Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathological features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2002; 99:63-7.
41. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, Whale AD, Martinez-Diaz H, Rozengurt N, Cardiff RD, Liu X, Wu H. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 2003; 3(2):117-30.
42. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001; 8(2):317-25.
43. Andjelkovic T, Bankovic J, Stojsic J, Milinkovic V, Podolski-Renic A, Ruzdijic S, Tanic N. Coalterations of p53 and PTEN tumor suppressor genes in non-small cell lung carcinoma patients. *Transl Res* 2011; 157(1):19-28.
44. Andjelkovic T, Bankovic J, Milosevic Z, Stojsic J, Milinkovic V, Pesic M, Ruzdijic S, Tanic N. Concurrent alteration of p16 and PTEN tumor suppressor genes could be considered as potential molecular marker for specific subgroups of NSCLC patients. *Cancer Biomark* 2011/2012; 10(6):277-86.
45. Hong TM, Yang PC, Peck K, Chen JJ, Yang SC, Chen YC, Wu CW. Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(3):355-63.
46. Dobashi Y, Suzuki S, Kimura M, Matsubara H, Tsubochi H, Imoto I, Ooi A. Paradigm of kinase-driven pathway downstream of epidermal growth factor receptor/Akt in human lung cancer. *Human Pathology* 2011; 42: 214-26.
47. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, Hewitt SM, Fujii T, Cordon-Cordo C, Jen J, Travis WD. Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1):240-8.
48. Memmott RM, Dennis PA. The role of the Akt/mTOR pathway in tobacco-carcinogen induced lung tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1):4-10.
49. Suzuki S, Bashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshikazi T, Ooi A. EGFR and HER-2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Arch* 2012; 461(3):271-82.
50. Al-Saad S, Donnem T, Al-Shibli K, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. Diverse prognostic roles of Akt isoforms, PTEN and PI3K in tumor epithelial cells and stromal compartment in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(10):4175-83.

51. Johnson GL, Lapadat R. Mutagen-activated protein kinase pathways mediated ERK, JNK and p38 proteinkinases. *Science* 2002; 298:1911-2.
52. Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001; 75(21):10348-58.
53. Davies JM, Trembath DT, Deal AM, Funkhouser WK, Calvo BF, Finnegan T, Weck KE, Tepper JE, O'Neil BH. Phospho-ERK and AKT status, but not KRAS mutation status, are associated with outcomes in rectal cancer treated with chemoradiotherapy. *Radiat Oncol* 2011; 6:114-22.
54. Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, Fouret P. Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 2003; 163(3): 957-67.
55. Stewart DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 75(3): 173-234.
56. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63:12-31.
57. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004a;18:189-218.
58. Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, van Zandwijk N. Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. *J Clin Oncol* 1997; 15(1):285-91.
59. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Jänne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanoovic D, Stinson JA, Zhang YR, Seshagiri S, Hillan KJ. 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.
60. Lee KH, Han SW, Hwang PG, Oh DY, Kim DW, Chung DH, Im SA, Kim TY, Heo DS, Bang YJ. Epidermal growth factor receptor mutations and response to chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36(6):344-50.
61. Klein I, Sarkadi B, Váradi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461(2):237-62.
62. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204(3):216-37.

63. Sui H, Fan ZZ, Li Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *J Int Med Res* 2012; 40(2):426-35.
64. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-Glycoprotein) in human and tumor tissue. *J Histochem Cytochem* 1990; 38:1277-87.
65. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J* 1989; 3(14):2583-92.
66. Roy S, Kenny E, Kennedy S, Larkin A, Ballot J, Perez De Villarreal M, Crown J, O'Driscoll L. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 mRNA and protein expression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2007; 27(3A):1325-30.
67. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* 2007; 59(12):752-7.
68. Nooter K, Bosman FT, Burger H, van Wingerden KE, Flens MJ, Scheper RJ, Oostrum RG, Boersma AW, van der Gaast A, Stoter G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 1996; 7(1):75-81.
69. Wright SR, Boag AH, Valdimarsson G, Hipfner DR, Campling BG, Cole SPC, Deely RG. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clin Cancer Res* 2010; 4: 2279-89.
70. Lario AP, García CB, Elizondo ME, Lobo C. Expression of proteins associated with multidrug resistance to chemotherapy in lung cancer. *Arch Bronchopneumol* 2007; 43(9):479-84.
71. Nakamura Y, Oka M, Soda H, Shiozawa K, Yoshikawa M, Itoh A, Ikegami Y, Tsurutani J, Nakatomi K, Kitazaki T, Doi S, Yoshida H, Kohno S. Gefitinib ("Iressa", ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance. *Cancer Res* 2005; 65(4):1541-6.
72. Yamaguchi H, Nakatomi K, Yanagihara K, Kohno S, Tsukamoto K. Methylation status of Breast Cancer resistance Protein Detected by Methylation-specific Polymerase Chain Reaction analysis is correlated inversely with its expression in drug-resistant lung cancer cells. *Cancer* 2008; 112(5):1122-30.
73. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001; 61(8):3458-64.

74. Kawabata S, Oka M, Soda H, Shiozaawa K, Nakatomi K, Tsurutani J, Nakamura Y, Doi S, Kitazaki T, Sugahara K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3052-7.
75. Sugimoto Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Mitsuhashi J. Breast cancer resistance protein: Molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. Review Article. *Cancer Sci* 2005; 96(8):457-65.
76. Yanase K, Tsukahara S, Asada S, Ishikawa E, Imai Y, Sugimoto Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(9):1119-25.
77. Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR Jr, Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res* 2007; 67(22):11012-20.
78. Katayama K, Shibata K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. Pharmacological interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling. *Anticancer Res* 2009; 29(4):1059-65.
79. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
80. Feilbott HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 1998; 16(13):1743-8.
81. Hahn M, Wieland I, Koufaki ON, Görgens H, Sobottka SB, Schackert G, Schackert HK. Genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in human brain metastases. *Clin Cancer Res* 1999; 5(9):2431-7.
82. Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S. Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci* 2007; 32(1):38-46.
83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) method. *Methods* 2001; 25:402-8.
84. Shoman N, Klassen S, Mcfadden A, Bickis MG, Torlakovic E, Chibbar R. PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Modern Pathology* 2005; 18: 250-9.
85. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yu D. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 2010; 177(4):1647-56.

86. Al-Haddad S, Zhang Z, Leygue E, Snell L, Huang A, Niu Y, Hiller-Hitchcock T, Hole K, Murphy LC, Watson PH. Psoriasin (S100A7) Expression and Invasive Breast Cancer. *Am J Pathol* 1999; 155:2057–66.
87. Perren A, Weng L-P, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PLM; Komminoth P, Lees JA, Mulligan LM, Mutter GL, Eng C. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinoma of the Breast. *AJP* 1999; 155(4): 1253-60.
88. Suzuki S, Bashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshikazi T, Ooi A. EGFR and HER-2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Arch* 2012; 461(3):271-82.
89. Shao Y-Y, Chen C-L, Ho M-C, Huang C-C, Tu H-C, Hsu C-H, Cheng A-L. Dissimilar Immunohistochemical Expression of ERK and AKT between paired biopsy and hepatectomy tissue of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2012; 32: 4865-70.
90. Kreisholt J, Sorensen M, Jensen PB, Nielsen BS, Andersen CB, Sehested M. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase IIalpha, P-glycoprotein and multidrug resistance protein (MRP) in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(9):1469-73.
91. Filipits M, Haddad V, Schmid K, Huynh A, Dunant A, André F, Brambilla E, Stahel R, Pignon JP, Soria JC, Popper HH, Le Chevalier T, Pirker R. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *Clin Cancer Res* 2007; 13(13): 3892-8.
92. Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hashizume K, Ono M, Kouno T, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Hasegawa T, Kinoshita T, Fujiwara Y. Immunohistochemical expression of PTEN and phosphorylated Akt are not correlated with clinical outcome in breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *Med Oncol* 2009; 26(3): 344-9.
93. Barbareschi M, Cuorvo LV, Girlando S, Bragantini E, Eccher C, Leonardi E, Ferro A, Caldara A, Triolo R, Cantaloni C, Decarli N, Galligioni E, Dalla Palma P. PI3KCA mutations and/or PTEN loss in Her2-positive breast carcinomas treated with trastuzumab are not related to resistance to anti-Her2 therapy. *Virchows Arch* 2012; 461(2):129-39.
94. Erben P, Ströbel P, Horisberger K, Popa J, Bohn B, Hanfstein B, Kähler G, Kienle P, Post S, Wenz F, Hochhaus A, Hofheinz RD. KRAS and BRAF mutations and PTEN expression do not predict efficacy of cetuximab-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81(4):1032-8.
95. David O, Jett J, LeBeau H, Dy G, Hughes J, Friedman M, Brody AR. Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20):6865-71.

96. Yip PY, Cooper WA, Kohonen-Corish MR, Lin BP, McCaughan BC, Boyer MJ, Kench JG, Horvath LG. Phosphorylated Akt expression is a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2014; 67(4):333-40.
97. Long XH, Zhang ZH, Liu ZL, Huang SH, Luo QF. Inhibiting valosin-containing protein suppresses osteosarcoma cell metastasis via AKT/nuclear factor of kappa B signaling pathway in vitro. *Indian J Pathol Microbiol* 2013; 56(3):190-5.
98. Cotler SJ, Hay N, Xie H, Chen ML, Xu PZ, Layden TJ, Guzman G. Immunohistochemical Expression of components of the Akt-mTORC1 pathway is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 844-9.
99. Cheng X, Gu J, Zhang M, Yuan J, Zhao B, Jiang J, Jia X. Astragaloside IV inhibits migration and invasion in human lung cancer A549 cells via regulating PKC- $\alpha$ -ERK1/2-NF- $\kappa$ B pathway. *Int Immunopharmacol* 2014; 23(1):304-13.
100. Miao JH, Wang SQ, Zhang MH, Yu FB, Zhang L, Yu ZX, Kuang Y. Knockdown of galectin-1 suppresses the growth and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the MAPK/ERK pathway. *Oncol Rep* 2014; 32(4):1497-504.
101. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Sustained ERK [corrected] inhibition by EGFR targeting therapies is a predictive factor for synergistic cytotoxicity with PDT as neoadjuvant therapy. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(3):2659-70.
102. Milosevic Z, Pesic M, Stankovic T, Dinic J, Milovanovic Z, Stojsic J, Dzodic R, Tanic N, Bankovic J. Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma. *Transl Res* 2014; 164(5):411-23.
103. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nuñez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 1999; 286(5445):1738-41.
104. Zhang B, Liu ZM, Hao FG, Wang M. siRNA-directed clusterin silencing promotes cisplatin antitumor activity in human non-small cell lung cancer xenografts in immunodeficient mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(11):1595-601.
105. Zhang B, Zhang K, Liu Z, Hao F, Wang M, Li X, Yin Z, Liang H. Secreted clusterin gene silencing enhances chemosensitivity of a549 cells to cisplatin through AKT and ERK1/2 pathways in vitro. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33(4):1162-75.
106. Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(14):3235-42.
107. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve

- SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(18):1693-703.
108. Burger H, Foekens JA; Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JGM, Wiemer EAC, Stoer G, Nooter K. RNA Expression of Breast Cancer Resistance Protein, Lung Resistance-related Protein, Multidrug Resistance-associated Proteins 1 and 2, and Multidrug Resistance Gene 1 in Breast Cancer: Correlation with Chemotherapeutic Response. *Clin Cancer Res* 2003; 9:827-36.
109. Zhu WY, Hunag YY, Liu XG, He JY, Chen DD, Zeng F, Zhou JH, Zhang YK). Prognostic evaluation of CapG, gelsolin, P-gp, GSTP1, and Topo-II proteins in non-small cell lung cancer. *Anat Rec Hoboken* 2012; 295(2):208-14.
110. Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M, Ochiai A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(5):1691-7.
111. Li J, Li ZN, Du YJ, Li XQ, Bao QL, Chen P. Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in advanced non-small-cell lung cancer: correlation with response to chemotherapy and survival. *Clin Lung Cancer* 2009; 10(6):414-21.
112. Faneyte IF, Kristel PM, Maliepaard M, Scheffer GL, Scheper RJ, Schellens JH, van de Vijver MJ. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1068-74.
113. Li J, Li ZN, Yu LC, Bao QL, Wu JR, Shi SB, Li XQ. Association of expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 with outcome of patients with locally advanced non-small cell lung cancer who received neoadjuvant chemotherapy. *Lung Cancer* 2010; 69(1):116-22.
114. Kim YH, Ishii G, Goto K, Ota S, Kubota K, Murata Y, Mishima M, Saijo N, Nishiwaki Y, Ochiai A. Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 65(1):105-11.



## 8. BIOGRAFIJA

- Jelena Stojić je rođena 6. aprila 1960.g. u Sarajevu, Bosna i Hercegovina
- Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu je završila 15. februara 1984.g. prosečnom ocenom 8.36.
- Specijalistički ispit iz Patološke anatomije položila je 2. oktobra 1992.g. na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu odličnim uspehom.
- Zvanje primarijusa je stekla 9. oktobra 2008.g. odlukom Ministarstva zdravlja Republike Srbije.
- Odbranom užeg specijazastičkog rada na temu “Značaj imunohistohemije u diferencijalnoj dijagnozi nesitnoćelijskih karcinoma pluća na malim biopsijskim uzorcima” stekla je zvanje subspecijalste kliničkog patologa 28. juna 2012.g.
- Od 1986.g. do 2005.g. je bila zaposlena kao lekar na specijalizaciji i lekar specijalista patolog u Službi za patohistologiju Kliničkog centra Zemun. Sada je zaposlena je na Odeljenju torakopulmonalne patologije, Službe za patohistologiju, Kliničkog centra Srbije, od 1995.g., a načelnik ovog odeljenja je od jula 2001.g.
- Usavršavala se iz oblasti plućne patologije 2011.g. u Laboratoriji za citologiju i patologiju Univerzitetske bolnice Golnik, Slovenija i 2004.g. u Centru Paul Strauss, u Strazburu, Francuska.
- Decembra 2008.g. upisala je doktorske studije iz oblasti Epidemiologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.
- Od 2011.g. je spoljni saradnik u projektu Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja za projektni period 2011. - 2014.g.: “Identifikacija prediktivnih molekularnih markera u širenju karcinoma, odgovra na terapiju u ishoda bolesti” (OI171023).
- Od novembra 2013.g. je angažovana kao recenzent u internacionalnom odboru časopisa Journal of Case Reports in Clinical Pathology, SAD.
- Kao autor ili koautor je u oko 250 naučnih radova ili saopštenja objavljenih u svetskim i domaćim časopisima kao i na domaćim i inostranim kongresima. Bila je predavač i učesnik po pozivu na kongresima u zemlji i inostranstvu iz oblasti plućne patologije.

## **Prilog 1.**

### **Izjava o autorstvu**

Potpisani-a Jelena Stojšić

broj upisa 08-DS-EP-08

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

Prediktivni značaj PI3K/Akt signalnog puta i transportnih pumpi uključenih u razvoj rezistencije na lekove kod bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća

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

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 01. septembar 2015.g.

Prim dr Jelena Stojšić



## Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Jelena Stojšić

Broj upisa: 08-DS-EP-08

Studijski program: Doktorske studije iz Epidemiologije

Naslov rada: „Prediktivni značaj PI3K/Akt signalnog puta i transportnih pumpi uključenih u razvoj rezistencije na lekove kod bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća”

Mentor: dr Jasna Banković, dr sci, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beograd

Potpisani

Prim dr Jelena Stojšić



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

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

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

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 01. septembar 2015.g.

Prim dr Jelena Stojšić



---

### **Prilog 3.**

#### **Izjava o korišćenju**

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

“Prediktivni značaj PI3K/Akt signalnog puta i transportnih pumpi uključenih u razvoj rezistencije na lekove kod bolesnika sa nemikrocelularnim karcinomom pluća”,

koja je moje autorsko delo.

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

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

#### **1. Autorstvo**

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

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

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 01. septembar 2015.g.

Prim dr Jelena Stojšić



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

