

# Posljedice disfunkcije inzulinu sličnih čimbenika rasta i njihovih receptora u karcinomu pluća nemalih stanica

---

Jakopović, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2007

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:238963>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-10**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Jakopović, Marko (2007) *Posljedice disfunkcije inzulinu sličnih čimbenika rasta i njihovih receptora u karcinomu pluća nemalih stanica [The consequences of Insulin-like growth factors/receptors dysfunction in non-small cell lung cancer]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/557>

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD   | 1  |
| 1.1. Karcinom bronha i pluća  | 1  |
| 1.1.1. Definicija   | 1  |
| 1.1. 2. Epidemiologija  | 1  |
| 1.1. 3. Etiologija  | 2  |
| 1.1. 4. Podjela karcinoma bronha i pluća                            | 5  |
| 1.1. 5. Stadiji proširenosti bolesti                                | 7  |
| 1.1. 5. 1. Staging karcinoma pluća nemalih stanica                  | 7  |
| 1.1. 5. 2. 'Performance' status                                     | 9  |
| 1.1. 6. Klinička slika  | 9  |
| 1.1. 7. Dijagnostički postupci                                      | 10 |
| 1.1. 8. Liječenje karcinoma pluća i bronha                          | 12 |
| 1. 2. Molekularna biologija karcinoma pluća                         | 14 |
| 1. 2. 1. Proto – onkogeni i geni supresori tumora                   | 15 |
| 1. 2. 1. 1. K – ras   | 15 |
| 1. 2. 1. 2. p53   | 15 |
| 1. 2. 1. 3. Retinoblastoma gen (Rb gen)                             | 15 |
| 1. 2. 1. 4. p16 <sup>INK4α</sup> , ciklin-ovisna kinaza (CDK)       | 16 |
| 1. 2. 1. 5. p27/Kip   | 16 |
| 1. 2. 2. Geni za β - tubulin  | 16 |
| 1. 2. 3. Prekomjerna ekspresija proto-onkogeni i njihovih produkata | 17 |
| 1. 2. 3. 1. erbB1/EGF receptor                                      | 17 |
| 1. 2. 3. 2. erbB2/HER2/neu  | 17 |
| 1. 2. 3. 3. bcl-2   | 18 |
| 1. 2. 4. Poremećaj ekspresije čimbenika rasta i njihovih receptora  | 18 |
| 1. 2. 4. 1. Čimbenik rasta hepatocita (HGF)                         | 18 |

|  |    |
|--|----|
| 1. 2. 4. 2. Čimbenik matičnih stanica i c-kit  | 18 |
| 1. 2. 4. 3. Transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (TGF $\beta$ )                                 | 18 |
| 1. 2. 5. Poremećaj imunološkog odgovora kao posljedica tumora                                      | 19 |
| 1. 2. 5. 1. Transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (TGF $\beta$ )                                 | 19 |
| 1. 2. 5. 2. Interleukin – 10 (IL – 10)   | 19 |
| 1. 2. 5. 3. Interleukin – 2 (IL – 2)   | 19 |
| 1. 2. 5. 4. Ciklooksigenaza – 2 (COX-2)  | 20 |
| 1. 2. 6. Poremećaji angiogeneze  | 20 |
| 1. 2. 6. 1. Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF)   | 20 |
| 1. 2. 6. 2. Interleukin – 8 (IL – 8)   | 21 |
| 1. 2. 6. 3. Metaloproteinaze matriksa (MMPs)   | 21 |
| 1. 3. Inzulinu slični čimbenici rasta (IGF), njihovi receptori (IGFR)<br>te vezni proteini (IGFBP) | 21 |
| 1. 3. 1. Hormon rasta (somatotropin, GH)   | 21 |
| 1. 3. 2. Somatomedinska hipoteza   | 22 |
| 1. 3. 3. Fiziologija IGF proteina i regulacija gena  | 23 |
| 1. 3. 4. Ekspresija gena za IGF – I  | 25 |
| 1. 3. 5. Ekspresija gena za IGF – II   | 25 |
| 1. 3. 6. Ekspresija gena za IGF – I receptor (IGF – IR)  | 26 |
| 1. 3. 7. Ekspresija gena za IGF – II receptor (IGF – IIR)  | 26 |
| 1. 4. Sustav inzulinu sličnih čimbenika rasta i neoplazija   | 27 |
| 1. 4. 1. Neoplazme središnjeg živčanog sustava   | 27 |
| 1. 4. 1. 1. Glioblastom i astroцитom   | 27 |
| 1. 4. 1. 2. Meningeom  | 28 |
| 1. 4. 2. Gastrointestinalne neoplazme  | 28 |
| 1. 4. 2. 1. Karcinom kolona  | 28 |
| 1. 4. 2. 2. Karcinom želuca  | 29 |
| 1. 4. 2. 3. Karcinom gušterače   | 29 |
| 1. 4. 2. 4. Hepatocelularni karcinom   | 29 |
| 1. 4. 3. Neoplazme ženskog reproduktivnog sustava  | 30 |
| 1. 4. 3. 1. Karcinom dojke   | 30 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1. 4. 3. 2. Karcinom jajnika   | 30        |
| 1. 4. 3. 2. Karcinom endometrija   | 31        |
| 1. 4. 4. Neoplazme muškog reproduktivnog sustava   | 31        |
| 1. 4. 4. 1. Karcinom prostate  | 31        |
| 1. 4. 5. Neoplazme mokraćnog sustava   | 31        |
| 1. 4. 6. Neoplazme koštanog sustava  | 32        |
| 1. 4. 6. 1. Osteosarkom  | 32        |
| 1. 4. 7. Kožne neoplazme   | 32        |
| 1. 4. 8. Hematološke maligne bolesti   | 32        |
| 1. 4. 8. Neoplazme pluća   | 32        |
| 1. 4. 9. Zaključak   | 33        |
| <b>2. CILJ RADA I HIPOTEZA</b>   | <b>35</b> |
| <b>3. MATERIJAL I METODE</b>   | <b>36</b> |
| 3. 1. Ispitanici i uzorci tkiva  | 36        |
| 3. 2. Ekstrakcija RNA i reverzna transkripcija lančane reakcije polimerazom  | 37        |
| 3. 3. Imunohistokemija   | 37        |
| 3. 4. Analiza gubitka heterozigotnosti i detekcija mutacija u M6P/IGF – IIR  | 38        |
| 3. 5. Kultivacija stanica karcinoma pluća: stanična proliferacija, apoptoza i aktivnost telomeraze nakon blokiranja IGF – IR monoklonim antitijelima | 38        |
| 3. 6. MTT – analiza  | 39        |
| 3. 7. Analiza apoptoze   | 39        |
| 3. 8. Analiza telomeraze   | 39        |
| 3. 9. Statistička analiza  | 40        |
| <b>4. REZULTATI</b>  | <b>40</b> |
| 4. 1. Karcinom pluća velikih stanica i adenokarcinom   | 40        |
| 4. 1. 1. Odnos ekspresije IGF – I/IGF – IR proteina i mRNA i apoptoze  | 40        |
| 4. 1. 2. Analiza gubitka heterozigotnosti i mutacije M6P/IGF – IIR   | 46        |
| 4. 2. Karcinom pluća pločastih stanica   | 47        |

|   |    |
|---|----|
| 4. 2.1. Odnos između ekspresije M6P/IGF – IIR proteina, apoptoze<br>i mutacija u genu za M6P/IGF – IIR          | 47 |
| 4.2. 2. Učinak blokirajućeg protutijela za IGF – I receptor na<br>proliferaciju karcinomskih stanica i apoptozu | 48 |
| 4. 2. 3. Modulacija aktivnosti telomeraze putem sustava<br>IGF – I/IGF – IR                                     | 49 |
| 5. <b>RASPRAVA</b>  | 51 |
| 6. <b>ZAKLJUČAK</b>   | 58 |
| 7. <b>SAŽETAK</b>   | 59 |
| 8. <b>ABSTRACT</b>  | 60 |
| 9. <b>LITERATURA</b>  | 61 |
| 10. <b>ŽIVOTOPIS</b>  | 78 |

## KRATICE

IGF – Inzulinu sličan čimbenik rasta

IGFBP – vezni proteini za inzulinu slične čimbenike rasta

IGF – IR – Receptor za inzulinu sličan čimbenik rasta I

M6P/IGF – IIR – manozna – 6 – fosfat/receptor za inzulilin sličan čimbenik rasta II

MMP – metaloproteinaze matriksa

TGF – transformirajući čimbenik rasta

IL – interleukin

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

LOH – gubitak heterozigotnosti

GH – hormon rasta

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

GHRH – oslobađajući čimbenik hormona rasta

## **1. UVOD**

### **1. 1. Karcinom bronha i pluća**

#### **1. 1. 1. Definicija**

Naziv karcinom bronha i pluća koristi se za zloćudne tumore koji nastaju iz stanica dišnog epitela (bronha, bronhiola i alveola). Karcinom bronha i pluća najučestalija je lokalizacija maligne bolesti u muškaraca, a pri vrhu je učestalosti i u žena. Također, karcinom pluća i bronha vodeći je uzrok smrti među svim karcinomima.

#### **1. 1. 2. Epidemiologija**

Krajem 19. i početkom 20. stoljeća karcinom pluća bio je rijetka bolest. Brz porast incidencije počinje dvadesetih godina prošloga stoljeća i od tada se udvostručava svakih petnaest godina. Tako brz porast incidencije objašnjava se relativnim, ali i apsolutnim porastom. Relativni porast zabilježen je zbog povećane osjetljivosti i specifičnosti dijagnostičkih testova, pojačane zainteresiranosti za tu lokalizaciju karcinoma, starenja populacije te nastanka registara. U Hrvatskoj je karcinom bronha i pluća najčešće sjelo raka u muškaraca, a u žena je na trećem mjestu. Rizik obolijevanja za dob između 30 – 74 godine za muškarce je oko 14%, a za žene nešto manji od 10%. Bolest se najčešće javlja iza četrdesete godine života, i to u pušača. Vrhunac incidencije je između 55 i 60 godina života. U Europi je 1990. godine zabilježeno 150 000 novih slučajeva karcinoma pluća u muškaraca, što čini 22% svih slučajeva raka, te 29% svih smrti uzrokovanih malignim bolestima. U žena karcinom pluća čini 5% svih karcinoma, a odgovoran je za oko 9% svih smrti uzrokovanih karcinomima u žena. U Sjedinjenim Američkim Državama karcinom pluća vodeći je uzrok smrti među malignim tumorima, od 1957. godine u muškaraca, a od 1987. g. i u žena, a svake godine od karcinoma pluća oboli 93 000 muškaraca, te 80 000 žena, od kojih 86% umre unutar 5 godina od postavljanja dijagnoze. Karcinom pluća je u Sjedinjenim Američkim Državama vodeći uzrok smrtnosti od karcinoma, čineći 28%



svih smrti uzrokovanih karcinomima (32% u muškaraca, 25% u žena). Rano otkrivanje nije uspješno jer se simptomi često javljaju tek kod uznapredovale bolesti. Zbog toga je preživljenje bolesnika kratko. Ukupno petogodišnje preživljenje je oko 14% za sve tipove i stadije bolesti. Petogodišnje preživljenje se udvostručilo u zadnjih 30 godina no još uvijek su rezultati preživljenja loši. U Hrvatskoj se primjećuje značajan porast incidencije i mortaliteta za oba spola u zadnjih trideset godina prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (Tablica 1. 1.).

**Tablica 1.1.** Broj oboljelih i umrlih od primarnog karcinoma pluća u Hrvatskoj

**broj oboljelih**

| godina | broj (M+Ž)      | stopa/100000 |
|--------|-----------------|--------------|
| 1969.  | 1121 (961+160)  | 25,6         |
| 1979.  | 1906 (1644+262) | 41,4         |
| 1989.  | 2532 (2149+383) | 54,0         |
| 1998.  | 2660 (2211+449) | 55,6         |
| 2002.  | 2908 (2334+574) | 61,2         |

**broj umrlih**

| godina | broj (M+Ž)      | stopa/100000 |
|--------|-----------------|--------------|
| 1969.  | 916 (792+124)   | 20,7         |
| 1979.  | 1628 (1413+215) | 35,4         |
| 1989.  | 2195 (1848+347) | 45,9         |
| 1998.  | 2569 (2095+474) | 53,7         |
| 2002.  | 2597 (2102+495) | 55,3         |

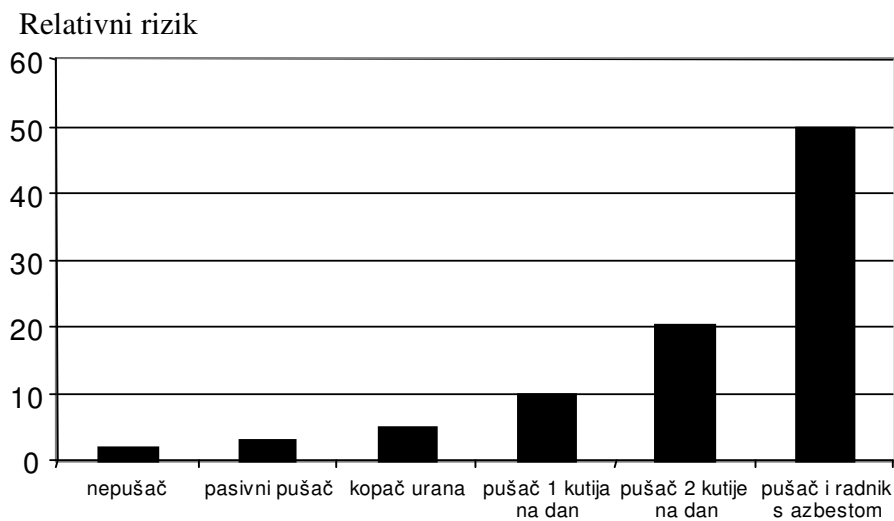
(Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo)

**1. 1. 3. Etiologija**

Etiologija karcinoma pluća kao i većine ostalih malignih bolesti je nepoznata. Smatra se da na razvoj bolesti utječu brojni čimbenici. Najznačajnija povezanost dokazana je između pušenja cigareta i karcinoma pluća i bronha. Tijekom inhaliranja cigaretnog dima u pluća ulaze brojni karcinogeni i promotori tumorskog rasta. Veza između cigaretnog dima i karcinoma pluća spomenuta je prvi puta još 1940. godine, a epidemiološki

dokazana 1964. godine (1) te kasnije u brojnim epidemiološkim studijama potvrđena (2). U Europi 36% pučanstva starijeg od 15 godina puši. Za buduća kretanja morbiditeta i mortaliteta od karcinoma pluća važna je činjenica da je pušenje više prisutno u mlađim dobnim skupinama, pa se i karcinom pluća sve češće dijagnosticira u mlađim dobnim skupinama. Kretanje incidencije i mortaliteta od raka pluća najbolje odražavaju podaci o raširenosti pušenja u pučanstvu: Sjedinjene Američke Države su smanjile pušenje u osoba starijih od 18 godina sa 42% u 1965. godini na 26% u 1992. godini, a istodobno je došlo i do smanjenja mortaliteta od karcinoma pluća. Dim cigarete identificiran je kao glavni rizični čimbenik za razvoj svih češćih histoloških tipova karcinoma pluća i bronha: karcinoma malih stanica, planocelularnog karcinoma, karcinoma velikih stanica te adenokarcinoma. Rizik se povećava 10 – 20 puta u aktivnih pušača. Ali i 1,5 puta u pasivnih. Sam rizik za razvoj karcinoma pluća ovisi o broju popušanih cigareta na dan, dobi u kojoj je osoba počela pušiti te o duljini pušenja. Obično se broj popušanih cigareta izražava u „pack/years“ (hrv. kutija/godina). Tim brojem određen je i broj popušanih cigareta na dan te duljina pušenja. Izračunava se tako da se broj cigareta popušanih na dan pomnoži sa brojem godina pušenja te se umnožak podijeli sa dvadeset. Tako da osoba sa pack/years 40, odnosno osoba koja puši 40 cigareta na dan tijekom 20 godina ima 60 – 70 puta veći rizik za razvoj karcinoma pluća od nepušača. Rizik nakon prestanka pušenja ostaje povišen i do 15 godina nakon prestanka pušenja i više nikada se ne izjednačava s rizikom u osoba koje nikada nisu pušile. Povećanje incidencija karcinoma pluća u žena također je povezano s pušenjem. Žene imaju veći relativni rizik za istu izloženost cigaretnom dimu nego muškarci (oko 1,5 puta). Karcinom pluća u nepušačica češće se razvija nego u nepušača. Spolom uzrokovanu razliku objašnjava se povećanom osjetljivošću žena na karcinogene. Cigaretni dim sadrži preko 4000 kemijskih sastojaka, od kojih su neki kancerogeni. Cigaretni dim nije povezan samo s karcinomom pluća, već i sa karcinomom larinksa, jednjaka, gušterače i mokraćnog mjehura. Kao rizični čimbenik spominje se i postojanje prijašnje, nemaligne bolesti pluća, primjerice KOPB – a. Pušači koji imaju i KOPB imaju dodatno povećan rizik 4 – 6 puta od pušača bez KOPB – a. Taj rizik ostaje povećan i nakon prestanka pušenja. Hormoni također mogu utjecati na razvoj karcinoma pluća, prije svega na razvoj adenokarcinoma. Rizik za razvoj karcinoma pluća veći je u žena koje uzimaju ili su tijekom života uzimale

estrogene. Osim u dimu cigarete, brojni kancerogeni nalaze se u zraku oko nos. Ti kancerogeni potječu iz ispušnih plinova automobila, industrije, te termoelektrana. Tako je incidencija karcinoma pluća povećana u područjima sa većom zagađenošću zraka. Postoji i jasna povezanost između karcinoma pluća i azbesta. Povećan rizik javlja se obično nakon 20 ili više godina nakon izloženosti azbestu. Brojni čimbenici iz okoliša kao što su arsen, klorometil eteri, nikal, krom, kositar, formaldehid, nafta te vinil – klorid također se povezuju sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća. Prehrana također utječe na razvoj karcinoma pluća. Tako prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama i kolesterolom, a s malo voća i povrća koje sadrži vitamine A, C i E, zatim  $\beta$  – karoten, selen i cink također povećava rizik za razvoj karcinoma pluća. Za nepušače, najznačajniji čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća je izloženost radonu. Radon nastaje raspadom urana te se nalazi u okolišu. Na slici 1. 1. prikazani su relativni rizici za razvoj karcinoma pluća.



**Slika 1. 1.** Relativni rizik za razvoj karcinoma pluća

## 1. 1. 4. Podjela karcinoma bronha i pluća

Karcinom pluća može se podijeliti na više načina. Najznačajnije su histološka i klinička podjela. Histološki podjela karcinoma pluća prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (3) prikazana je u tablici 1. 2.

**Tablica 1. 2.** Histološka klasifikacija karcinoma bronha i pluća (WHO 1999)

---

|  |  |
|--|--|
| <b>1. karcinom pločastih stanica</b><br>varijante:<br>papilarni<br>svijetlih stanica<br>malih stanica<br>bazaloidnih stanica | <b>4. karcinom velikih stanica</b><br>varijante:<br>neuroendokrini velikih stanica<br>bazaloidni<br>limfoepiteliomu sličan<br>svijetlih stanica<br>sa rabdoidnim fenotipom |
| <b>2. karcinom malih stanica</b><br>varijanta:<br>kombinirani malih stanica  | <b>5. adenopločasti karcinom</b>   |
| <b>3. adenokarcinom</b><br>acinarni<br>papilarni<br>bronhioloalveolarni<br>solidni sa stvaranjem sluzi<br>miješani           | <b>6. karcinomi sa pleomorfim, sarkomatoidnim ili sarkomatoznim elementima</b>   |
|  | <b>7. karcinoid</b>  |
|  | <b>8. karcinomi bronhalnih žlijezda</b><br>adenoid-cistični karcinom<br>mukoepidermoidni karcinom  |
|  | <b>9. neklasificirani karcinom</b>   |

---

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO) četiri najčešća histološka tipa čine 96% svih primarnih neoplazmi pluća. To su: karcinom malih stanica, adenokarcinom, karcinom pločastih stanica te karcinom velikih stanica. Ostalih 5% čine karcinoid, karcinomom bronhalnih žlijezda i ostali rjeđi tipovi karcinoma. Od drugih malignih tumora u plućima se mogu naći primarni limfom te sarkom pluća. Najčešći histološki tip je adenokarcinom, koji se javlja u 35% svih karcinoma pluća. Adenokarcinom čini glavninu karcinoma pluća u bolesnika koji nisu nikada pušili, u žena te u mlađim dobnim skupinama (< 45 godina). Uglavnom se javlja kao periferna tvorba. Bronhioloalveolarni karcinom je podtip karcinoma pluća.

Planocelularni karcinom pluća javlja se u 30% slučajeva. Pokazuje visoku povezanost sa pušenjem, a obično nastaje centralo tako da se obično manifestira simptomima bronhopneumonije. U posljednjih 25 godina, iz nepoznatih razloga, adenokarcinom je zamijenio planocelularni karcinom kao najčešći histološki tip karcinoma bronha i pluća. Karcinom velikih stanica često je slabo diferenciran, a javlja se u oko 10% slučajeva, a karcinom malih stanica (još se naziva mikrocelularni) javlja se u oko 20% slučajeva. Povezuje se s pušenjem, ima tendenciju rasta u blizini velikih dišnih putova i krvnih žila uz često prisutnu limfadenopatiju. To je oblik karcinoma pluća koji ima jaku sklonost metastaziranju i razvijanju paraneoplastičkog sindroma. Karcinom malih stanica rano metastazira, pa su u trenutku otkrivanja često prisutne udaljene metastaze.

Osim kliničke podjele u svakodnevnom kliničkom radu više se koristi klinička podjela karcinoma bronha i pluća. Klinička podjela nastala je u terapijske i prognostičke svrhe, a razlikuje: karcinom malih stanica (engl. small cell lung cancer, SCLC), karcinom nemalih stanica (engl. non – small cell lung cancer, NSCLC) i ostale karcinome, od kojih su najčešći karcinoid i karcinomi bronhalnih žlijezda. Klinička podjela karcinoma bronha i pluća prikazana je u tablici 1. 3.

**Tablica 1. 3.** Klinička podjela karcinoma bronha i pluća

| <b>tip</b>                      | <b>incidencija (%)</b> |
|---------------------------------|------------------------|
| <b>karcinom malih stanica</b>   | <b>20</b>              |
| <b>karcinom nemalih stanica</b> | <b>75</b>              |
| adenokarcinom                   | 35                     |
| karcinom pločastih stanica      | 30                     |
| karcinom velikih stanica        | 10                     |
| <b>ostali</b>                   | <b>5</b>               |
| karcinoid                       |                        |
| adenoid-cistični karcinom       |                        |
| mukoepidermoidni karcinom       |                        |

Karcinom pluća malih stanica je osjetljiv na kemoterapiju i radioterapiju. U bolesnika sa karcinomom pluća malih stanica kirurški zahvat se ne preporuča jer je u vrijeme otkrivanja bolest već proširena ili postoje mikrometastaze. Karcinom pluća nemalih stanica liječi se prvenstveno kirurški u ranijim stadijima bolesti, a kemoterapijom i radioterapijom u uznapredovalim stadijima bolesti.

### **1. 1. 5. Stadiji proširenosti bolesti**

#### **1. 1. 5. 1. Staging karcinoma pluća nemalih stanica**

Prije početka liječenja bolesti, osim određivanja histološkog tipa karcinoma, potrebno je odrediti stadij (engl. staging) tumora: anatomske proširenosti karcinoma, odrediti da li su zahvaćeni limfni čvorovi i da li su prisutne udaljene metastaze. O stupnju proširenosti karcinoma pluća te o histološkom tipu ovisi vrsta terapije. Za određivanje stadija tumora koristimo se TNM klasifikacijom prema Međunarodnom staging sustavu (eng. International Staging System, ISS) (4). Oznaka T odnosi se na primarni tumor, N na regionalne limfne čvorove, a M na udaljene metastaze. TNM klasifikacija prikazana je u tablici 1. 4. Izrazito važno je prije početka liječenja dobro procijeniti da li su prisutne udaljene metastaze te točno odrediti status regionalnih limfnih čvorova. Zbog toga je napravljena klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (5) koja je kompatibilna sa međunarodnim staging sustavom (ISS). Klasifikacija je pogodna za klinički, kirurški i patološki staging. Mapirano je ukupno 14 regionalnih limfnih čvorova podijeljenih prema lokaciji na hilarne, intrapulmonalne i mediastinalne limfne čvorove. Limfni čvorovi od 1 – 9 pripadaju u N2 skupini, dok limfni čvorovi od 10 – 14 pripadaju u skupinu N1. Stadiji karcinoma pluća prikazani su u tablici 1. 5.

**Tablica 1. 4.** Oznake za primarni tumor, metastaze u regionalne limfne čvorove i udaljene metastaze prema ISS stupnjevanju (International Staging System)

|  |   |
|--|---|
| <b>primarni tumor (T)</b>                            |   |
| <b>T0</b>  | Nema jasnog primarnog tumora  |
| <b>TX</b>  | Skriveni tumor koji se nađe citološki u bronhalnom sekretu, ali se ne vidi radiološki ili fiberbronhoskopijom   |
| <b>TIS</b>   | Carcinoma in situ   |
| <b>T1</b>  | Tumor ≤ 3 cm u najvećoj dimenziji okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopski jasnog širenja proksimalno od lobarnog bronha (Rijedak površinski tumor s invazivnom komponentom ograničenom prema stijenci bronha koji se širi prema glavnom bronhu klasificira se kao T1)  |
| <b>T2</b>  | Tumor >3 cm u najvećoj dimenziji, ili tumor bilo koje veličine koji zahvaća visceralnu pleuru ili je udružen s atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi prema hilarnoj regiji. Bronhoskopski, proksimalno tumor može biti unutar lobarnog bronha ili najmanje 2 cm distalno od karine. Pridružena atelektaza ili opstruktivni pneumonitis ne smiju zahvaćati cijelo pluće.              |
| <b>T3</b>  | Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem u stijenku prsnog koša (uključujući tumore gornjeg sulkusa), dijafragmu, medijastinalnu pleuru ili perikard bez zahvaćanja srca, velikih krvnih žila, traheje, jednjaka i kralješnice, ili tumor u glavnom bronhu unutar 2 cm od karine bez zahvaćenosti karine, ili pridružena atelektaza ili opstruktivni pneumonitis koji zahvaćaju cijelo pluće       |
| <b>T4</b>  | Tumor bilo koje veličine s prodorom u medijastinum koji zahvaća srce, velike krvne žile, traheju, jednjak, kralješnicu ili karinu ili izaziva maligni pleuralni ili perikardijalni izljev (Pleuralni izljevi u kojima nema krvi, koji nisu eksudati i nemaju citološki dokaz malignih stanica u izljevu, ne mogu se smatrati malignim pa se tumor klasificira se kao T1, T2 ili T3 isključujući izljev) |
| <b>metastaze u regionalnim limfnim čvorovima (N)</b> |   |
| <b>N0</b>  | Ne nalaze se metastaze u regionalnim limfnim čvorovima  |
| <b>N1</b>  | Metastaze u peribronhalne limfne čvorove ili u ipsilateralne limfne čvorove hilusa, ili oboje, uključujući direktno širenje   |
| <b>N2</b>  | Metastaze u ipsilateralne limfne čvorove medijastinuma ili u supkarinalne limfne čvorove  |
| <b>N3</b>  | Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim, kontralateralnim hilarnim te ipsilateralnim ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima  |
| <b>udaljene metastaze (M)</b>                        |   |
| <b>M0</b>  | nema udaljenih metastaza  |
| <b>M1</b>  | prisutne udaljene metastaze (uključujući tumorske čvorove u ipsilateralnim plućnim režnjevima koji nisu sijelo primarnog tumora)  |

**Tablica 1.5.** Stadiji karcinoma prema TNM klasifikaciji

|                    |                   |          |          |          |
|--------------------|-------------------|----------|----------|----------|
| <b>stadij 0</b>    | carcinoma in situ |          |          |          |
| <b>stadij IA</b>   | T1 N0 M0          |          |          |          |
| <b>stadij IB</b>   | T2 N0 M0          |          |          |          |
| <b>stadij IIA</b>  | T1 N1 M0          |          |          |          |
| <b>stadij IIB</b>  | T2 N1 M0          |          |          |          |
| <b>stadij IIIA</b> | T3 N1 M0          | T1 N2 M0 | T2 N2 M0 | T3 N2 M0 |
| <b>stadij IIIB</b> | T4 N0 M0          | T4 N1 M0 | T4 N2 M0 | T4 N3 M0 |
|                    | T1 N3 M0          | T2 N3 M0 | T3 N3 M0 |          |
| <b>stadij IV</b>   | svaki T           | svaki N  | M1       |          |

### **1. 1. 5. 2. 'Performance' status**

Nakon selekcije bolesnika prema histološkom tipu karcinoma i stadiju proširenosti bolesti, potrebno je procijeniti opće stanje bolesnika kako bi se procijenila sposobnost bolesnika da podnese razne oblike antitumorskog liječenja. Ta procjena je podložna subjektivnom čimbeniku, stoga se danas koriste standardizirane klasifikacije kao što je Karnofsky skala ili ECOG skala (6).

### **1. 1. 6. Klinička slika**

Samo 5 – 15% bolesnika otkriva se u asimptomatskoj fazi bolesti, a u ostalih se registriraju simptomi koji se dijele na nespecifične, specifične dišne, intratorakalne, metastatske i paraneoplastičke. Nespecifični simptomi su umor, anoreksija, gubitak na težini, slabost te povišena temperatura. Ti simptomi obično se javljaju uz uznapredovalu bolest te nisu specifični za karcinom pluća. Specifični dišni simptomi najizraženiji su kod centralno smještenih tumora. Najčešće se javljaju kašalj, hemoptize, recidivirajuće pneumonije iste lokalizacije, zaduha te bol. Intratorakalni simptomi nastaju ratom i metastaziranjem unutar struktura toraksa. Može se javiti Pancoastov sindrom, Hornerov sindrom, sindrom gornje šuplje vene, paraliza nervusa rekurensa i frenikusa te pleuralni izljev. Metastaze izvan toraksa u bolesnika sa karcinom pluća su česte, posebice u bolesnika sa karcinomom pluća malih stanica. Karcinomske stanice mogu metastazirati hematogeno i limfogeno. Metastaze mogu zahvatiti bilo koji organ ili organski sustav. Najčešće su zahvaćeni jetra, nadbubrežne žlijezde, kosti, mozak, udaljeni limfni čvorovi te koštana srž. Paraneoplastički sindrom u bolesnika sa karcinom pluća obuhvaća brojne simptome i sindrome. U tu skupinu pripadaju simptomi i sindromi bolesnika sa karcinom pluća, a koji se ne mogu direktno povezati sa primarnim tumorom ili metastazama. Najčešće manifestacije paraneoplastičkog sindroma navedene su u tablici 1. 6.



**Tablica 1. 6.** Najčešće manifestacije paraneoplastičkog sindroma u bolesnika s karcinomom pluća

| sustav          | paraneoplastički sindrom   | sustav    | paraneoplastički sindrom   |
|-----------------|--|-----------|--|
| koštano-mišićni | hipertrofična osteoartropatija<br>osteomalacija<br>polimiozitis<br>miopatija   | živčani   | Lambert-Eatonov sindrom<br>periferna neuropatija<br>encefalopatija<br>mijelopatija<br>psihoza<br>demencija   |
| koža            | batičasti prsti<br>dermatomiozitis<br>skleroderma<br>acanthosis nigrans<br>pruritus<br>erythema multiforme<br>hiperpigmentacija<br>urtikarija                      | krvožilni | nebakterijski trombotički<br>endokarditis<br>trombocitoza<br>eozinofilija<br>politemija<br>anemija<br>pancitopenija<br>disproteinemija<br>hiperkoagulabilnost<br>tromboflebitis<br>flebotromboza |
| endokrini       | Cushingov sindrom<br>sindrom neadekvatne sekrecije<br>ADH<br>hiperkalcemija<br>karcinoidni sindrom<br>hipoglikemija/hiperglikemija<br>ginekomastija<br>galaktoreja | razni     | kaheksija<br>nefrotski sindrom<br>hiperuricemija   |

### 1. 1. 7. Dijagnostički postupci

Bolesnici s karcinomom pluća najčešće se javljaju liječniku sa već uznapredovalom bolesti. Bez obzira na danas dostupne dijagnostičke testove i postupke, u gotovo 70% bolesnika prođe šest ili više mjeseci od pojave prvih simptoma do postavljanja dijagnoze. Dijagnoza počinje anamnezom i fizikalnim pregledom. Slijedeći korak je osnovna laboratorijska obrada. Temeljna dijagnostika maligne bolesti je histološka ili citološka. Obično se dijagnostika počinje citološkom analizom iskašljaja. Daljnja dijagnostička pretraga je bronhoskopija bronhalnog stabla. Tijekom bronhoskopije potrebo je pregledati cijelo bronhalno stablo, obratiti pažnju na tvorbe koje prominiraju u lumen, ekstraluminalnu kompresiju, promjene sluznice traheobronhalnog stabla. Tijekom same bronhoskopije uzima se materijal za citološku, histološku i mikrobiološku analizu. Po postavljanju histološke ili citološke dijagnoze potrebno je utvrditi i proširenost same bolesti (inatratorakalna proširenost i udaljene metastaze) te odrediti opće stanje bolesnika kako bi se procijenilo da li bolesnik može podnijeti predviđeni oblik antitumorskog

liječenja. Postupci za postavljanje dijagnoze, procjenu proširenosti bolesti te za procjenu funkcije dišnog i kardiovaskularnog sustava navedenu su u tablici 1. 7.

**Tablica 1. 7.** Dijagnostički postupci kod karcinoma bronha i pluća

---

**postupci za postavljanje dijagnoze**

---

anamneza i fizikalni pregled  
KKS, SE  
koagulacijski testovi  
kompletna biokemija  
tumorski markeri  
citološka analiza iskašljaja  
Rtg snimka pluća (PA i profilna snimka, po potrebi tomogrami ili CT)  
bronhoskopija s aspiracijom, brisom četkicom i biopsijom  
alternativne pretrage:  
transtorakalna punkcija promjena u plućima  
punkcija pleuralnog izljeva  
punkcija ili biopsija uvećanih limfnih čvorova  
torakotomija i biopsija (izuzetno rijetko)

---

**postupci za procjenu proširenosti bolesti**

---

CT toraksa  
CT abdomena ili ultrazvuk abdomena  
scintigrafija kosti ako su prisutni simptomi ili sumnja na metastaze  
Rtg kosti ako su prisutni simptomi ili patološki scintigrafski nalaz  
CT mozga kod adenokarcinoma sa zahvaćenim limfnim čvorovima,  
kod raka pluća malih stanica te ako su prisutni simptomi  
moždanih metastaza  
punkcija pleuralnog izljeva  
punkcija ili biopsija uvećanih limfnih čvorova  
alternativne pretrage:  
PET  
medijastinoskopija  
punkcija koštane srži

---

**postupci za procjenu funkcije respiracijskog sustava i mogućnosti resekcije pluća**

---

spirometrija  
analiza plinova u art. krvi i acidobazni status  
određivanje difuzijskog kapaciteta pluća za CO  
EKG  
ultrazvuk srca  
alternativne pretrage:  
scintigrafija pluća (ventilacijska i perfuzijska)  
test opterećenja  
određivanje tlakova u plućnoj arteriji

---

## 1. 1. 8. Liječenje karcinoma pluća i bronha

Liječenje karcinoma pluća sastoji se od četiri skupine terapijskih postupaka. U prvoj je kirurški zahvat, koji pruža najveće izgleda za ozdravljenje. U drugoj su skupini terapija zračenjem, kemoterapija i njihove kombinacije, uz napomenu da se tim postupcima postiže poboljšanje kvalitete i produženje života. U trećoj skupini je imunoterapija, dok u četvrtu skupinu pripadaju novi terapijski modaliteti nazvani ciljna antitumorska terapija. Zasebnu skupinu čine raznovrsni postupci liječenja usmjereni na ublažavanje i uklanjanje simptoma bolesti. Kirurško liječenje obuhvaća radikalne, palijativne i rekonstrukcijske zahvate. Pod pojmom radikalnosti misli se na odstranjenje vidljivog tumora do u zdravo tkivo. Je li zahvat doista bio radikal, moguće je ocijeniti tek nakon preživljenja pet godina ili duže. Kirurško izlječenje moguće je u I i II stadiju karcinoma nemalih stanica. U stadijima sa N2 propagacijom uglavnom se postižu palijativni rezultati, iako je pristup svakom bolesniku individualan. Tijekom kirurškog zahvata moraju se pretražiti i histološki ili citološki verificirati limfni čvorovi hilusa i medijastinuma. To je potrebno za definitivno određivanje stadija proširenosti bolesti, utvrđivanje opsega kirurškog zahvata te planiranje daljnjih dijagnostičkih i terapijskih postupaka. Lobektomija ima prednost kao pošteniji zahvat za očuvanje zdravog plućnog parenhima, što je posebno važno u starijih osoba i bolesnika sa KOPB. Pulmektomija pruža veću mogućnost da se resecira što je moguće dalje od samog tumora i da se odstrani limfni optok pluća, međutim, uz ove prednosti ona nosi i veći operativni rizik za bolesnika. Cilj palijativnih kirurških zahvata je maksimalno odstranjenje tumorske mase i limfnih čvorova prožetih karcinomom, što omogućava naknadnoj terapiji zračenjem ili kemoterapiji veće izgleda za uništenje rezidualnog tumora. Palijativnim zahvatima pristupa se i u vitalnim indikacijama kao što su hemoptoa, velika tumorska masa s raspadom i bronhoezofagealna fistula. Opća operativna smrtnost je malena, oko 2% u bolesnika sa lobektomijom, a 5-7% kod pulmektomije. Najčešće komplikacije koje prate kirurški zahvat i mogu uzrokovati smrtni ishod su krvarenje, respiracijska insuficijencija, pneumonija, bronhopleuralna fistula, empijem, plućna embolija, te infarkt miokarda i maligne aritmije. Karcinom pluća nije u cjelini radiosenzibilan, ali ni radiorezistentan tumor. Epidermoidni, adenokarcinom te karcinom velikih stanica slabo su radiosenzibilni, dok je

mikrocelularni izrazito osjetljiv. Međutim, osjetljivost na terapiju zračenjem nije uvijek jednaka, jer je u pojedinom histološkom tipu ovisna o zrelosti stanica. Jednako tako, poznato je da tumori nisu u svim slučajevima građeni homogeno od iste vrste stanica, već postoje razlike koje uvjetuju i različitu osjetljivost njihovih dijelova na zračenje. Danas se istražuju mogućnosti povećanja osjetljivosti tumora na zračenje (radiosenzibilizatori), kao i radioprotektivne zaštite zdravog tkiva. Velika se pažnja posvećuje veličini ozračenog plućnog parenhima i drugih organa u toraksu. Sindrom postiradijacijskog pneumonitisa i fibroze proporcionalan je dozi i obuhvatu plućnog parenhima. Predoperativno rijetko primjenjujemo zračenje uz izuzetak Pancoastovog sindroma. Bolesnici sa velikom tumorskom masom, pleuralnim izljevom, srčanom dekompenzacijom, i težim ispadima respiracijske funkcije nisu prikladni za terapiju zračenjem. Posebno se zrače udaljene metastaze u kostima. Kemoterapija neoplazmi nije selektivna jer se uz uništenje stanica tumora neizbježno događaju oštećenja zdravog tkiva. Najveći teret kemoterapije pada na tkiva koja se učestalo obnavljaju (koštana srž, limfno tkivo, crijevna sluznica, folikuli dlaka, zametni epitel). Većina citostatika djeluje toksično na stanice koje su u diobenom ciklusu, a slabije na one koje su se privremeno ili trajno prestale dijeliti. Neosjetljivost tumora na citostatike nastaje tako što lijek uništi sve osjetljive stanice, a iz preostalih, rezistentnih, poraste nova tumorska masa ili se pojedine tumorske stanice u kontaktu s lijekom prilagode djelovanju citostatika i postaju otporne na tu vrstu terapije. Stoga se u liječenju kombinira nekoliko citostatika različitog mehanizma djelovanja čime se povećava učinkovitost terapije. Na početku liječenja nastoji se postići inicijalno smanjenje tumorske mase (indukcijska terapija), zatim učvrstiti postignuti terapijski učinak (konsolidacija) te konačno što dulje zadržati postignutu remisiju (terapija održavanja). Kod progresije primjenjuje se alternativni režim, to jest nova shema polikemoterapije. Terapija se primjenjuje u intervalima (ciklusima), obično svaka 3 tjedna, a dužina liječenja je varijabilna i individualno prilagođena. Učinak terapije procjenjuje se stupnjem regresije tumorske mase (potpun odgovor-nestanak svih postojećih lezija; djelomičan odgovor-redukcija tumorske mase za 50% bez pojave novih lezija; bez odgovora-nema promjene u veličini lezije ili je regresija manja od 50%; progresija-porast lezije). Najvažniji element procjene učinkovitosti kemoterapije je petogodišnje preživljenje uz ocjenu kvalitete života. Da se olakša

podnošljivost i smanje toksični učinci kemoterapije, uz aplikaciju citostatika primjenjuju se antiemetici, kortikosteroidi i obilna hidracija.

Imunoterapija počiva na primjeni monoklonalnih antitijela koja su usmjerena protiv tumor specifičnih antigena. Vezanjem antitijela za tumorski antigen dolazi do aktivacije sustava komplementa, a u manjoj mjeri i do aktivacije citotoksičnih limfocita, pa jedno i drugo dovodi do selektivnog uništavanja tumorskih stanica. Specifične imunoterapije su u fazi kliničkih istraživanja.

U skupinu ciljane antitumorske terapije pripadaju specifična protutijela koja se vežu na receptore za razne faktore rasta, te inhibitori angiogeneze (7). Primjer antitijela protiv receptora za faktore rasta su specifična protutijela koja blokiraju receptor za epidermalni faktor rasta su gefitinib (8) i erlotinib (9) koji su već našli mjesto u kliničkoj primjeni. Inhibitori angiogeneze, odnosno inhibitori vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) su trenutno u fazi istraživanja (10).

## **1. 2. Molekularna biologija karcinoma pluća**

U patogenezi karcinoma pluća, kao i u ostalim solidnim tumorima, brojne promjene u biološkim regulatornim putovima imaju značajnu ulogu. U posljednjih nekoliko godina brojna bazična i klinička istraživanja dovela su do značajnog poboljšanja u razumijevanju tih bioloških mehanizama od kojih su najznačajniji: genetske promjene, epigenetske promjene, autokrini stimulacija rasta, imunosupresija najvjerojatnije uzrokovana samim tumorom, te poremećaji u angiogenezi. Razumijevanje navedenih bioloških mehanizama, te pronalazak bioloških markera koji sudjeluju u njima, nisu samo važni za razumijevanje patogeneze karcinoma pluća, već bi mogli upućivati na prognozu i odabir odgovarajuće terapije. Naime, utjecajem na molekule koje sudjeluju u patogenezi karcinoma moguće je utjecati i na sam razvoj tumora, te na taj način usporiti, ili čak potpuno prekinuti tumorski rast. Velik broj molekula koje sudjeluju u patogenezi karcinoma pluća je do sada pronađen, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila njihova klinička značajnost.

## **1. 2. 1. Proto – onkogeni i geni supresori tumora**

### **1. 2. 1. 1. K – ras**

Mutacije u ras onkogenu nađene su u oko 20 – 30% karcinoma pluća nemalih stanica (11), uglavnom adenokarcinoma (12). Te mutacije nađene su primarno u kodonu 12 koji sadrži oko 85% mutacija, no mutacije se mogu naći i u kodonu 13 i 61 (13). Mutacije u ras proto – onkogenu povezane su sa pušenjem (14). Prisutnost ras mutacije povezana je sa lošijom prognozom u bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica (12, 15, 16).

### **1. 2. 1. 2. p53**

Ključnu ulogu u stabilizaciji genoma ima gen supresor tumora p53 - transkripcijski faktor koji aktivira ekspresiju gena koji kontroliraju stanični ciklus, apoptozu, popravak DNA i angiogenezu. Mutacija p53 nađena je u mnogim karcinomima, tako i u karcinomu pluća. Mutacije i delecije u p53 nađene u oko 90% karcinom pluća malih stanica, te u oko 50% karcinoma pluća nemalih stanica (17, 18, 19, 20, 21). Mutacija p53 ima negativnu prognostičku vrijednost u adenokarcinomu pluća (22), a pokazalo se da prisutnost mutacije p53 može upućivati na učinkovitost kemoterapije temeljene na platini (23), jednako kao i na učinkovitost radioterapije (24). Taksani i vinkalkaloidi su se pokazali posebno učinkoviti u bolesnika se mutacijom p53, a neučinkoviti u bolesnika s karcinom pluća nemalih stanica, ali bez mutacije u p53 (25). S druge strane, najveća učinkovitost kemoterapijskih protokola temeljenih na platini dokazana je u bolesnika bez mutacije u p53 (26). Ta otkrića objašnjavaju neučinkovitost pojedinih protokola kemoterapije u bolesnika s karcinomom pluća.

### **1. 2. 1. 3. Retinoblastoma gen (Rb gen)**

Retinoblastoma gen je uključen u kontrolu staničnog ciklusa. Izostanak aktivacije ovog gena inicijalno je pronađena u retinoblastomu, po čemu je gen i dobio ime. U bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica inaktivan gen je nađen u 20-30% bolesnika (27, 28),

dok je u karcinomu pluća malih stanica inaktivan gen nađen u čak 90% slučajeva (29, 30). Međutim, prognostički značaj prisutnosti inaktiviranog retinoblastoma gena nije u potpunosti jasna. Vjerojatno je značajnija uloga retinoblastoma gena zajedno sa ostalim biološkim markerima (30).

#### **1. 2. 1. 4. p16<sup>INK4α</sup>, ciklin-ovisna kinaza (CDK)**

Gen supresor tumora p16, u bliskoj je interakciji s Rb genom. Proto - onkogen p16 je inhibitor ciklin-ovisne kinaze, osobito CDK4 i CDK6 koji inaktiviraju Rb gen fosforilacijom. Tako p16 osigurava funkciju Rb gena. Kao posljedica, inaktivacija p16 dovodi do stalne fosforilacije Rb gena i posljedično, gubitka njegove kontrole rasta stanice. Inaktivacija p16 točkastom mutacijom, delecijom ili metilacijom nađena je u 40-70% karcinoma pluća nemalih stanica (31,32). Ciklin D1 i ciklin - ovisna kinaza 4 koče aktivnost Rb gena putem fosforilacije. Ciklin D1 je prekomjerno izražen u oko 30% karcinoma pluća nemalih stanica što je povezano s lošijom prognozom karcinoma pluća u ranijim stadijima (33).

#### **1. 2. 1. 5. p27/Kip**

p27/Kip je inhibitor ciklin-ovisne kinaze koja utječe na aktivnost nekoliko ciklin/CDK kompleksa. Smanjena ekspresija p27 primijećena je u preko 80% karcinoma pluća nemalih stanica (34). Niske vrijednosti p27 su predskazatelj loše prognoze, posebice u bolesnika koji su kirurški liječeni (35). Bolesnici s negativnim p27 imaju veću vjerojatnost metastaziranja u limfne čvorove (36). Stupanj ekspresije p27 može predvidjeti odgovor na kemoterapiju temeljenu na platini, kao i na učinkovitosciljane terapije s gefitinibom ili trastuzumabom (37, 38).

#### **1. 2. 2. Geni za β - tubulin**

Rezistencija na taksane se povezuje s mutacijom u veznim domenama β - tubulina u egzonomima 1 i 4 (39). Smatra se da ta mutacija onemogućava interakciju citostatika i

tubulina. Oko 30% bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica ima mutaciju u genu za  $\beta$  - tubulin. U tih bolesnika nije došlo do regresije tumora nakon terapije taksanima. Međutim, u bolesnika bez navedene mutacije taksani su bili učinkoviti u skoro 40% bolesnika (39).

### **1. 2. 3. Prekomjerna ekspresija proto-onkogeni i njihovih produkata**

#### **1. 2. 3. 1. erbB1/EGF receptor**

Proto – onkogen erbB1 kodira receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) koji veže ne samo epidermalni čimbenik rasta (EGF), već i TGF $\alpha$  i amfiregulin. U većini uzoraka karcinoma pluća nemalih stanica EGFR i TGF $\alpha$  su zajednički izraženi dok se EGF ne može naći. Prekomjerna ekspresija EGFR nađena je u 45% karcinoma pluća nemalih stanica, a više od 60% karcinoma pluća nemalih stanica pokazuje prekomjernu ekspresiju TGF $\alpha$ . Međutim, prognostička vrijednost ovih markera za sada još nije potpuno poznata (40).

#### **1. 2. 3. 2. erbB2/HER2/neu**

Proto – onkogen erbB2 kodira receptor HER2/neu koji pripada obitelji receptora epidermalnih čimbenika rasta i prekomjerno je izražen u 20 - 30% karcinoma pluća nemalih stanica. Izraženost je jača u adenokarcinomu nego u karcinomu pločastih stanica (41). Prekomjerna ekspresija HER2 i c-erbB2 povezana je s lošijom prognozom u bolesnika s karcinomom pluća. Blokada tirozin – kinazne aktivnosti s gefitinibom nije pokazala razliku u učinkovitosti u bolesnika s prekomjernom i normalnom ekspresijom HER2. Ekspresija HER2 je dominantan neovisan prognostički čimbenik u bolesnika nakon resekcija karcinoma pluća ranijih stadija. (42, 43).



### **1. 2.3.3. bcl-2**

Prekomjerna ekspresija bcl-2 nađena je u 20 - 30% karcinoma pluća nemalih stanica. Bcl-2 inhibira apoptozu. Fosforilacija bcl-2 kođi njegovu funkciju te na taj naćin dovodi do apoptoze. Taksani i vinkalkaloidi dovode do fosforilacije bcl-2 pa tako potiću apoptozu karcinomskih stanica. (44,45).

### **1. 2.4. Poremećaj ekspresije ćimbenika rasta i njihovih receptora**

#### **1. 2.4.1. Ćimbenik rasta hepatocita (HGF)**

Ćimbenika rasta hepatocita (HGF) stimulira proliferaciju i normalni bronhalni epitel i karcinomske stanice. c – met protoonkogen izražen je u 72% adenokarcinoma, dok stanice ploćastog karcinoma imaju izraženju deleciju mRNA. Tri izoforme mRNA za HGF i proteini izraženi su u zdravim plućima, ako i u stanicama karcinoma pluća nemalih stanica. Ekspresija HGF u karcinomu povezana se sa lošom prognozom, vjerojatno autokrinim i/ili parakrinim mehanizmima (46, 47, 48).

#### **1. 2.4.2. Ćimbenik matićnih stanica i c-kit**

Ćimbenik matićnih stanica (SCF) proizvodi oko 705 stanićnih linija karcinoma pluća malih stanica. SCF se veže za c-kit onkogen koji je također izražen u oko 70% karcinoma pluća malih stanica. Vjerojatno u karcinomskih stanica postoji autokrini petlja. Moderni inhibitori c-kit tirozin kinaze kao što je STI571 inhibiraju proliferaciju stanica karcinoma pluća malih stanica in vitro. Međutim, klinićki pokusi nisu pokazali korist od inibicije proliferacije (49, 50).

#### **1. 2.4.3. Transformirajući ćimbenik rasta $\beta$ (TGF $\beta$ )**

TGF $\beta$  inhibira proliferaciju normalnih epitelnih i hematopoetskih stanica. Rezistencija na inibiciju proliferacije putem TGF $\beta$  povezana je sa smanjenom ekspresijom tipa II

receptora za TGF $\beta$  u karcinomu pluća malih stanica. Kao posljedica, u karcinomskim stanicama dolazi do prekomjernog stvaranja TGF $\beta$ . TGF $\beta$  također ima i imunosupresivnu aktivnost. Koncentracija TGF $\beta$  u plazmi povezana je s učinkovitošću radioterapije (51, 52).

### **1. 2. 5. Poremećaj imunološkog odgovora kao posljedica tumora**

#### **1. 2. 5. 1. Transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (TGF $\beta$ )**

Velik broj malignih tumora, uključujući i karcinom pluća malih stanica proizvodi TGF $\beta$ . Oko 50% stanica karcinoma pluća malih stanica proizvodi aktivni protein. Stvaranje TGF $\beta$  dovodi do inhibicije imunološkog odgovora na sam tumor. Tumorski TGF $\beta$  inhibira stvaranje i sekreciju citokina, tako da je supresija citokina primijećena u većine bolesnika s karcinomom pluća malih stanica. Poremećaj sekrecije IL-2 povezuje se lošom prognozom, a sam IL-2 je predominantan prognostički čimbenik u karcinomu pluća malih stanica (52, 53).

#### **1. 2. 5. 2. Interleukin – 10 (IL – 10)**

IL – 10 inibira razne putove imunološkog odgovora, uključujući i IL – 2. Brojne tumorske stanice luče IL – 10, a određivanje koncentracije u serumu upućuje na prognozu bolesti te može rano upućivati na progresiju bolesti. U bolesnika s karcinomom pluća malih stanica nađene su povišene koncentracije IL – 10 te snižene koncentracije IL – 2 što se povezuje s lošom prognozom (54, 55).

#### **1. 2. 5. 3. Interleukin – 2 (IL – 2)**

Sekrecija citokina iz imunokompetentnih stanica periferne krvi je selektivno snižena u bolesnika s karcinomom pluća malih stanica. Posebice, nađene su snižene koncentracije IL – 2 i IFN $\gamma$ . Smanjenje tumorske mase nakon kemoterapije dovodi do normalizacije koncentracije citokina što upućuje da terapijske procedure utječu na interakciju tumorskih

stanica i imunološkog sustava. Značajna inhibicija sekrecije citokina ima utjecaj na preživljenje bolesnika s karcinomom. (53).

Također, selektivna supresija sekrecije citokina od strane perifernih limfocita nađena je i u bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica. Supresija IL –2 također je povezana s lošom prognozom tih bolesnika (55).

#### **1. 2. 5. 4. Ciklooksigenaza – 2 (COX-2)**

Tumorske stanice karcinom pluća nemalih stanica proizvode jednako i COX – 2 i prostaglandin E2 (PGE2). Povećana ekspresija COX – 2 povezana je s lošijom prognozom i kraćim preživljenjem bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica, posebice u stadiju I. Vjerojatno je taj učinak također povezan s utjecajem na imunološki sustav. PGE2 potiče stvaranje IL – 10 u limfocitima i makrofagima. Kako je već navedeno, IL – 10 inhibira lučenje IL – 2, ako da PGE2 koji se stvara u karcinomskim stanicama ima značajan imunomodulatorni učinak (56).

#### **1. 2. 6. Poremećaji angiogeneze**

Angiogeneza je proces koji uključuje dijeljenje i proliferaciju endotelnih stanica te migraciju u tkiva s ciljem stvaranja novih kapilara. Angiogeneza je strogo kontrolirani proces koji može biti poremećen pod utjecajem malignih tumora.

##### **1. 2. 6. 1. Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF)**

VEGF pripada skupini najpotentnijih čimbenika rasta endotelnih stanica. Stanice karcinoma pluća nemalih stanica luče VEGF, te je nađena povezanost između ekspresije VEGF i neoangiogeneze. Ekspresija VEGF povezana je s lošijom prognozom u bolesnika s karcinom pluća nemalih i malih stanica. Posebice je nađena povezanost u stadiju I karcinoma pluća nemalih stanica, gdje je ekspresija VEGF povezana s obilnom intratumorskom angiogenezom te lošom prognozom u tih bolesnika. VEGF može se naći

ne samo unutar tumorskog tkiva, već u kasnijim stadijima karcinoma i u plazmi (57, 58, 59).

#### **1. 2. 6. 2. Interleukin – 8 (IL – 8)**

IL – 8 ima brojne pro-inflamatorne učinke te može inducirati angiogenezu. Ekspresija IL – 8 povezana je s vaskularizacijom unutar tumorskog tkiva. Povećana ekspresija IL – 8 mRNA u tumorskim stanicama te povećana koncentracija IL – 8 u serumu povezani su s progresijom tumora, angiogenezom te lošom prognozom (60, 61).

#### **1. 2. 6. 3. Metaloproteinaze matriksa (MMPs)**

Ekspresija MMPs je česta u karcinomu pluća. Stupanj ekspresije raste u slabije diferenciranih tumora i u metastazama. MMPs predstavljaju nezavisan prognostički biološki marker u bolesnika s karcinomom pluća malih i nemalih stanica. Prekomjerna ekspresija MMP – 2 povezana je s lošom prognozom u bolesnika nakon kompletne resekcije karcinoma pluća nemalih stanica. Visoke vrijednosti MMP – 9 imaju prognostički značaj u bolesnika s karcinom pluća nemalih stanica, dok se povišene vrijednosti MMP – 3, MMP – 11 i MMP 14 povezuju s lošom prognozom u bolesnika s karcinom pluća malih stanica (62, 63).

### **1. 3. Inzulinu slični čimbenici rasta (IGF), njihovi receptori (IGFR) te vezni proteini (IGFBP)**

#### **1. 3. 1. Hormon rasta (somatotropin, GH)**

Hormon rasta potiče postnatalni tjelesni rast i razvoj. Osim toga, ima brojne učinke na metabolizam bjelancevina, ugljikohidrata i masti. Potiče iz stanica prednjeg režnja hipofize koje čine 40-50% svih stanica u žlijezdi odrasle, zdrave osobe. Hormon rasta je jednolančani peptid molekularne mase 22000 kd, koji sadrži 191 aminokiselinu i dva disulfidna mosta. Oba kraja molekule sudjeluju u vezanju za receptore. Normalni

hipofizni gen za GH član je porodice gena koja upravlja sintezom i drugih, strukturno sličnih hormona – prolaktina, ljudskog placentarnog laktogenaj, te jedne varijante hormona rasta koji se stvara isključivo u posteljici. Gensku poruku prepisuje mRNA koja upravlja sintezom prehormona. Nakon toga signalni se peptid uklanja, a hormon se u svojem završnom obliku pohranjuje u zrcima stanica prednjeg režnja hipofize. Sinteza GH se povećava djelovanjem specifičnog hipotalamičkog oslobađajućeg hormona, hormona koji oslobađa hormon rasta (GHRH), koji uzrokuje brzu stimulaciju genske transkripcije.

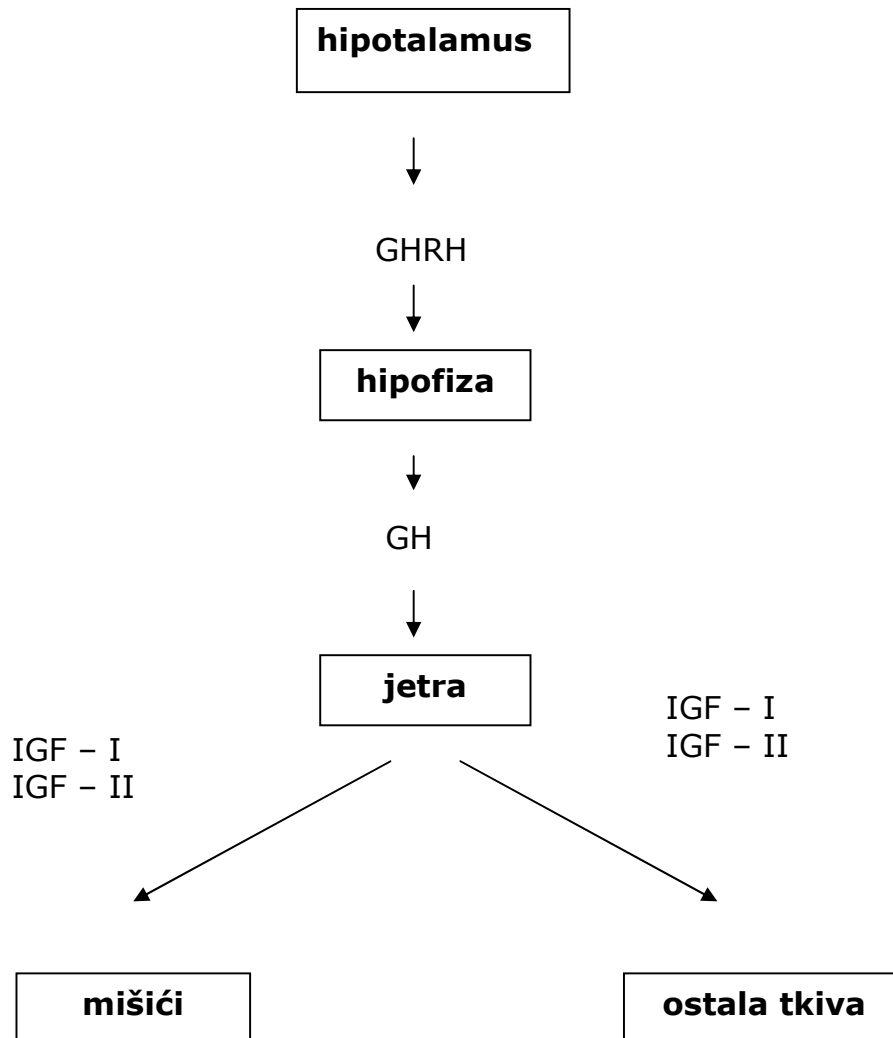
Na lučenje GH utječu brojni čimbenici. Naglo smanjenje koncentracije ugljikohidrata ili masnih kiselina u plazmi uzrokuju porast sekrecije GH. S druge strane, porast koncentracije bjelančevina ili aminokiselina u plazmi također dovodi do povećane koncentracije GH.

GH je hormon s izrazitim anabolnim djelovanjem. Potiče rast i proliferaciju praktički svih tkiva, tako što potiče sintezu bjelančevina, glukoneogenezu, sintezu RNA i sintezu DNA. Za mnoge, ili gotove sve učinke hormona rasta odgovorni su proteini koji su poznati kao inzulinu slični čimbenici rasta (engl. insulin – like growth factor, IGF) (64,65).

### **1. 3. 2. Somatomedinska hipoteza**

Somatomedinska hipoteza tvrdi da je učinak hormona rasta na sam rast posredovan proteinima koji se luče iz ciljnog tkiva u krvotok. Ti proteini su nazvani somatomedini, odnosno inzulinu slični čimbenici rasta (engl. insulin – like growth factor, IGF). GH potiče lučenje IGF proteini, posebice IGF – I, iz jetre u krvotok. GH također djeluje i na druga tkiva stimulirajući autokrinu i parakrinu sekreciju IGF proteina i na taj način potiče rast u ciljnim tkivima. Jetra, ali i ostala tkiva luče i vezne proteine za IGF (IGF – binding protein, IGFBP) koji mogu produljiti, pojačati ili inhibirati učinak IGF proteina (64, 66).

**Slika 1. 3.** Shematski prikaz djelovanja hormona rasta na ciljna tkiva, te povezanost GH i IGF sustava



### 1. 3. 3. Fiziologija IGF proteina i regulacija gena

IGF - I i IGF - II dijele oko 50% strukture s inzulinom. Većina cirkulirajućih IGF - I i IGF - II su proizvedeni u jetri, no razna tkiva imaju sposobnost sinteze tih proteina lokalno. Sinteza IGF - I u jetri je uglavnom ovisna o hormonu rasta, za razliku od sinteze IGF - II koja je neovisna o GH. Osovina GH/IGF - I je primarno regulator postnatalnog

rasta, dok IGF – II ima značajnu ulogu u razvoju fetusa (67, 68). IGF proteini prisutni su u cirkulaciji u kombinaciji s veznim proteinima visokog i niskog afiniteta, koji čine obitelj IGFBP proteina.

Do danas je pronađeno 6 veznih proteina visokog afiniteta, od IGFBP - 1 do IGFBP – 6. Većina cirkulirajućih IGFBP sintetizirana je u jetri, međutim i ostala tkiva imaju mogućnost sinteze tih veznih proteina. Najznačajniji IGFBP u serumu je IGFBP – 3, koji se veže za IGF – I. IGFBP proteini imaju veći afinitet za IGF proteine nego receptori tipa I. Kompleks IGF/IGFBP se putem proteaza razgrađuje u ciljnom organu te se kao posljedica otpušta IGF koji slobodan ima sposobnost biološkog djelovanja. IGFBP vezni proteini imaju stimulatorni i/ili inhibitorni učinak na proliferaciju stanica, a taj učinak može biti potpuno neovisan od IGF proteina (69).

Uz vezne proteine visokog afiniteta, IGFBP, u serumu su nađeni i vezni proteini niskog afiniteta, nazvani IGFBP – povezani proteini (engl. IGFBP – related proteins, IGFBP – Rp). U većini slučajeva IGFBP – Rp imaju učinak koji je neovisan od IGF proteina.

IGF – I receptor (IGF – IR) je transmembranski tetramer koji se sastoji od po dvije  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice. Podudarnost između inzulinskog receptora i IGF – IR je oko 60%. Sam IGF – IR, kao i inzulinski receptor, ima tirozin kinaznu aktivnost. Nakon aktivacije receptora dolazi do fosforilacije IRS – 1 koji aktivira fosfatidilinozitol – 3 (PI – 3). IGF – II i inzulin također se vežu za IGF – IR, no sa 15 i 1000 puta manjim afinitetom. IGF – IR štiti razne stanice u ljudskom organizmu od apoptoze, te na taj način može potaknuti nekontrolirani rast tumorskog tkiva (70, 71).

IGF II/manoza-6- fosfat receptor (IGF/M6PR) je monomer, koji veže IGF – II s 500 puta većim afinitetom nego IGF – I. IGF – II/M6PR ne veže na sebe inzulin. Smatra se da većina biološkog učinka IGF – II je ostvarena putem IGF – IR. Četiri skupine liganda se može vezati na ekstracitoplazmatsku domenu IGF – II/M6PR: lizosomski enzimi koji sadrže manoza – 6 - fosfat, IGF – II, retinoična kiselina i aktivator receptora za plazminogen. IGF – II/M6PR djeluje kao receptor koji lovi IGF – II te na taj način regulira ulaženje u stanicu i degradaciju cirkulirajućeg IGF – II. Poremećaj IGF – II/M6PR receptora dovodi do povišenih koncentracija cirkulirajućeg IGF – II, te povećane porođajne težine i organomegalije u eksperimentalnih životinja (72, 73).

### **1. 3. 4. Ekspresija gena za IGF – I**

Preprogen za IGF – I sastoji se od šest egzona u većine sisavaca i nalazi se na kromosomu 12 u čovjeka. Većina cirkulirajućeg IGF – I proizvedena je u jetri, uglavnom pod kontrolom hormona rasta. Međutim, za sam rast i razvoj važna je i ekstrahepatična, autokrini i parakrini produkcija IGF – I. U nekim tkivima stvaranje IGF – I je pod kontrolom drugih hormona, kao što su: estradiol u endometriju, gonadotropini u gonadama, TSH u štitnoj žlijezdi. Kodirajuća regija preprogena za IGF – I sa 5' i 3' kraja ima netranslantirajuće regije koje su odgovorne za heterogenost zrelog IGF – I. Npr., u štakora je nađeno nekoliko odvojenih start regija u egzonu 1. Tako širok raspon start regija postoji zbog toga što u egzonu 1 nema promotorskih regija kao što su TATA ili CAAT. Kao posljedica raznih start regija u zreloj mRNA za IGF – I mogu se naći različite 5' i 3' regije. Zbog toga, u Northern analizi, zreli IGF – I ima raspon od < 1 kb pa sve do 7.5 kb. (74-78).

### **1. 3. 5. Ekspresija gena za IGF – II**

Ljudski preprogen za IGF – II sastoji se od 9 egzona i smješten je na kromosomu 11. Prvih 6 egzona su nekodirajući. U samom preprogenu prisutne su 4 promotorske regije, od P1 do P4. Po jedan promotor je u svakom od egzona 1, 4, 5 i 6. Tijekom fetalnog razvoja, ekspresija IGF – II je značajno viša nego u odrasloj dobi. Tijekom različitih razdoblja razvoja, aktivne su različite promotorske regije. Tako su tijekom fetalnog razvoja aktivne regije P2, P3 i P4, dok nakon poroda ove regije postaju manje značajne, a dominantna postaje regija P1. Gen za IGF – II je jedan od nekoliko gena za koje se zna da imaju roditeljsku alel specifičnu ekspresiju. U zdravih ljudi, IGF – II je izražen samo od očeve kopije gena, dok je majčin utisnut. IGF – II gen je lociran na kromosomu 11p15.5 u blizini H19, gena utisnutog od strane oca. Proces roditeljskog utiska je rani događaj koji se odvija za vrijeme gametogeneze. Gubitak roditeljskog utiska (imprintinga) za IGF – II gen nađen je u velikog broja tumora, uključujući Wilmsov tumor, adenokarcinom želuca, karcinom pluća, gliom, hepatoblastom, leiomiosarkom, karcinom cerviksa, karcinom prostate, koriokarcinom, rabdomiosarkom, seminom i



karcinom ovarija. Kada dođe do gubitka imprintinga dolazi do bialelne ekspresije IGF – II, što rezultira prekomjernom ekspresijom ovog potentnog čimbenika rasta. Točna uloga gubitka roditeljskog utiska u samoj tumorogenezi nije još potpuno jasna. U nekih tumora, kao što je Wilmsov tumor, gubitak imprintinga dešava se rano u karcinogenezi. U drugih, kao što je karcinom cerviksa, gubitak imprintinga dešava se mnogo kasnije u samoj tumorogenezi. Povezanost s genom H19, koji ima funkciju gena supresora tumora, također nije potpuno jasna. U Wilmsovom tumoru, gubitak imprintiga gena za IGF – II povezan je s smanjenom ekspresijom H19. Međutim, takav recipročan odnos nije pronađen u ostalim tumorima (79-82).

### **1. 3. 6. Ekspresija gena za IGF – I receptor (IGF – IR)**

Najviša razina mRNA za IGF – IR je tijekom fetalnog razvoja te u ranom postnatalnom periodu. Iako je ekspresija IGF – IR mala u odraslih, receptor je prisutan u većine tkiva. Ekspresija IGF – IR pojačava se tijekom gladovanja te u dijabetesu. Visoke koncentracije IGF – I smanjuju ekspresiju IGF – IR. Promotor za IGF – IR gen nema regije TATA i CAAT. Netranslantirajuća 5' regija bogata je GC bazama i sadrži brojne Sp1 sekvence koje potentno aktiviraju transkripciju IGF – IR gena. Transkripcija započinje iz jedine start regije. Bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF) također povećava razinu mRNA za IGF – IR i aktivira IGF – IR promotor. Gen supresor tumora, p53 inhibira aktivnost IGF – IR promotora te na taj način smanjuje ekspresiju IGF – IR. Pojačana ekspresija IGF – IR nađena je u malignih tumora sa prisutnim poremećajima u p53. Pojačana ekspresija IGF – IR u malignim tumorima može pojačati odgovor na autokrine, parakrine i cirkulirajuće IGF proteine i na taj način potaknuti i ubrzati rast tumora (83-86).

### **1. 3. 7. Ekspresija gena za IGF – II receptor (IGF – IIR)**

IGF – II receptor veže na sebe IGF – II i druge ligande te sadrži lizosomski enzim manozu 6-fosfat. Za razliku od IGF – I receptora, IGF – IIR je veliki, jednolančani peptid koji nema intrinzičnu tirozin kinaznu aktivnost. Njegova primarna funkcija je transport liganda do lizosoma što rezultira ili aktivacijom ili razgradnjom liganda. Većina IGF –

IIR smještena je na unutarnjoj strani membrane stanice. Većina fiziološke aktivnosti IGF – II odvija se preko IGF – I receptora. Vežanje IGF – II za svoj receptor, IGF – IIR, dovodi do aktivacije s Gi-2, veznog proteina za GTP, koji potiče ulazak kalcija u stanicu. Mišji gen za IGF – IIR je veličine 93 kb te sadrži 48 egzona. Gen sadrži minimalni, ali snažni promotor veličine 222 bp ili manje (87, 88).

#### **1. 4. Sustav inzulinu sličnih čimbenika rasta i neoplazija**

Sustav inzulinu sličnih čimbenika rasta: IGF proteini, njihovi receptori i vezni proteini povezani su razvojem brojnih neoplazmi. Većina tumorskih stanica odgovara na stimulaciju inzulinu sličnih čimbenika rasta (89).

##### **1. 4. 1. Neoplazme središnjeg živčanog sustava**

###### **1. 4. 1. 1. Glioblastom i astrocitom**

IGF – I mRNA je prisutna i u odraslom i fetalnom ljudskom mozgu. Najjača ekspresija IGF – I u odraslom mozgu je u ponsu, najmanja u talamusu. Koncentracije IGF – I su 2 – 4 puta veće u glioblastomu i astrocitomu nego u zdravom tkivu. Također je dokazana i povezanost ekspresije IGF – I i histološkog stupnja tumora. Što je jača ekspresija IGF – I to je lošiji histološki stupanj glioblastoma, odnosno astrocitoma. U tumora visokog stupnja, najjača ekspresija IGF – I nađena je u perivaskulrnom području. Proliferativne krvne žile pokazuju jaču ekspresiju nego neproliferativne (90, 91).

Ekspresija IGF – II mRNA je izrazita u fetalnom ljudskom mozgu, dok je jedva izražena u odraslom. U glijalnih tumora ekspresija IGF – II je 5 – 50 puta jače izražena nego u zdravom fetalnom mozgu (90, 92).

IGF – I i IGF II receptor također su prisutni i u normalnom moždanom tkivu i u glioblastomu. Nije nađena razlika u ekspresiji IGF – IR, za razliku od IGF – IIR gdje je nađena 2 – 5 puta jača ekspresija u tumorskom nego u zdravom tkivu (93).

Studije in vitro i in vivo su pokazale da gliomi pozitivno odgovaraju na stimulaciju s IGF – I i IGF – II, tako da su navedeni proteini značajni u samoj tumorigenezi i daljnjem razvoju glioma.

#### **1. 4. 1. 2. Meningeom**

IGF – I i IGF – II prisutni su u stanicama meningeoma, kao i IGF – IR i IGF – IIR. Studije su pokazale da stanice meningeoma odgovaraju na stimulaciju IGF proteinima. Stimulacija IGF – IR potiče mitogenezu. Pojačana produkcija IGF – II u meningeomu, posebice s niskom razinom IGFBP – 2, povezana je s agresivnim tijekom bolesti i lošom prognozom. Taj nalaz upućuje na važnost autokrinog stvaranja IGF – II na propagaciju rasta tumora u samom meningeomu. S druge strane, visoke koncentracije IGFBP – 2 poništavaju takav učinak IGF – II, što ukazuje na nužnost ravnoteže između IGF – II i IGFBP kako bi se očuvala homeostaza (94, 95).

#### **1. 4. 2. Gastrointestinalne neoplazme**

##### **1. 4. 2. 1. Karcinom kolona**

U stanicama normalnog epitel kolona prisutna je IGF – I mRNA. Nivo IGF – I mRNA je 3 do 5 puta viši u 20% bolesnika s karcinomom kolona. Također, prisutna je IGF – II mRNA i u stanicama normalnog epitel kolona, i u stanicama karcinoma kolona. U 40% karcinomskih stanica, ekspresija IGF – II mRNA je povećana 10 do 50 puta. Međutim, povećana ekspresija nađena je u karcinomima rektuma i rektosigmoida, dok u karcinomima cekuma i sigme nije nađena povećana ekspresija IGF – II mRNA. Ekspresija IGF – II mRNA je viša u karcinomima višeg stadija, tako da je ekspresija viđa u stadiju Dukes C, nego u Dukes B, što bi moglo upućivati da je IGF – II marker agresivnih, distalnih karcinoma kolona. Postoji pozitivna korelacija između ekspresije IGF – II mRNA i veličine tumora. Dubine tumorske invazije te ubrzane proliferacije tumora. IGF – II negativni karcinomi kolon povezani su s boljom prognozom. Također, nađena je povećana ekspresija jetrenog IGF – II u bolesnika s metastazama u jetri u

bolesnika s karcinomom kolona što upućuje na značajnu parakrinu aktivnost jetrenog IGF – II (96 – 98).

Na stanicama normalnog epitela kolona i stanicama karcinoma kolona nalaze se IGF – I receptori. Međutim, u većine istraživanja nije nađena razlika u ekspresiji receptora između zdravog i tumorskog tkiva (99).

#### **1. 4. 2. 2. Karcinom želuca**

U bolesnika sa karcinomom želuca nađena je autokrino aktivnost IGF – II, dok u većine istraživanja nije nađena ekspresija IGF – I. Međutim, na stanicama karcinoma želuca nalaze se i IGF – I i IGF – II receptori. IGF – I i IGF – II imaju mitogeni učinak na stanice karcinoma želuca in vitro (100).

#### **1. 4. 2. 3. Karcinom gušterače**

U stanicama karcinoma gušterače dokazano je autokrino stvaranje IGF – I, uz 30 puta povećanu koncentraciju IGF – I u usporedbi s zdravim tkivom. U stanicama karcinom gušterače dokazan je pojačana ekspresija i IGF – I i IGF – II receptora. IGF – I stimulira rast stanica karcinoma gušterače (101, 102).

#### **1. 4. 2. 4. Hepatocelularni karcinom**

U stanicama hepatocelularnog karcinoma nađena je ekspresija IGF – I mRNA. Međutim, u usporedbi sa zdravim tkivom ekspresija je relativno niska, što se može objasniti smanjenom stimulacijom od strane hormona rasta. S druge strane, ekspresija IGF – II mRNA povećana je 40 do 100 puta u usporedbi s zdravim tkivom. U karcinomskim stanicama nađena je i fetalna IGF – II mRNA što ukazuje na dediferencijaciju tumorskih stanica. U stanicama hepatocelularnog karcinoma prisutni su i IGF – I i IGF – II receptori. IGF – I i IGF – II potiču rast tumorskih stanica (103, 104).

### **1. 4.3. Neoplazme ženskog reproduktivnog sustava**

#### **1. 4.3.1. Karcinom dojke**

Stanice karcinoma dojke luče IGF – I. Međutim, postoji razlika u sekreciji između estrogen ovisnih i estrogen neovisnih karcinomskih stanica. Estrogen neovisne karcinomske stanice luče više IGF – I nego estrogen ovisne. Ekspresija IGF – II također je nađena u karcinomskom tkivu. Međutim, istraživanja sugeriraju da se IGF – I i IGF – II stvaraju u stromalnom tkivu koje okružuje tumorske stanice, a ne u samim tumorskim stanicama. Karcinomske stanice na svojoj površini iskazuju i IGF – I i IGF – II receptore. U samom karcinomskom tkivu prisutni su i vezni proteini za IGF, i to IGFBP-2 u tkivu sa pozitivnim estrogenskim receptorima, te IGFBP 1 i 3 u estrogen negativnim stanicama. IGF – I i IGF – II imaju pozitivan učinak na tumorski rast in vitro i in vivo studijama. Međutim, autokrini sekrecija IGF – I i IGF – II iz karcinomskih stanica je rijetka pa se oba čimbenika rasta stvaraju i luče iz stromalnog tkiva, a tako stromalno tkivo potiče i podržava tumorski rast. S druge strane, receptori za IGF se nalaze i na karcinomskim i na stromalnim stanicama, te je pojačana ekspresija tih receptora povezana sa tumorskim rastom (105 – 108).

#### **1. 4.3.2. Karcinom jajnika**

U tkivu karcinoma jajnika dokazan je IGF – I. U stanicama karcinoma pojačana je ekspresija IGF – I mRNA u usporedbi sa benignim ovarijskim cistama što ukazuje na autokrini produkciju IGF – I od strane karcinomskih stanica. Također je u karcinomskim stanicama dokazana prisutnost IGF – I receptora. Nekoliko veznih proteina za IGF nađeno je u karcinomskim stanicama: IGFBP 2, 3 i 5. IGF – I potiče tumorski rast in vitro i in vivo (109).

### **1. 4.3.2. Karcinom endometrija**

U stanicama karcinoma endometrija dokazana je prisutnost i IGF – I i IGF – II uz 7 – 20 puta povećanje koncentracije IGF – I. Na stanicama karcinoma endometrija povećana je ekspresija IGF – I receptora. U karcinomskim stanicama je izrazito snižena ekspresija IGFBP – 1 mRNA, dok je ekspresija IGFBP – 2, 4 i 5 jednaka kao i u normalnom tkivu endometrija. IGF – I i IGF – II imaju pozitivan učinak na rast i proliferaciju karcinomskih stanica (110 – 112).

### **1. 4.4. Neoplazme muškog reproduktivnog sustava**

#### **1. 4.4.1. Karcinom prostate**

U većine stanica karcinoma prostate prisutan je IGF I, uz povećanu ekspresiju IGF – I mRNA u stanicama agresivnog karcinoma. Mišljenja o prisutnosti IGF – II u karcinomu prostate su podijeljena – neki radovi dokazuju prisutnost, dok drugi ne. Na površini karcinomskih stanica nalazi se IGF – I receptor dok nije dokazan IGF – II receptor. IGFBP – 1 inhibira rast karcinomskih stanica vežući na sebe IGF – I te na taj način onemogućava autokrini učinak IGF – I. Sličan učinak ima i IGFBP – 4. IGF – I ima izrazito potentan učinak na rast stanica karcinom prostate. Koncentracija IGF – I je izrazito povišena u bolesnika s karcinomom prostate u usporedbi sa zdravim osobama (113 – 115).

### **1. 4.5. Neoplazme mokraćnog sustava**

U stanicama karcinoma bubrega i mokraćnog mjehura dokazana je prisutnost IGF – I i IGF – II koji in vitro i in vivo potiču rast tumorskih stanica (116).

## **1. 4. 6. Neoplazme koštanog sustava**

### **1. 4. 6. 1. Osteosarkom**

U tkivu osteosarkoma dokazana je prisutnost i IGF – I i IGF – II. Na površini tumorskih stanica dokazani su IGF – I i IGF – II receptori. IGF – I i IGF – II imaju mitogeni učinak na stanice osteosarkoma dok su rast i preživljenje tumorskih stanica in vitro ovisni o koncentraciji IGF – I (117).

### **1. 4. 7. Kožne neoplazme**

U kožnim neoplazmama također su dokazani IGF – I i IGF – II te njihovi receptori. Sami IGF imaju pozitivan učinak na rast tumorskih stanica melanoma i karcinom pločastih stanica. Studije ukazuje da stanice melanoma imaju sposobnost endogenog stvaranja IGF – I (118, 119).

### **1. 4. 8. Hematološke maligne bolesti**

U stanicama Burkittovog limfoma, Hodgkinove bolesti i leukemičnim stanicama dokazana je pojačana ekspresija IGF – I i IGF – II receptora. IGF – I i II potiču rast tumorskih stanica u Burkittovom limfomu i Hodgkinovoj bolesti. Učinak na rast i proliferaciju ovisan je o koncentraciji IGF – a. Također je dokazan i mitogeni učinak IGF – I na maligne stanice akutne limfoblastične leukemije (ALL) (120, 121).

### **1. 4. 8. Neoplazme pluća**

Minuto i suradnici još su 1986. godine izmjerili višestruko povišene koncentracije IGF – I u tkivu karcinom pluća u usporedbi s normalnim tkivom pluća. Ista grupa autora zaključila je da stanice karcinom pluća imaju autokrinu učinak putem IGF – I. IGF – I i IGF – II luče stanice karcinoma pluća malih i nemalih stanica. Također, stanice karcinoma pluća malih i nemalih stanica na svojoj površini izražavaju IGF – I i IGF – II

receptore. IGF – I i IGF – II imaju pozitivan učinak na rast i proliferaciju stanica karcinom pluća malih i nemalih stanica. Na molekularnoj razini, IGF – I ima 10 do 100 puta jači učinak na rast tumorskih stanica u usporedbi s IGF – II ili inzulinom. Prekomjerna ekspresija IGF – I receptora povećava metastatski potencijal karcinoma pluća (122 – 125).

#### **1. 4. 9. Zaključak**

Inzulinu slični čimbenici rasta, njihovi receptori i proteini koji se vežu za IGF receptore imaju važnu ulogu u normalnom staničnom i tjelesnom rastu i razvoju. Poremećaj u navedenim molekulama i njihovim receptorima može aktivirati razne mehanizme koji mogu dovesti do razvoja karcinoma u ljudi. Inzulinu slični čimbenici rasta I i II imaju izraziti mitogeni učinak koji se ostvaruje vezanjem za receptore tipa I, IGF - IR. IGF se također veže visokim afinitetom za IGFBP koji prenose IGF krvotokom i reguliraju raspoloživost IGF prema specifičnim receptorima.

Poremećaj bilo kojeg člana obitelji IGF može doprinijeti nastanku karcinoma bilo endokrinim, parakrinim ili autokrinim mehanizmima: IGF ligandi i IGF-I receptor putem antiapoptotičkog djelovanja, ili pak jedan drugi član ove obitelji za kojeg se može vezati IGF II, manoza – 6 fosfat/IGF – II receptor (M6P/IGF – IIR) kao tumor supresor. In vitro je dokazano, da brojni tumori pluća luče IGF BP, koji aktiviraju ili inhibiraju fiziološku i biološku aktivnost IGF (126, 127).

Stanične linije karcinoma pluća malih stanica (engl. small cell lung cancer, SCLC) izlučuju i reagiraju na egzogeni IGF, što upućuje na autokrini učinak IGF-peptida u proliferaciji tumorskih stanica. Dokazano je da oko 50% SCLC i oko 30% karcinoma pluća nemalih stanica (engl. non-small cell lung cancer, NSCLC) ima aktivan gen za IGF - II. Stanice karcinoma pluća također izlučuju IGFBP. Ti proteini vežu na sebe IGF te moduliraju fiziološku, biološku i staničnu aktivnost IGF peptida. U stanicama karcinoma pluća dokazan je gubitak roditeljskog utiska (engl. loss of imprinting, LOI) u lokusu za IGF – II (128 – 131).

Poremećaj gena za M6P/IGF – IIR može biti povezan s razvojem karcinoma pluća. Gubitak heterozigotnosti (engl. loss of heterozygosity, LOH) gena za M6P/IGF – IIR ,



zajedno s gubitkom funkcije preostalog alela, utvrđen je u karcinomu pluća pločastih stanica. U jednoj staničnoj liniji adenokarcinoma pluća rezistentnoj na inhibiciju rasta transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (engl. transforming growth factor  $\beta$ , TGF –  $\beta$ ), nađena je pretvorba adenina u gvanin u egzonu 40. Konačno, osobe s gubitkom heterozigotnosti (LOH) u M6P/IGF – IIR lokusu predisponirani su za nastanak iradijacijske ozljede pluća. Poremećaj funkcije receptora M6P/IGF – IIR mogao bi značajno poremetiti normalan stanični rast (132 – 134).

## **2. CILJ RADA I HIPOTEZA**

Neki karcinomi pluća stvaraju i luče IGF - IR i IGF - II, koji stimuliraju staničnu proliferaciju autokrinim mehanizmima. Ciljevi rada su istražiti da li proliferacija karcinomskih stanica može biti prekinuta ili usporena blokiranjem mRNA aktivnosti gena za IGF - IR i IGF - II. Vodeći računa o navedenim činjenicama, cilj ovog istraživanja je ispitati posljedice funkcije, odnosno disfunkcije gena obitelji IGF na ponašanje stanica karcinoma pluća.

### **Hipoteze:**

1. ekspresija mRNA za IGF - I /IGF - IR ili proteina IGF - I/IGF - IR potiče staničnu proliferaciju i smanjuje apoptozu karcinomskih stanica
2. promjene u genu za M6P/IGF - IIR potiču proliferaciju tumorskih stanica
3. povećana ekspresija IGF - II i IGF - IIR povećava aktivnost telomeraze u karcinomu pluća nemalih stanica
4. poremećaj funkcije obitelji IGF potiče rast stanica karcinoma pluća

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

#### **3. 1. Ispitanici i uzorci tkiva**

Analizirano je 38 uzoraka tkiva karcinoma pluća nemalih stanica te zdravog tkiva pluća. Uzorci su uzimani tijekom operacije zbog karcinoma pluća u Klinici za plućne bolesti Jordanovac. Od ukupnog broja uzoraka bilo je 15 adenokarcinoma, 19 karcinoma velikih stanica i 4 karcinoma pločastih stanica. Uzorci adenokarcinoma dobiveni su od 11 muškaraca (srednja dob 59 godina, raspon 42 – 72 godina) i 4 žene (srednja dob 63 godine, raspon 49 – 70 godina); uzorci velikostaničnog karcinoma dobiveni su od 12 muškaraca (srednja dob 56 godina, raspon 43 – 70 godina) i 7 žena (srednja dob 61 godina, raspon 44 – 78 godina); te uzorci karcinoma pluća pločastih stanica dobiveni su od 4 muškarca, srednje dobi 71 godina (raspon 45 – 79 godina).

Tumorsko tkivo dobiveno tijekom operacije podijeljeno je u dva dijela. Jedan dio uklopljen je u parafin te klasično analiziran od strane patologa da bi se dobio točan histološki tip i stadij karcinoma. Drugi dio tumorskog tkiva odmah je nakon resekcije smrznut u tekućem dušiku na - 80°C te odnošen u Laboratorij za molekularnu biologiju Instituta «Ruđer Bošković» gdje je provedena molekularno-genetska analiza. Sve analize, osim klasične histologije rađene su na smrznutom tkivu. Za svaki uzorak karcinoma, uzorak zdravog tkiva pluća istog bolesnika koje nije direktno povezano s tumorom, korišten je kao kontrola za analizu gubitka heterozigotnosti i analizu mutacija. Parafinski blokovi bojani su hemalaun – eozinom da se potvrdi prisustvo malignih stanica u uzroku. Svi pacijenti su prije ulaska u studiju potpisali informirani pristanak. Studija je odobrena od strane etičkog povjerenstva Klinike za plućne bolesti Jordanovac i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

### **3. 2. Ekstrakcija RNA i reverzna transkripcija lančane reakcije polimerazom**

Za ekstrakciju RNA, uzorci tkiva su homogenizirani u 1 ml otopine koja sadrži 4 mola gvanidin tiocinata, 25 mmola natrij citrata (pH 7,0), 5 g/l sarkozila i 100 mmola 2-merkaptoetanol. Reverzna transkripcija (42°C kroz 1h) učinjena je za svu IGF RNA. Fragmenti cDNA su slijedeće veličine: IGF-1, 397 bp; IGF-1R, 729 bp;  $\beta$  – aktin, 317bp (135 –137).

### **3. 3. Imunohistokemija**

Imunohistokemijski testovi karcinomskog tkiva provedeni su na tkivu uklopljenom u parafin te fiksiranom formalinom, avidin-biotin-peroksidaza metodom. Dijelovi tkiva, rezani su na debljinu od 4 $\mu$ m te uklopljeni u 10 mmola citratnog pufera (pH 6.0), a potom toplinski obrađeni u mikrovalnoj pećnici na 850W kroz 10 minuta. Anti - IGF – I (kozji; 50  $\mu$ g/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN); anti – IGF – II (mišji) (Upstate Biotechnologies, Lake Placid, NY); i anti – Ki - 67 (mišji, 10  $\mu$ g/ml) (DAKO Cytomterics, Glostrup, Denmark) monoklonska antitijela razrijeđena su u omjeru 1:50 te potom inkubirana kroz 15 – 18 h. Anti – IGF – IR (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) razrijeđena su u omjeru 1:100 te potom također inkubirana kroz 15 – 18 sati. Za detekciju je korišten DAKO LSAB 2 kit (Carpinteria, CA). Za detekciju IGF – IIR korišteno je poliklonsko, zečje anti – M6P/IGF – IIR antitijelo (Zeneco, Houston, Tx). Za detekciju je korišten DAKO LSAB 2 kit prema uputama proizvođača. Negativne kontrole obilježene su zamjenom primarnih antitijela s neimunizacijskim mišjim ili zečjim imunoglobulinima. Odgovarajuće pozitivne kontrole (tkivo hemangiosarkoma za IGF – I, Wilmsov tumor za za IGF – 2, tkivo štitne žlijezde za IGF – IR, zdravo tkivo kolona za M6P/IGF – IIR, i limfni čvorovi ili koža za Ki – 67) su obojene pozitivno. Tumorske stanice su pokazale jaku, difuznu, citoplazmatsku imunopozitivnost za IGF – I, IGF – II, M6P/IGF – IIR i Ki – 67, te citoplazmatsku i fokalnu membransku reaktivnost za IGF – IR. Intenzitet bojanja procijenjen je subjektivno te označen kao: negativno - 0, slabo - 1, umjereno – 2 i jako - 3.

### **3. 4. Analiza gubitka heterozigotnosti i detekcija mutacija u M6P/IGF - IIR**

Za analizu gubitka heterozigotnosti i analizu mutacija u genu za M6P/IGF – IIR korištena su dva genska polimorfizma koji se nalaze zajedno u 3' netranslantiranoj regiji ljudskog gena za M6P/IGF-II receptor. Koristeći lančanu reakciju polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR) za umnožavanje DNA, utvrđena je frekvencija gubitka heterozigotnosti. Jedna polimorfna regija je ponavljajuća dinukleotidna (GT) sekvenca, a druga polimorfna regija je tetranukleotidna (ACAA) insercija/delecija na kraju 5' ponavljajuće GT- sekvence. Zajedno ovi polimorfizmi čine opaženu heterozigotnost od oko 65%. Normalne i obrnute PCR početnice (engl. PCR primers) koje su korištene jesu (5' – TTGCCGGCTGGTGAATTCAA – 3') i (5' – CTCTTCAGGTTCTCATGATA – 3'). Gubitak alela je definiran kao 50% ili više smanjene odnosa između dva alela u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom.

U tumorima s gubitkom heterozigotnosti u jednom lokusu M6P/IGF-2R, preostali alel analiziran je za mutacije u regiji koja veže ligand koristeći direktno sekvenciranje produkata lančane reakcije polimeraze. Za mutacije su pretraživani egzoni 8 – 11, egzoni 27 – 29, egzon 31, egzoni 33 i 34 te egzoni 37 – 39 (138).

### **3. 5. Kultivacija stanica karcinoma pluća: stanična proliferacija, apoptoza i aktivnost telomeraze nakon blokiranja IGF – IR monoklonim antitijelima**

Stanice su čuvane u T – 75 bočicama u RPMI 1640 mediju obogaćenom s 10% goveđim, fetalnim serumom i 5% ljudskim serumom, 1% glutaminom, te 20 mM HEPES – a. Tumorske stanice su kultivirane u jednom sloju. Za specifične analize tumorske stanice su presađene u tanjuriće s 96 udubljenja ( $2 \times 10^3$  stanica/udubina za MTT test koji procjenjuje staničnu proliferaciju;  $2 \times 10^5$  stanica/udubina za testove za procjenu apoptoze i aktivnosti telomeraze) i inkubirane kroz 4 dana u RPMI mediju (0.1% goveđi serumski albumini, 5  $\mu$ g/ml transferina, 5 ng/ml selenske kiseline i antibiotici) sa 1000 ng/ml  $\alpha$ IR3 monoklonski antitijela (AMS Biotechnology, Lugano, Switzerland). Na kraju inkubacije provedeni su MTT test i testovi za procjenu apoptoze i aktivnosti telomeraze.

Za procjenu učinka IGF – I na aktivnost telomeraze,  $5 \times 10^5$  presađeno je u udubine koristeći tanjuriće s 24 udubine. Potom su stanice uzgajane do 70% spajanja te stavljene u medij bez seruma. Nakon 10 sati tretirane su s 10, 100 i 1000 ng/ml IGF – I kroz 24 sata. Pokus je rađen dva puta.

### **3. 6. MTT – analiza**

Za procjenu proliferacijske sposobnosti tumorskih stanica određen je broj stanica koristeći MTT test redukcije boje. Absorbanca je mjerena na 570 nm koristeći ELISA-čitač (Multiscan MS; Labsystems, Franklin, MA). Rezultat je izražen kao postotak smanjenja staničnog rasta u usporedbi s netretiranim kontrolnim stanicama.

### **3. 7. Analiza apoptoze**

Apoptoza je analizirana koristeći FACScan. Fiksirana su dva milijuna stanica po uzorku s 2% paraformaldehidom u fosfatom puferiranoj otopini soli. Potom su dva puta oprani s otopinom soli puferiranom Trisom (50 mmola Tris HCL u otopini soli) te permeabilizirani kroz 1 minutu s ledeno hladnim acetonom. Stanice su bojane inkubiranjem kroz 1 h na 37°C u 25µl TUNEL reakcijske mješavine (in situ Cell Death Detection Kit; Boehringer, Mannheim, Njemačka). Uzorci su potom analizirani koristeći FACScan (Becton Dickinson, Erembodegan-Aalst, Belgija) (139).

### **3. 8. Analiza telomeraze**

Za analizu enzima telomeraze korišteni su komercijalni telomeraza PCR ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) prema protokolu izdanom od strane proizvođača. Absorbanca od 450 nm očitavana je sa ELISA čitačem (Multiscan MS). Stanice su lizirane te je određena koncentracija proteina koristeći test po Bradfordu. Dva mikrograma proteina uzeto je za svaku PCR telomeraze. Analiza telomeraze rađena je koristeći pozitivne i negativne kontrole specificirane u samom kitu (140, 141).

### **3. 9. Statistička analiza**

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Za usporedbu rezultata između dvije grupe tumorskog tkiva korišten je Studentov t – test (SAS/Stat). Za statističku značajnost korištena je p vrijednost manja od 0.01. Box – Whiskerovi plotovi kreirani su u bazičnom modu programa Statistica. Odnos između apoptoze i statusa IGF-gena analiziran je Wilcoxonovim testom. Odnos između aktivnosti telomerase i IGF – 1 procijenjen je Pearsonovim korelacijskim koeficijentom.

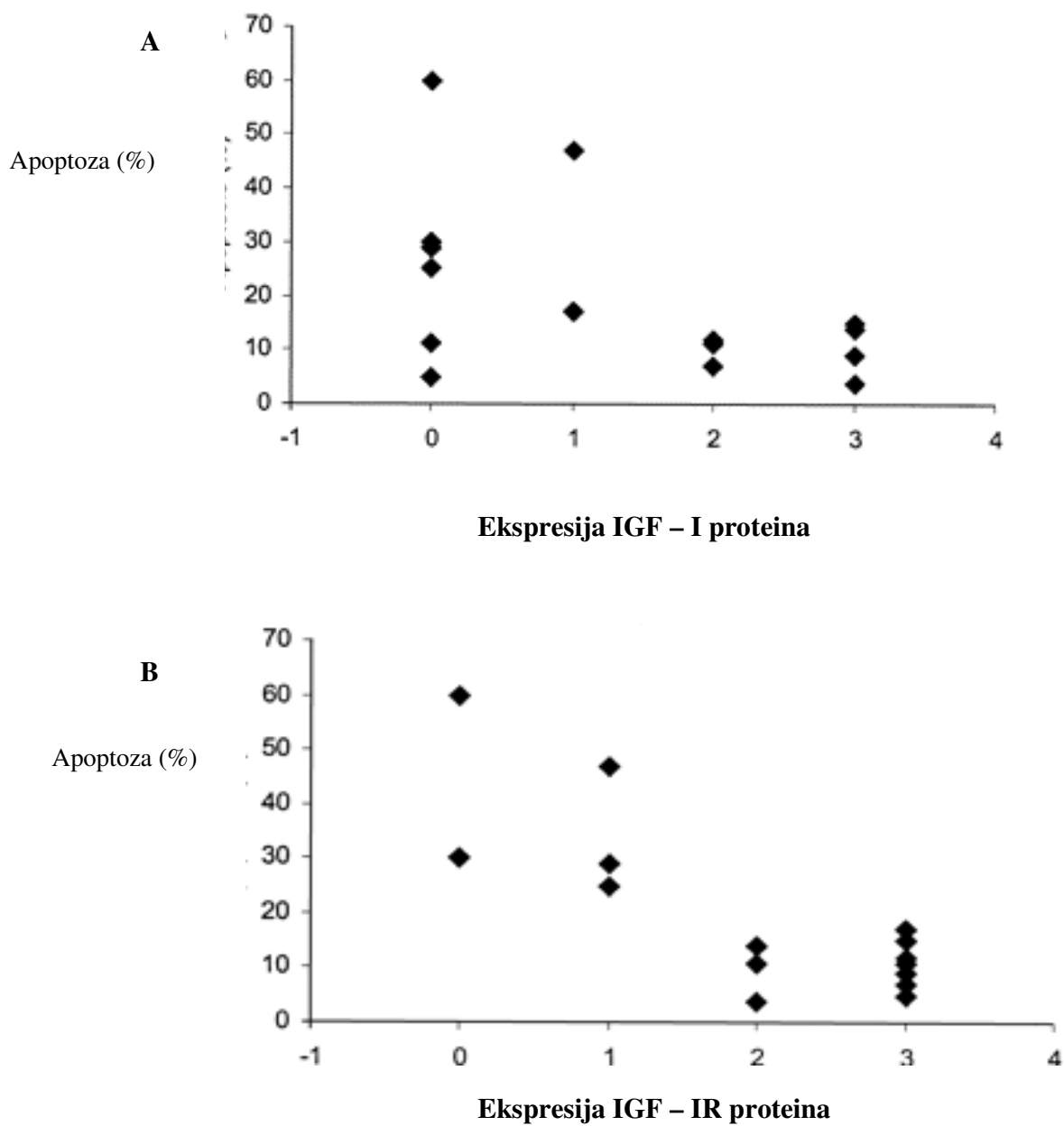
## **4. REZULTATI**

U svih 38 uzoraka tumorskog tkiva nađena je povećana ekspresija IGF – I proteina, mRNA za IGF – I, IGF – II proteina, mRNA za IGF – II, IGF – IR, te mRNA za IGF – IIR. Odnos između ekspresije IGF – I, IGF – II i IGF – IR prikazan je prema podtipovima karcinoma pluća nemalih stanica.

### **4. 1. Karcinom pluća velikih stanica i adenokarcinom**

#### **4. 1. 1. Odnos ekspresije IGF – I/IGF – IR proteina i mRNA i apoptoze**

Povezanost između povećane ekspresije proteina IGF – I proteina ( $p = 0.09869$ ) te IGF – IR ( $p = 0.02731$ ) i smanjenog broja apoptotičkih stanica nađena je u uzorcima adenokarcinoma raznih stadija (slika 4.1., tablica 4.1. )



**Slika 4.1. A i B.** Odnos između ekspresije proteina IGF – I (slika A) i IGF – IR (slika B) i učestalosti apoptoze u adenokarcinomu pluća (ekspresija proteina učinjena je imunohistokemijskom analizom, 0 – negativno, 4 najjače bojenje)



**Tablica 4. 1.** Ekspresija IGF – I, IGF – IR i apoptoza u raznim stadijima adenokarcinoma pluća

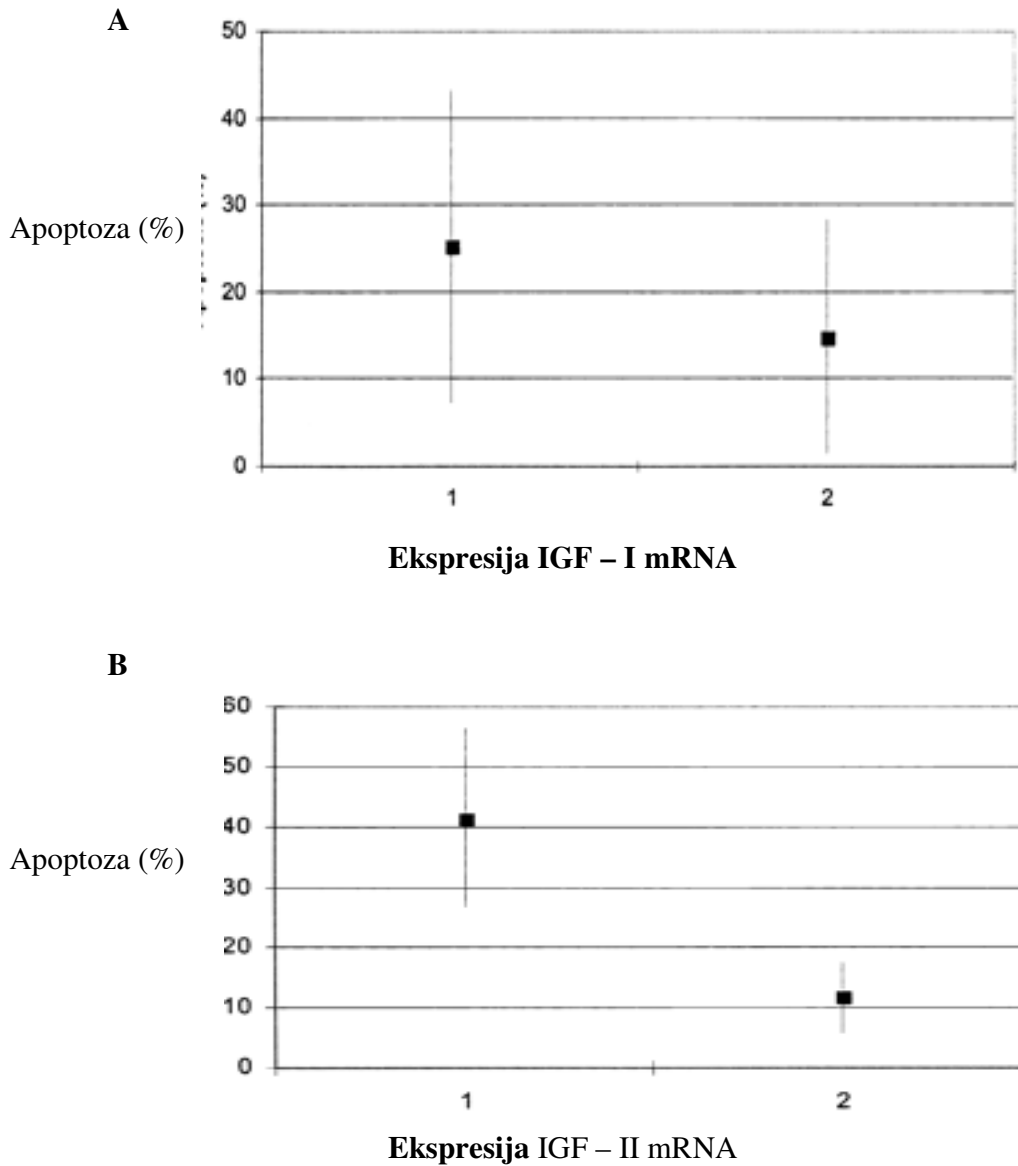
| Bolesnik | TNM stadij | IGF – I  |        | IGF - IR |        | Apoptoza (%)*** |
|----------|------------|----------|--------|----------|--------|-----------------|
|          |            | Protein* | mRNA** | Protein* | mRNA** |                 |
| 1        | I          | 0        | -      | 0        | -      | 60              |
| 2        | I          | 3        | +      | 2        | +      | 14              |
| 3        | I          | 3        | +      | 2        | +      | 4               |
| 4        | II         | 0        | -      | 2        | +      | 11              |
| 5        | II         | 0        | -      | 3        | +      | 5               |
| 6        | II         | 0        | -      | 0        | -      | 30              |
| 7        | II         | 0        | -      | 1        | +      | 25              |
| 8        | II         | 0        | -      | 1        | -      | 29              |
| 9        | II         | 1        | -      | 3        | +      | 17              |
| 10       | II         | 2        | +      | 3        | +      | 12              |
| 11       | IIIA       | 1        | +      | 1        | -      | 47              |
| 12       | IIIA       | 2        | +      | 3        | +      | 11              |
| 13       | IIIA       | 2        | +      | 3        | +      | 7               |
| 14       | IIIA       | 3        | +      | 3        | +      | 9               |
| 15       | IIIA       | 3        | +      | 3        | +      | 15              |

\* imunohistokemija

\*\* + prisutno, - odsutno

\*\*\* postotak apoptotičkih stanica u pojedinom uzorku

Također je nađena statistički značajna pozitivna korelacija između apoptoze i ekspresije IGF – I mRNA ( $p = 0.03578$ ) te ekspresije IGF – IR mRNA ( $p = 0.02731$ ). (Slika 4. 2.)



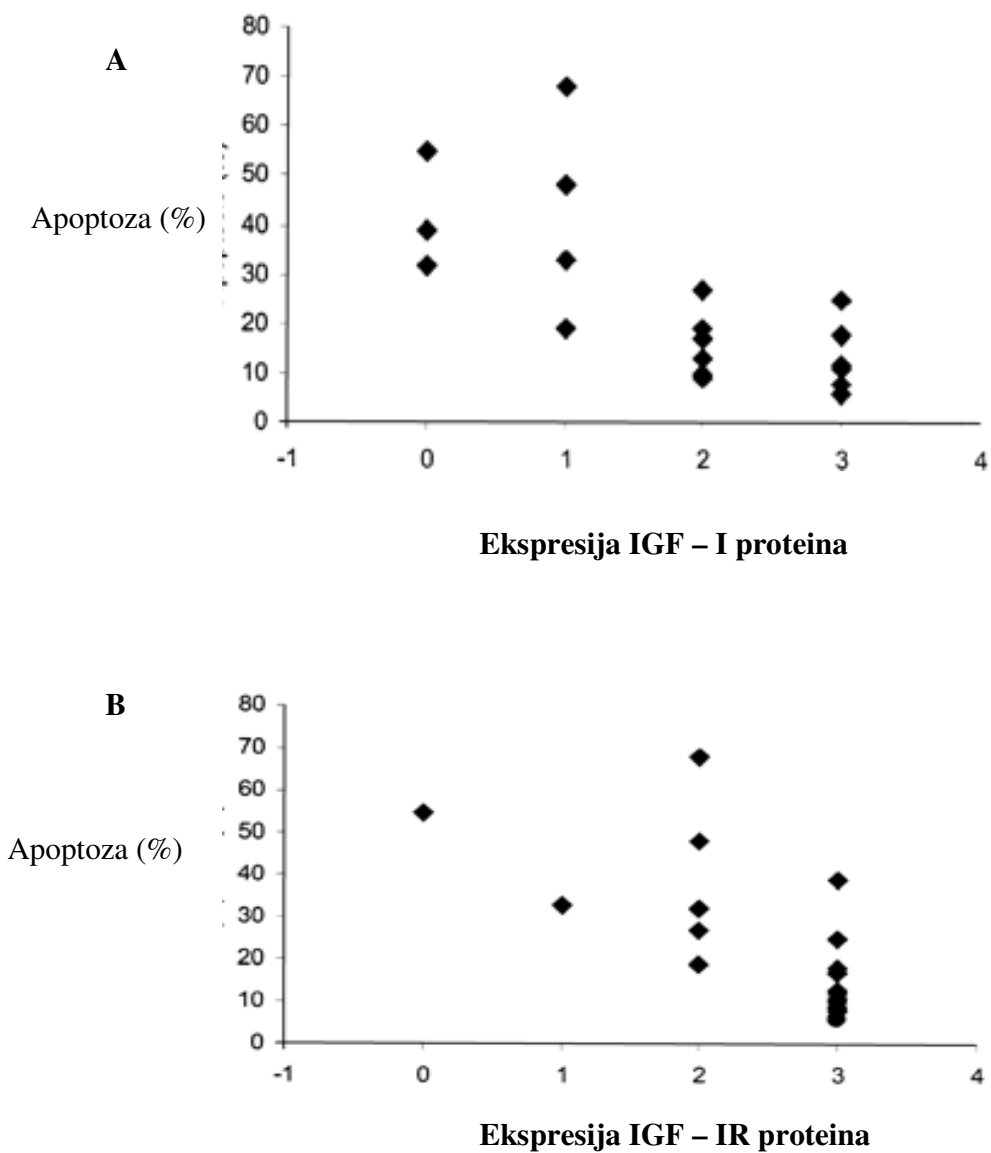
**Slika 4. 2.** Odnos između IGF – I (slika A) i IGF – IR (slika B) mRNA ekspresije i učestalosti apoptoze u adenokarcinomu pluća (s 1 su označeni uzorci negativni za IGF – I/IGF – IR mRNA; s 2 su označeni uzorci pozitivni za IGF – I/IGF – IR mRNA)

Razine receptora i IGF – I, mjerene ekspresijom proteina, pokazale su jednaki intenzitet u većine uzoraka adenokarcinoma. Nije nađena povezanost između stadija tumora i ekspresije proteina, mRNA ili apoptoze (tablica 4. 1).

Slični rezultati su nađeni i u skupini 19 karcinoma pluća velikih stanica. Visoka razina IGF – I ( $p = 0.00887$ ) i visoka ekspresija IGF – IR ( $p = 0.0272$ ) smanjuju apoptozu karcinomskih stanica i pozitivno koreliraju s proliferacijskim indeksom izmjerenim putem ekspresije Ki – 67 proteina (tablica 4. 2, slika 4. 3).

**Tablica 4. 2.** Odnos stupnja apoptoze i ekspresije proteina IGF – I, IGF – IR i Ki67 u bolesnika s velikostaničnim karcinomom

| Bolesnik | TNM stadij | IGF – I | IGF – IR | apoptoza (%) | Ki – 67 |
|----------|------------|---------|----------|--------------|---------|
| 1        | IIIA       | 3       | 3        | 6            | 2       |
| 2        | IIIA       | 3       | 3        | 8            | 3       |
| 3        | II         | 3       | 3        | 11           | 2       |
| 4        | IIIA       | 3       | 3        | 12           | 3       |
| 5        | I          | 3       | 3        | 18           | 3       |
| 6        | I          | 3       | 3        | 25           | 2       |
| 7        | IIIA       | 2       | 3        | 9            | 2       |
| 8        | IIIA       | 2       | 3        | 10           | 3       |
| 9        | II         | 2       | 3        | 13           | 3       |
| 10       | IIIA       | 2       | 3        | 17           | 2       |
| 11       | II         | 2       | 2        | 19           | 3       |
| 12       | II         | 2       | 2        | 27           | 1       |
| 13       | I          | 1       | 2        | 19           | 2       |
| 14       | II         | 1       | 1        | 33           | 2       |
| 15       | IIIA       | 1       | 2        | 48           | 1       |
| 16       | IIIA       | 1       | 2        | 68           | 1       |
| 17       | II         | 0       | 2        | 32           | 1       |
| 18       | II         | 0       | 3        | 39           | 1       |
| 19       | II         | 0       | 0        | 55           | 3       |



**Slika 4. 3.** Odnos između IGF – I i IGF – IR i apoptoze u velikostaničnom karcinomu pluća (imunohistokemijska analiza; 0 – negativno, 4 – najjače bojenje)

#### 4. 1. 2. Analiza gubitka heterozigotnosti i mutacije M6P/IGF – IIR

Analizirano je 15 adenokarcinoma i odgovarajućih zdravih tkiva. Deset uzoraka zdravog tkiva je heterozigotno za dva polimorfna markera u genu za M6P/IGF – IIR, a u četvero od njih (40%) nađen je gubitak heterozigotnosti (LOH) u lokusu za M6P/IGF – IIR odgovarajućeg tumorskog uzorka (tablica 4. 3).

**Tablica 4.3.** Ekspresija IGF – II proteina i mutacije gena za M6P/IGF – IIR u adenokarcinomu pluća

| Bolesnik | TNM stadij | IGF – II* | LOH | tip mutacije u genu za M6P/IGF-IIR   | Ki-67* |
|----------|------------|-----------|-----|--|--------|
| 11       | IIIA       | 3         | Da  | G:C → C:G transverzija nukleotid 4033<br>GGT u CGT u egzonu 27/28<br>Gly 1,296 → Arg | 3      |
| 6        | II         | 2         | Da  | G:C → A:T tranzicija nukleotid 4999<br>GCC u ACC u egzonu 34<br>Ala 1,618 → Thr      | 3      |
| 8        | II         | 3         | Da  | G insercija u poli G regiju u egzonu 28<br>nukleotidi 4089 – 4096                    | 3      |
| 1        | I          | 3         | Da  | G:C → A:T tranzicija nukleotid 4999<br>GCC u ACC u egzonu 34<br>Ala 1,618 → Thr      | 3      |
| 15       | IIIA       | 0         | Ne  | Divlji   | 2      |
| 12       | IIIA       | 1         | NU  | Divlji   | 2      |
| 13       | IIIA       | 2         | Ne  | Divlji   | 2      |
| 14       | IIIA       | 2         | Ne  | Divlji   | 1      |
| 4        | II         | 2         | Ne  | Divlji   | 2      |
| 7        | II         | 3         | NU  | Divlji   | 3      |
| 9        | II         | 1         | NU  | Divlji   | 2      |
| 10       | II         | 1         | NU  | Divlji   | 2      |
| 5        | II         | 1         | NU  | Divlji   | 1      |
| 2        | I          | 2         | Ne  | Divlji   | 3      |
| 3        | I          | 1         | Ne  | Divlji   | 1      |

\*imunohistokemijska analiza  
NU – nije učinjeno

Preostali alel u četiri uzorka s LOH ispitivano je za mutacije u veznoj regiji za ligand gena za M6P/IGF – IIR. U dva alela nađena je GCC u ACC mutacija u egzonu 34, što je rezultiralo u zamjeni alanina treoninom na mjestu 1618. U jednog alela nađena je GGT u CGT mutacija u egzonu 27 što je rezultiralo zamjenom glicina argininom na mjestu 1296, dok je u jednog nađeno umetanje gvanina u poli – G ponavljajuću regiju egzona 28 (nukleotidi 4089 – 4096) (Tablica 4.3.).

U preostalim pet uzoraka tumorskog tkiva nije nađena heterozigotnost alela za M6P/IGF – IIR, kao i u tumorskim uzorcima tkiva u kojima u odgovarajućem zdravom tkivu nije nađena heterozigotnost alela za M6P/IGF – IIR.

Nije nađena povezanost gubitka heterozigotnosti i mutacija sa stadijem tumora. Međutim, količina IGF – II proteina i proliferacijskog indeksa (Ki -67) bila je najviša u tumorima s gubitkom heterozigotnosti u jednom alelu s istovremenom točkastom mutacijom u drugom alelu. Nasuprot tome, u tumorima bez gubitka heterozigotnosti i mutacije nađene su niže vrijednosti IGF – II proteina i proliferacijskog indeksa (Ki – 67).

## **4. 2. Karcinom pluća pločastih stanica**

### **4. 2. 1. Odnos između ekspresije M6P/IGF – IIR proteina, apoptoze i mutacija u genu za M6P/IGF – IIR**

U sva četiri uzorka karcinom pluća pločastih stanica nađena je izrazito visoka imunohistokemijska reaktivnost za IGF – II i IGF – IIR. U sva četiri uzorka nađen je gubitak heterozigotnosti u jednom alelu i mutacija u drugom alelu za M6P/IGF – IIR (tablica 4. 4.).

#### 4. 2. 2. Učinak blokirajućeg protutijela za IGF – I receptor na proliferaciju karcinomskih stanica i apoptozu

Od sva četiri uzorka karcinoma pluća pločastih stanica načinjene su kulture stanica. U pokusu je korišteno monoklonsko antitijelo  $\alpha$ IR3 koje blokira vezno mjesto IGF – I receptora kako bi se ispitalo da li blokiranje receptora utječe na proliferaciju i apoptozu karcinomskih stanica. Proliferacija stanica se izrazito smanjila nakon blokiranja IGF – I receptora (za 70 – 95%), dok je istovremeno došlo do porasta apoptoze (za 44 – 70%) (Tablica 4.4.).

**Tablica 4.4.** Ekspresija proteina, IGF – II i IGF – IR, status gena za M6P/IGF – IIR, odgovor na IGF – IR monoklonsko antitijelo u bolesnika s planocelularnim karcinomom pluća

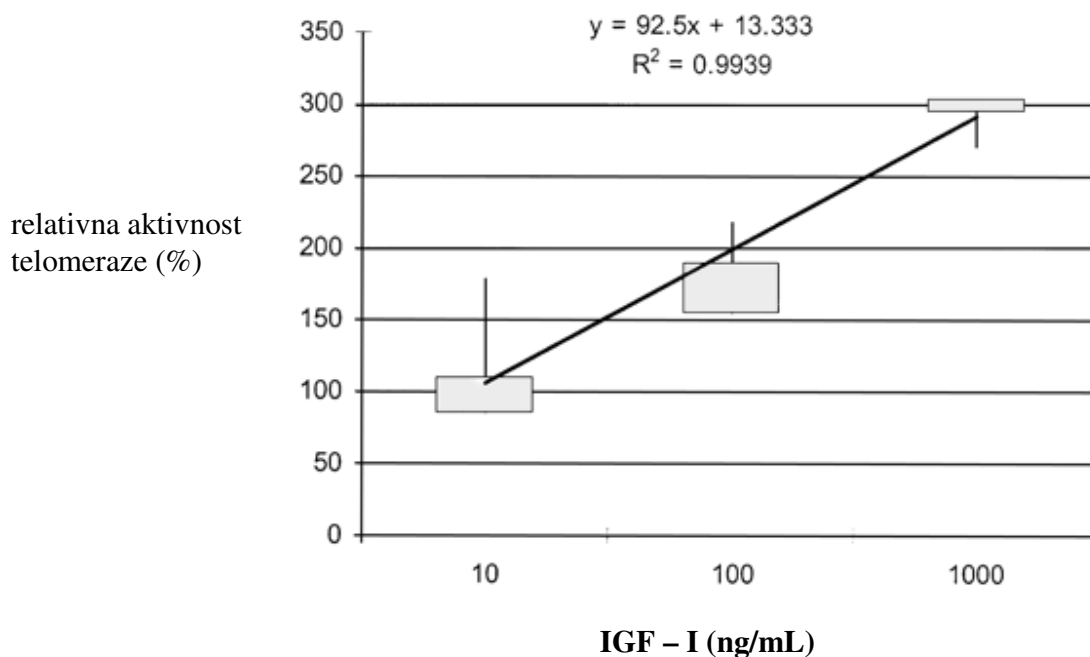
| Bolesnik | Dob | Spol | TNM stadij | IGF – II | IGF – IR | MFP/IGF-IIR LOH/mutacije   | inhibicija rasta* (%) | apoptoza**<br>(prije/poslije) |
|----------|-----|------|------------|----------|----------|--|-----------------------|-------------------------------|
| 1        | 65  | M    | I          | 3        | 3        | C:G → A:T transverzija s stvaranjem alternativnog 5' reznog mjesta u intronu 40  | 95                    | 5/70                          |
| 2        | 45  | M    | II         | 3        | 3        | G:C → T:A transverzija nukleotid 4493<br>GGC u GTC u egzonu 31<br>Gly 1,449 → Val<br>Poremećaj sekundarne strukture Proteina | 88                    | 11/53                         |
| 3        | 79  | M    | IIIA       | 3        | 3        | G:C → A:T transverzija nukleotid 4638<br>GGG u GAG u egzonu 31<br>Gly 1,464 → Glu<br>Poremećaj sekundarne strukture Proteina | 91                    | 3/44                          |
| 4        | 77  | M    | IIIA       | 3        | 3        | C:G → A:T transverzija s stvaranjem alternativnog 5' reznog mjesta u intronu 40  | 70                    | 20/69                         |

\* nakon tretmana s  $\alpha$ IR3 monoklonskim antitijelom

\*\* prije i nakon  $\alpha$ IR3 monoklonskim antitijelom

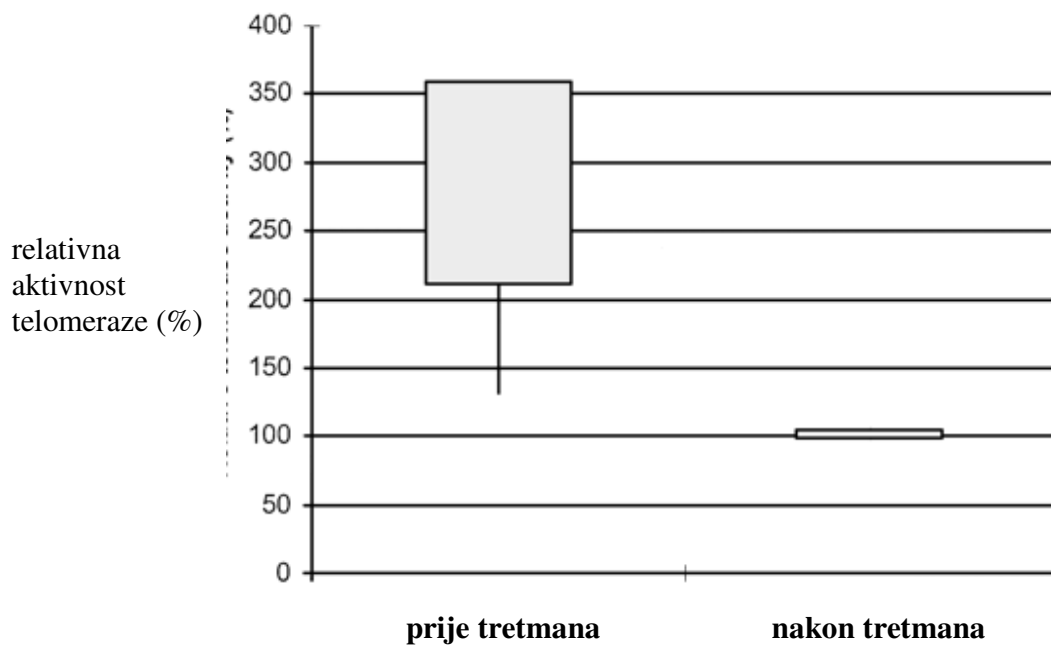
#### 4. 2. 3. Modulacija aktivnosti telomeraze putem sustava IGF – I/IGF - IR

U sve četiri primarne kulture stanica karcinoma pluća pločastih stanica analizirana je aktivnost telomeraze. Učinak IGF – I na aktivnost telomeraze prikazana je na slici 4. 4. Pokazalo se da je relativna aktivnost telomeraze ovisna o dozi IGF – I: jača aktivnost zabilježena je u ispitanika 1 – aktivnost se povećala sa 100% na 300% s povećanjem doze IGF – I dodanog kulturi stanica. U preostala tri ispitanika aktivnost se povećala s dodavanjem najviše koncentracije IGF – I (1000 ng/ml) na 240, 190 i 150%. Suprotno je primijećeno nakon što je kulturi stanica dodano  $\alpha$ IR3, monoklono antitijelo koje blokira aktivnost IGF – I receptora. Prije dodavanja  $\alpha$ IR3 srednja aktivnost telomeraze je bila 280%, dok se nakon dodavanja protutijela aktivnost telomeraze smanjila na 100%. Rezultati su statistički značajni ( $p = 0.03122$ ) (slika 4. 5.).



**Slika 4. 4.** Modulacija aktivnosti telomeraze s IGF – I u planocelularnom karcinomu pluća. Aktivnost telomeraze je određivana nakon inkubacije s 10, 100 i 1000 ng/mL IGF – I kroz 24 h.





**Slika 4. 5.** Inhibicija aktivnosti telomeraze u planocelularnom karcinomu pluća s monoklonskim antitijelom  $\alpha$ IR3.

## 5. RASPRAVA

Inzulinu sličan čimbenik rasta - I koji luče ili tumorske stanice ili stanice zdravog tkiva ima značajnu ulogu u samoj tumorigenezi djelujući na proliferaciju, rast te metastaziranje tumorskih stanica u brojnim tumorima, pa tako i u karcinomu pluća. Većina učinka IGF – I na tumorske stanice ostvaraje se preko IGF – IR čija je aktivacija odgovorna za pozitivan učinak IGF – I na rast i proliferaciju tumora (142, 143). Miyamoto i suradnici su pokazali da je visoka koncentracija cirkulirajućeg IGF – I i smanjena razina IGF – BP3 povezana s povećanim rizikom od razvoja karcinoma pluća (144). U stanicama karcinoma pluća koje pokazuju prekomjernu ekspresiju IGF – IR, inhibicija fosforilacije IGF – IR i smanjene rasta tumorskih stanica može se postići inhibicijom vezanja IGF – I na IGF – IR. IGF – I i IGF – II potiču stvaranje i lučenje metaloproteinaza iz stanica karcinoma pluća te na taj način potiču invazivnost samog tumora. Dosadašnja istraživanja na karcinomskim stanicama pluća in vitro ukazuju na značaj IGF sustava u razvoju karcinoma pluća (145, 146).

Ključnu ulogu u supresiji tumorskog rasta ima poticanje apoptoze u tumorskim stanicama kao odgovor na poremećenu ekspresiju tumorskih onkogeni. Inhibicija apoptoze dovesti će do prekomjernog i ubrzanog rasta tumorskih stanica. Tim mehanizmom, inhibicijom apoptoze, IGF sustav potiče tumorigenezu u karcinomu pluća, kao što je in vitro pokazano u karcinomu pluća nemalih stanica (147). Na sličan način, simultana inhibicija IGF – IR i c-kita u kulturama karcinom pluća malih stanica in vitro dovela je do smanjenja proliferacije te poticanja apoptoze tumorskih stanica (148).

Min i suradnici su genetski blokirali tumorski rast in vitro, tako što su inficirali tumorske stanice rekombinantnim adenovirusom s genom koji je kodirao skraćene IGF – IR. Takvi oštećeni IGF – IR doveli su supresije tumorskog rasta in vitro i in vivo, potaknuli su apoptozu u tumorskim stanicama, te blokirali proliferaciju tumorskih stanica induciranu s IGF – I i IGF - II (149).

Dodatno, epidemiološki podaci ukazuju da povišena razina IGF – I povećava rizik od razvoja karcinoma pluća i ostalih karcinoma (150).

Funkcionalan IGF – IR ima značajnu ulogu u transformaciji stanica iz normalnih u tumorske. Dokaz tome je eksperiment koji je pokazao da stanice koje na površini nemaju IGF – IR nisu podlegle transformaciji bez obzira na prekomjernu ekspresiju antigena SV 40 T, aktivirani ras onkogen, te stimulaciju s epidermalnim faktorom rasta. U tim kulturama došlo je do povećanja razine IGF – I nakon stimulacije s SV 40 T antigenom i epidermalnim faktorom rasta no takve stanice, bez izražaja IGF – IR na površini nisu započele transformaciju. Ovaj eksperiment je također dokaz za važnost autokrine sekrecije IGF proteina iz samih stanica, te samopoticanja tumorigeneze. Drugi važan eksperiment koji je pokazao ulogu IGF – IR receptora u rastu i razvoju normalnih i tumorskih stanica su proveli Seely i sur. Oni su pokazali da embrijski fibroblasti dobiveni iz mišjih IGF – IR knock – out embrija ne rastu i ne proliferiraju nakon dodavanja čimbenika rasta (151).

Rezultati ovog rada ukazuju na važnost inzulinu sličnih čimbenika rasta, njihovih receptora i veznih proteina u patogenezi karcinoma pluća. Razumijevanje uloge i mehanizma djelovanja IGF sustava u razvoju, rastu i progresiji karcinoma pluća napreduje. Autokrina stimulacija IGF – IR od strane IGF – I i IGF – II proteina dokazana je u nekim tumorima epitelnog porijekla, kao što je karcinom kolona, te u karcinomu pluća (126, 152, 153). Slični učinak IGF sustava dokazan je i u hemangiopericitomu te karcinomu želuca (136, 137, 154).

U stanicama karcinoma pluća velikih stanica, stanicama adenokarcinoma i pločastim stanicama nađena je povećana razina IGF – I i IGF – I receptora uz istodobno smanjen broj apoptotičkih stanica. Također, dokazana je i pozitivna korelacija između povišene ekspresije mRNA za IGF – I i IGF – IR i smanjenog broja stanica u kojima je u tijeku apoptoza što upućuje da aktivacija IGF – IR smanjuje apoptozu stanica karcinoma pluća te tako potiče rast tumora. Također, osim pozitivne korelacije ekspresije IGF – I i IGF – IR sa smanjenjem apoptoze nađena je i pozitivna korelacija ekspresije istih molekula s povećanjem proliferacije karcinomskih stanica. Podaci ovog rada sugeriraju da aktivacija IGF sustava, mjerena ekspresijom IGF – I, IGF – II, IGF – IR te ekspresijom njihovih mRNA potiče tumorski rast tako što potiče proliferaciju uz istodobnu inhibiciju apoptoze tumorskih stanica karcinoma pluća nemalih stanica.

U tkivima adenokarcinoma i velikostaničnog karcinoma stupanj proliferacije i apoptoze proporcionalan je stupnju ekspresije IGF – I i IGF – IR. U tkivima sa jačom ekspresijom IGF – I i IGF – IR proliferacija je jače izražena dok je udio apoptotičkih stanica manji. Također, u tkivima s pozitivnom ekspresijom IGF – I mRNA i IGF – IR mRNA apoptoza je slabije izražena.

Nije dokazana razlika u ekspresiji IGF sustava s obzirom na histološki tip tumora. Svi tipovi nemalih stanica koji su istraživani (adenokarcinom, velikostanični karcinom, planocelularni karcinom) pokazuju podjednaku ekspresiju IGF – I, IGF – II i IGF – IR. Također, nije nađena povezanost između ekspresije IGF – I, IGF – IR te apoptoze tumorskih stanica i stadija karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji.

U ovom radu nije direktno dokazana autokrina sekrecija i stimulacija IGF sustava, već je dokazana povećana razina IGF – I i IGF – II proteina, te ekspresija IGF – IR u karcinomskim stanicama. Kako su dva ključna indikatora fenotipa transformiranih stanica dokazana ovim istraživanjem (povećana proliferacija i smanjena apoptoza), može se zaključiti da IGF – I, IGF – II i IGF – IR imaju ulogu u razvoju i rastu karcinoma pluća. Molekularni mehanizam koji dovodi do povećanja ekspresije ovih molekula nije poznat. Do sada je samo pokazana amplifikacija IGF – IR lokusa u malom broju uzoraka karcinoma dojke i melanoma (155).

Za razliku od IGF – IR čijom aktivacijom dolazi poticanja tumorigeneze, M6P/IGF – IIR aktivira inhibitor rasta tumora TGF –  $\beta$  te vezanjem na sebe smanjuje koncentraciju i učinak IGF – II (156). Vezanje IGF – II i M6P/IGF – IIR rezultira s razgradnjom IGF – II te na taj način onemogućava aktivaciju IGF – IR. Poremećaj M6P/IGF – II receptora može pridonijeti razvoju i rastu tumora. U brojnim tumorima dokazana je mutacija M6P/IGF – IIR, uključujući i planocelularni karcinom pluća (126, 132). Oba mehanizma, aktivacija TGF –  $\beta$ , te smanjenje koncentracije IGF – II ukazuju na tumor – supresorsku ulogu M6P/IGF – IIR.

U četiri uzorka tkiva od 15 adenokarcinoma nađen je gubitak heterozigotnosti alela i mutacije gena za M6P/IGF – IIR. Također, u četiri uzorka planocelularnog karcinoma nađene su mutacije gena za taj receptor. U tkivima adenokarcinoma nađena su tri tipa mutacija koje dovele do gubitka heterozigotnosti: G:C u C:G transverzija, G:C u A:T tranzicija te insercija G u poli – G regiju. Sva tri tipa mutacija rezultirala su promjenom

strukture M6P/IGF – II receptora te njegovom disfunkcijom. U tkivima planocelularnog karcinoma nađena su također tri tipa mutacija u genu za M6P/IGF – IIR: C:G u A:T transverzija, G:C u T:A transverzija te G:C u A:T tranzicija. Ove mutacije su također dovele do poremećaja u strukturi receptora te posljedične disfunkcije. U tkivima s najjače izraženom ekspresijom IGF – II i/ili IGF – IR nađene su mutacije i gubitak heterozigotnosti gena za M6P/IGF – IIR.

Rezultati rada pokazuju da ključnu ulogu u razvoju karcinoma pluća ima bioraspoloživost IGF proteina jer su promjene u samom genu (LOH i mutacije) nađene u tkivima s najjačom ekspresijom IGF – II i IGF – IR. Mutacije su nađene u oba alela ovog gena supresora tumora, što je u skladu s Knudsonovom hipotezom dvostrukog pogotka. Gubitak anti – onkogene aktivnosti, te posljedična neoplastična transformacija stanica je u skladu s ranijim istraživanjima (157).

Telomere su genski segmenti koji se nalaze na krajevima kromosoma. Uloga telomeraza je da čuvaju i štite krajeve kromosoma. Načinjene su od ponavljajućih segmenata DNA. DNA polimeraza ne može replicirati telomere. Kao posljedica nemogućnosti replikacije krajeva kromosoma dolazi do postupnog skraćanja krajeva kromosoma, starenja i u konačnici smrti stanice. Telomeraze su enzimi koji dodaju segmente telomera na krajeve kromosoma koristeći RNA matricu te na taj način sprečavaju skraćenje kromosoma i starenje stanica (158).

Prisutnost telomeraza u ljudskim karcinomskim stanicama nužna je za beskonačnu proliferaciju tumorskih stanica. Progresivno skraćenje telomera i aktivacija telomeraza je jedan od ključnih mehanizama u održanju strukturnog integriteta kromosoma, stanične besmrtnosti i progresije tumora. Aktivacija telomeraza dokazana je u brojnim tkivima ljudskih karcinoma (159).

Ponašajući se u skladu s onkogenima i mutiranim genima supresorima tumora, ekspresija telomeraza povezana je s malignim fenotipom. Telomeraze su nađene u više od 90% ljudskih karcinoma, te su 50 – 80% aktivnije nego u normalnim stanicama.

Ovo istraživanje pokazalo je povećanu telomerazu u četiri uzorka tkiva planocelularnog karcinoma pluća. Taj nalaz ukazuje na nužnost tog enzima za održanje malignog fenotipa.

Kako je aktivacija telomeraza nužna za staničnu besmrtnost i posljedičnu tumorigenezu, blokiranje aktivnost telomeraze moglo bi predstavljati potencijalni terapijski cilj. Brojni radovi opisuju takav pristup.

Međutim, u ovom radu korišten je alternativni pristup. U sva četiri uzorka dokazana je povećana aktivnost telomeraze. Aktivacijom IGF – IR receptora s IGF – I dolazi do povećanja aktivnosti telomeraze. Stostruko povećanje koncentracije IGF – I (s 10 ng/mL na 1000 ng/mL) dovodi do povećanja aktivnosti telomeraze za 300%. Kako je dokazana povećana aktivnost telomeraze, te je također dokazana povećana ekspresija IGF – IR u stanicama planocelularnog karcinoma pluća, blokadom IGF – IR trebalo bi doći do smanjenja aktivnosti telomeraze. Nakon inkubacije tumorskog tkiva s monoklonskim antitijelom  $\alpha$ IR3 došlo je do smanjenja prosječne aktivnosti telomeraze s 280% na 100% što je statistički značajno ( $p = 0.03122$ ). Blokadom IGF – IR došlo je do smanjenja aktivnosti telomeraze pa zbog toga blokada IGF – IR predstavlja zanimljiv potencijalan terapijski cilj. Rezultati sugeriraju da je jedan od mehanizama razvoja, rasta i progresije planocelularnog karcinoma pluća ovisan o IGF – I/IGF – II/IGF – IR sustavu. Amehanizam kojim aktivirani IGF – IR ostvaruje svoj učinak je aktivacija telomeraze. Međutim, intermedijarne molekule, koje povezuju IGF – IR te gene za telomerazu nisu poznate pa su potrebna daljnja istraživanja. Vjerojatni mehanizam ide preko fosfatidiliinozitol – 3 – fosfata (IP3) i NF $\kappa$ B sustava, što sugeriraju radovi na kulturama karcinoma pluća malih stanica i kulturama multiplog mijeloma (160, 161).

Rezultati rada ukazuju da je na površini stanica karcinoma pluća nemalih stanica prisutna prekomjerna ekspresija IGF – I, IGF – II, i IGF – IR, što ukazuje na značaj IGF sustava u razvoju i rastu karcinoma pluća nemalih stanica. Dodatno, promjene u genu za M6P/IGF – IIR mogu doprinijeti tumorigenezi. U radu je dokazano da poremećaj samog M6P/IGF – IIR, koji ima djelovanje gena supresora tumora, dodatno doprinosi tumorigenezi. Jedan od mehanizama kojim IGF sustav potiče rast i razvoj tumora je aktivacija telomeraze.

U patogenezi karcinoma pluća, kao i drugih solidnih tumora, sudjeluju brojni regulatorni mehanizmi. Unazad desetak godina, bazična i klinička istaživanja doprinijela su boljem razumijevanju tih mehanizama. Danas su uveliko poznati molekularni mehanizmi brojnih genetskih i epigenetskih promjena, autokrine stimulacije rasta, imunosupresije uzrokovane samim tumorom, te poremećaja u angiogenezi. Razumijevanje mehanizama

te otkriće molekula koje sudjeluju u razvoju navedenih promjena omogućuju korištenje tih molekula kao prognostičkih i prediktivnih čimbenika. Tako je poznato da prekomjerna ekspresija ili nedostatak nekih molekula doprinosi lošijoj prognozi bolesnika, te može predvidjeti čak i učinak terapije što omogućava primjenu odgovarajuće ciljane terapije u bolesnika s poremećajem pojedinih molekula.

Tako na primjer, bolesnici s karcinomom pluća koji imaju mutaciju gena supresora tumora p53 imaju lošiju prognozu. Međutim, mutacija gena supresora tumora p53 pokazuje bolji odgovor na kemoterapiju temeljenu na platini, te na radioterapiju (162).

Slične prediktivne i prognostičke vrijednosti imaju i drugi brojni geni supresora tumora kao što su K – ras, Rb, p27/Kip, potom proto – onkogeni kao što su erbB1/EGFR, erbB2/HER2, bcl – 2, te brojni drugi faktori rasta, citokini te imunomodulatori (162).

Same navedene molekule i mehanizmi u kojima sudjeluju predstavljaju značajan potencijalan terapijski cilj u bolesnika s karcinomom. Tako su danas u kliničkoj primjeni prisutni takozvani 'pametni' lijekovi koji ciljano blokiraju pojedine molekule i njihove receptore te na taj način zaustavljaju rast i progresiju tumora. Najznačajniji u kliničkoj primjeni su herceptin, blokator HER2 receptora koji se primjenjuje u liječenju karcinoma dojke, te dva blokatora receptora za epidermalni faktor rasta, gefitinib i erlotinib, koji se uspješno primjenjuju u liječenju karcinoma pluća nemalih stanica.

Prepoznavanje molekula koje sudjeluju u tumorigenezi, potaknulo je brojna istraživanja o ne samo prognostičkoj, već i prediktivnoj vrijednosti bioloških markera. Mogućnost procijene učinkovitosti pojedinih lijekova predstavlja značajan doprinos individualizaciji i planiranju terapije prema svakom bolesniku.

Prepoznavanje prognostičkih i prediktivnih bioloških markera predstavlja napredak i pomjenu u poimanju stajinga samih karcinoma. Tako će osim samog kirurško - histološkog određivanja stupnja proširenosti tumora biti potrebno odrediti i «molekularni stajing» koji će doprinijeti primjeni odgovarajuće, po mogućnosti ciljane terapije.

Rezultati ovog rada, kao i brojna istraživanja do sada, sugeriraju važnost IGF sustava u patogenezi karcinoma, uključujući i karcinom pluća. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredila točna pozicija IGF sustava u samoj patogenezi, te međudjelovanje IGF sustava s ostalim molekularnim mehanizmima koji sudjeluju u patogenezi karcinoma pluća. Također su potrebna daljnja istraživanja kako bi se odredile prognostičke i

prediktivne vrijednosti IGF sustava i njegovih pojedinih komponenti u bolesnika s karcinom pluća.

Za sada, modulacija IGF i GH sustava ostaje zanimljiv eksperimentalan terapijski cilj. Blokodom IGF sustava može se utjecati na rast i razvoj tumora. Praktički bilo koji dio GH/IGF sustava predstavlja potencijalni terapijski cilj, od razine hipotalamusa i hipofize do samih receptora na ciljnim tkivima.

Antagonisti GHRH su u eksperimentalnim modelima uspješno smanjili autokrinu i parakrinu sekreciju IGF – I i IGF – II djelujući direktno na tumorsko tkivo. Antagonisti GHRH mogu utjecati na IGF sustav direktno i indirektno. Indirektni mehanizam je blokodom lučenja GHRH iz hipotalamusa, a direktni učinak se ostvaraju u tumorskom tkivu (143).

Analozi somatostatina, blokatora lučenja hormona rasta iz hipofize, također su dokazali svoju učinkovitost in vitro. Antineoplastična aktivnost analoga somatostatina se ostvaruje putem smanjenja lučenja hormona rasta u hipofizi, te inhibicije stvaranja IGF – I (143).

Također su u fazi istraživanja i antagonisti receptora hormona rasta, koji izazivaju smanjene koncentracije cirkulirajućeg IGF – I (143).

Kako je već navedeno u više navrata, jednu od ključnih uloga u nastanku i održavanju maligne transformacije ima IGF – IR. Brojni eksperimentalni modeli pokazali su da blokodom IGF – IR ne dolazi do maligne transformacije stanica nakon inkubacije s molekulama koje stimuliraju malignu transformaciju. Također, dominantno negativna tkiva za IGF – I ne pokazuju malignu transformaciju nakon inkubacije s promotorima tumorigeneze. Zaključno, dva su potencijalna mehanizma kojima bi se moglo utjecati na IGF – IR. To je ponajprije monoklonsko antitijelo  $\alpha$ IR3 koje specifično blokira IGF – IR, te infekcija tumorskih stanica s retrovirusima koja dovodi do stvaranja dominantno negativnih stanica za IGF. Međutim, potrebna su daljina istraživanja kako bi se procijenila klinička učinkovitost navedenih terapijskih pristupa (143).



## 6. ZAKLJUČAK

U patogenezi karcinoma pluća sudjeluju brojni molekularni mehanizmi odgovorni za razvoj, rast, progresiju i metastaziranje tumora. Rezultati ovoga rada sugeriraju da IGF sustav, prije svega IGF – I, IGF – II i IGF – IR imaju jednu od ključnih uloga u razvoju karcinoma pluća. Karcinomi pluća pokazuju prekomjernu ekspresiju IGF – I, IGF – II i IGF – IR. U karcinomskom tkivu s prekomjernom ekspresijom navedenih molekula prisutna je pojačana proliferacija stanica uz istodobno smanjenu apoptozu što doprinosi tumorskom rastu. Jedan od potencijalnih mehanizama kojima IGF – I i IGF – II ostvaraju svoj tumorigeni učinak je aktivacija IGF – IR, koji potom aktivira telomerazu. Aktivacija telomerase doprinosi tumorskom razvoju i rastu tako da dovodi do besmrtnosti tumorskih stanica.

Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se procijenila prognostička i prediktivna vrijednost IGF sustava i njegovih pojedinih komponenti. IGF sustav predstavlja zanimljiv potencijalan terapijski cilj, no potrebna su daljnja istraživanja kliničke učinkovitosti postojećih eksperimentalnih terapijskih postupaka.

## 7. SAŽETAK

U patogenezi karcinoma pluća, kao i u ostalim solidnim tumorima, brojne promjene u biološkim regulatornim putovima imaju značajnu ulogu. IGF - I koji luče ili tumorske stanice ili stanice zdravog tkiva ima značajnu ulogu u samoj tumorigenezi djelujući na proliferaciju, rast te metastaziranje tumorskih stanica u karcinomu pluća. Većina tumorskih stanica odgovara na stimulaciju inzulinu sličnih čimbenika rasta putem IGF – IR. U stanicama karcinoma pluća velikih stanica, stanicama adenokarcinoma i pločastim stanicama nađena je povećana razina IGF – I i IGF – IR uz istodobno smanjen broj apoptotičkih stanica. Dokazana je i pozitivna korelacija između povišene ekspresije mRNA za IGF – I i IGF – IR i smanjenog broja stanica u kojima je u tijeku apoptoza što upućuje da aktivacija IGF – IR smanjuje apoptozu stanica karcinoma pluća te tako potiče rast tumora. Nađena je i pozitivna korelacija ekspresije istih molekula s povećanjem proliferacije karcinomskih stanica. U četiri uzorka tkiva od 15 adenokarcinoma nađen je gubitak heterozigotnosti alela i mutacije gena za M6P/IGF – IIR. U planocelularnom karcinomu dokazana je povećana aktivnost telomeraze. Aktivacija telomeraza ima za posljedicu besmrtnost tumorskih stanica. Rezultati ovoga rada sugeriraju da IGF sustav, prije svega IGF – I, IGF – II i IGF – IR imaju jednu od ključnih uloga u razvoju karcinoma pluća.

## **8. ABSTRACT**

### **The Consequences of Insulin – Like Growth Factors/Receptors Dysfunction in Non – Small Cell Lung Cancer**

**2007**

**Marko Jakopović, MD**

Numerous changes in biological pathways have significant role in pathogenesis of lung cancer. IGF – I, secreted by tumorous or normal tissue, has a significant role in tumorigenesis of cancer, influencing proliferation, growth and metastasing of cancer cells. Majority of tumorigenic effects of IGFs is mediated through IGF – IR. Increased expression of IGF – I, IGF - II and IGF – IR were found in lung cancer cell, with increased proliferation and decreased apoptosis of cancer cells. In four samples of adenocarcinoma loss of heterozigosity for M6P/IGF – IIR was found. In planocellular carcinoma increased activity of telomerase was found. Increased activity of telomerase has a role in cancer cell immortality. Results of this study suggests that disruption in IGF/IGF receptor axis is involved in tumorigenesis of non – small cell lung cancer.

## 9. LITERATURA

1. Copeman PW, Cowell TK, Dallas NL. Lung cancer and smoking. *Lancet* 1964; 18: 1374-5.
2. Edinburg Lung Cancer Group. Patients presenting with lung cancer in south east Scotland. *Thorax* 1987; 42 (11): 853-7.
3. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059 – 68.
4. Mountain CF. Revisions in the International system for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 11: 1710 – 1717.
5. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 1997; 111: 1718 – 1723.
6. Emanuel EJ, Emanuel LL. Palliative and end – of – life care. U: Kasper I sur., ur. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th edition. McGraw – Hill, New York, 2005: 53 – 66.
7. Blay YL, Le Cesne A, Alberti L, Ray – Coquart I. Targeted cancer therapies. *Bull Cancer* 2005; 92 (2): E 13 – 18.
8. Reck M, Gatzemeier U. Gefitinib ("Iressa"): a new therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Respir Med* 2005; 99 (3): 298 – 307.
9. Perez – Soler R. The role of erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4238s – 4240s.
10. Raben D, Helfrich B. Angiogenesis inhibitors: a rational strategy for radiosensitization in the treatment of non-small-cell lung cancer? *Clin Lung Cancer* 2004; 6 (1): 48 – 57.
11. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20: 105-27.

12. Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, et al. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 668-75.
13. Vahakangas KH, Bennet WP, Castren K, et al. p53 and K-ras mutations in lung cancer from former and never-smoking women. *Cancer Res* 2001; 61: 4350-6.
14. Noda N, Matsuzoe D, Konno T, et al. K-ras mutations in non-small lung cancer in Japanese. *Oncol Rep* 2001; 8: 889-92.
15. Rosell R, Li S, Skacel Z, et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 1993; 8:2407-12.
16. Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carinogenesis* 1999; 20: 1507-10.
17. Tammemagi MC, McLaughlin JR, Bull SB. Meta-analyses of p53 suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8; 625-34.
18. Bennet WP, Hussain SP, Vakahangas KH, et al. Molecular epidemiology of human cancer risk:gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol* 1999; 187:8-18.
19. Liebers U, Wolff G, Witt C. Molekulare Medizin in Diagnostik und Therapie des Bronchialkarzinoms. *Atemw-Lungenkrkh* 2000; 26:290-5.
20. Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
21. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-4.
22. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, et al. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta analysis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4055-63.
23. Kandioler-Eckersberger D, Kappel S, Mittelbock M, et al. Tje TP53 genotype but not immunohistochemical result is predictive of response to cis-paltin-based

- neoadjuvant therapy in stage III non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117:744-50.
24. Matsuzoe D, Hideshima T, Kimura, et al. p53 mutations predict non-small cell lung carcinoma response to radiotherapy. *Cancer Lett* 1999; 135: 189-94.
  25. Cassinelli G, Supino R, Perego P, et al. A role for loss of p53 function in sensitivity of ovarian carcinoma cell to taxanes. *Int J Cancer* 2001; 92:738-47.
  26. Osaki S, Nakanishi Y, Takayama K, et al. Alteration of drug sensitivity by the adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene in human lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2000; 7:300-7.
  27. Picard E, Seguin C, Monhoven N, et al. Expression of retinoic receptor genes and proteins in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1059-66.
  28. Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 695-99.
  29. Cagle PT, El-Naggar AK, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF. Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1997; 150: 393-400.
  30. Dosaka-Akita H, Hu SX, Fujino M, et al. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: Its synergistic effects with altered ras and p53 protein status and prognosis. *Cancer* 1997; 79: 1329-37.
  31. Rusin MR, Okamoto A, Chorazy M, et al. Intragenic mutations of the p16 (INK4A), p15 (INK4B) and p18 genes in primary non-small cell lung cancers. *Int J cancer* 1996; 65:734-9.
  32. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, et al. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer cell lines that retains wildtype RB. *Oncogene* 1994; 9: 3375-8.
  33. Keum JS, Kong G, Yang SC, et al. Cyclin D<sub>a</sub> overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999; 81:127-32.

34. Catzevalos C, Tsao MS, de Boer G, et al. Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in non-small cell lung carcinoma: a prognostic factor independent of Ras. *Cancer Res* 1999;59: 684-8.
35. Esposito V, Baldi A, de Luca A, et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3381-7.
36. Oshita F, Kameda Y, Nishio K, et al. Increased expression levels of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 correlate with good responses to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2000; 7: 491-5.
37. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 2002; 62: 4132-41.
38. Di Gennaro, barbarino M, Bruzzese F, et al. Critical role of both p27/Kip and P21CIP1/WAF1 in antiproliferative effect of ZD1839 ('Iressa'), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells. *J Cell Physiol* 2003; 195; 139-50.
39. Monzo M, Rosell R, Sanchez JJ, et al. Paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1786-93.
40. Meert AP, Martin B, Delmotte P, et al. The role of EGF – R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J* 2002; 20: 975: 81.
41. Nakamura H, Saji H, Ogata A, et al. Correlation between encoded protein overexpression and copynumber of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103; 61-6.
42. Meert AP, Martin B, Paesmans M, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89: 959-65.
43. Cappuzzo F, Gregore V, Rossi E, et al. Gefitinib in pretreated non-small cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLS. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2658-63.

44. Blagsoklonny MV, Schulte TW, Nguyen P, et al. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* 1997; 57: 130-5.
45. haldar S, Basu A, Croce CM, et al. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 229-33.
46. Singh-Kaw P, Zarnegar R, Siegfried JM. Stimulatory effects of hepatocyte growth factor on normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1995; 268: L1012-20.
47. Tsao MS, Yang Y, Marcus A, et al. Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol* 2001; 32:57-65.
48. Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, et al. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 433-9.
49. Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* 1996; 56: 370-6.
50. Krystal GW, Honsawek S, Litz J, et al. the selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin cancer Res* 2000; 6: 3319-26.
51. Norgard P, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Expression and autoregulation of transforming growth factor  $\beta$  receptor mRNA in small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1996; 73: 1037.
52. Fischer JR, Darjes H, Lahm H, et al. Constitutive secretion of bioactive transforming growth factor  $\beta$ 1 by small cell lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1994;30A:2125-9.
53. Fischer JR, Schindel M, Bulzebruck H, et al. Decrease of interleukin-2 secretion is a new independent prognostic factor associated with poor survival in patients with small cell lung cancer. *Ann Oncol* 1997; 8: 457-61.
54. Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, et al. Clinical implications of interleukin (IL) – 10 induced by non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2000; 11: 815-9.



55. Neuner A, Schindel M, Wildenberg U, et al. Prognostic significance of cytokine modulation in non small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2002; 101: 287-92.
56. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, et al. Cyclooxygenase – 2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 861-7.
57. Fontanini G, Faviana P, Lucchi M, et al. A high vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavourable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 558-63.
58. Han H, Silverman JF, Santucci TS, et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage – I non-small cell lung cancer correlates with neovascularization and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 72-29.
59. Gregorc V, Ludovini V, Pistola L, et al. Vascular endothelial growth factor serum levels correlate with extension of NSCLC disease. *ASCO* 2001, abstract 3055.
60. Masuya D, Huang C, Liu D, et al. The intratumoral expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 associated with angiogenesis in nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer* 2001; 92; 2628-38.
61. Yuan A, Yang P, Yu CJ, et al. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small cell lung cancer. *Am J respir Crit Care Med* 2000; 162: 1957-63.
62. Michael M, Babic B, Khokha R, et al. Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1802-8.
63. Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103:647-51.
64. Daughaday WH. A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspect Biol Med* 1989; 32: 194-211.

65. Salmon Jr WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957; 49: 825-931.
66. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 1996; 17 (5): 481-517.
67. LeRoith D. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1993; 336: 633-40.
68. LeRoith D. Insulin-like growth factors. *Ann NY Acad Sci* 1993; 692:1-9.
69. ranke MB, Elmlinger M. Functional role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Res* 1997; 48S:9-15.
70. D'Ercole AL. Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25; 573.90.
71. resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P, Baserga R. The insulin-like growth factor-I-receptor protects tumor cells from poposis in vivo. *Cancer Res* 1995; 55: 2463-9.
72. O'Dell SD, Day IN. Molecules in focus: insulin-like growth factor II (IGF – II). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 767-771.
73. Braulke T. Type – 2 IGF receptor: a multi ligand binding protein. *Horomon Metab Res* 1999; 31: 242-6.
74. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Natural growth and development in the basence of hepatic insulin-like growth factor-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7324-9.
75. Murphy LJ, Friesen HG. Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic inulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology* 1988; 122:325-332.
76. Penhoat A. Naville D, Jaillard C, Chatelain PG, Saez JM. Hormonal regulation of insulin-like growth factor I secretion by bovine adrenal cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 6858-62.
77. Hofbauer LC, Rafferzeder M, Janssen OE, Gartner R. Insuulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles is regulated by thyrotropin and iodine. *Eur J Endocrinol* 1995; 132; 605-10.

78. Adamo ML, Neuschwander S, LeRoith D, Roberts Jr CT. Structure, Expression, and regulation of the IGF – I gene. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343:1-11.
79. Sussenbach JS, Rodenburg RJ, Scheper W, Holthuisen P. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the human IGF – II expression. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 63-71.
80. Kim Ht, Choi BH, Niikawa N, Lee TS, Chang SI. Frequent loss of imprinting of the H19 and IGF – II genes in ovarian tumors. *Am J Med Genet* 1998; 80:391-5.
81. Nonomura N, Miki T, Nishimura K, Kanno N, Kojima Y, Okuyama A. Altered imprinting of the H19 and insulin-like growth factor II genes in testicular tumors. *J Urol* 1997; 57: 1977-9.
82. Wu MS, Wang HP, Lin CC, Sheu JC, Shun CT, Lee WJ, Lin JT. Loss of imprinting and overexpression of IGF2 gene in gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett* 1997; 129:9-14.
83. Lowe Jr WL, Adamo M, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D. Regulation by fasting of insulin-like growth factor-I and its receptor. Effects on gene expression and binding. *J Clin Invest* 1989; 84:619-626.
84. Beitner-Johnson D, Werner H, Roberts Jr CT, LeRoith D. Regulation of insulin-like growth factor-I receptor gene expression by Sp1; physical and functional interactions of Sp1 at GC boxes and a CT element. *Mol Endocrinol* 1995 9;1147-1156.
85. Hernandez-Sanchez C, Werner H, Roberts Jr CT, Woo EJ, Hum DW, Rosenthal SM, LeRoith D. Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor. *J Biol Chem* 1997; 272:4663-70.
86. Zhang L, Kasanichi F, Zhan Q, Zhan S, Brady JN, Fornace AJ, Seth P, Helman LJ. Regulation of insulin-like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 1367-73.
87. Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS. The human cation-independent mannose-6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full length cDNA and expression of functional receptor in cos cells. *J Biol Chem* 1988;263:2553-2562.

88. Okamoto T, Nishimoto I, Murayama Y, Ohkuni Y, Ogata E. Inulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor is incapable of activating GTP-binding proteins in response to mannose-6-phosphate, but capable in response to insulin-like growth factor-II. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 1201-10.
89. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flybjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21 (3): 215-44.
90. Sandberg AC, Engberg C, Lake M, von Holst H, Sara VR. The expression of insulin-like factor- I and insulin – like factor – II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neurosci Lett* 1988; 93:114-9.
91. Hirano H, Lopes MBS, Laws ER, Asakura T, Goto M, Carpenter JE, Karns LR, Vanderberg SR. Insulin-like growth factor-I content and pattern of expression correlates with histopathologic grade in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neurooncology* 1999; 1. 109-19.
92. Glick RP, Unterman TG, Hollis R. Radioimmunoassay of insulin-like growth factors in cyst fluid of central nervous system tumors. *J Neurosurg* 1991; 74: 972-978.
93. Sara VR, Prissel P, Sjogren B, Persson L, Boethius J, Engberg G. Enhancement of insulin-like growth factors – II receptors in glioblastoma. *Cancer Lett* 1986; 32: 229-34.
94. Lichtor T, Kurpakus MA, Gurney ME. Expression of insulin-like growth factors and their receptor in human meningeomas. *J Neurooncol* 1993; 17: 183-90.
95. Sandberg-Nordquist AC, Peyrard M, Patterson H, Mathiesen T, Collins VP, Dumanski JP, Schalling M. A high ratio of insulin – like growth factor-II/IGFBP-2 mRNA as a marker for anaplasia in meningeomas. *Cancer Res* 1997; 57: 2611-14.
96. Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CO, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, Shows TB. Enhanced levels of insulin – like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* 1986; 46: 6169-6173.
97. Kawamoto K, Onodera H, Kondo S, Kan S, Ikeuchi D, Maetani S, Imamura M. Expression of insulin – like growth factor-II can predict the prognosis of human

- colorectal cancer patients: correlation with tumor progression, proliferative activity and survival. *Oncology* 1998; 55:242-8.
98. Kawamoto K, Onodera H, Kan S, Kondo S, Imamura M. Possible paracrine mechanism of insulin-like growth factor –2 in the development of liver metastasis from colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 85:18 – 25.
99. Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S, Laburthe M. Ekspression of two types of receptor for insilin – like growth factors in human colonic epithelium. *Gastroenterology* 1990; 98: 703-7.
100. Thompson MA, Cox AJ, Whitehead RH, Jonas HA. Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by inulin- like growth factor-II: an in vitro model. *Endocrinology* 1990; 126: 3033-42.
101. Ohmura E, Okada M, Onaoda N, Kamiya Y, Murakami H, Tshushima T, Shizume K. Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor  $\alpha$  as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res* 1990; 50:103-7.
102. Bergmann U, Funatomi H, yokoyama M, Beger HG, Korc M. Insulin – like growth factor-I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* 1995; 55: 2007-11.
103. Tsai TF, Yauk YK, Chou CK, Ting LP, Chang C, HU CP, Han SH, Su TS. Evidence of autocrine regulation in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 153:39-45.
104. Cariani E, Lasserre C, Seurin D, hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C. Differential expression of insulin-like growth factor mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res* 1988; 48: 6844-9.
105. Huff KK, Kaufman D, Gabbay KH, Spencer EM, Lippman ME, Dickson RB. Secretion of an insulin – like growth factor-I related protein by human breast cncer cells. *Cancer Res* 1986; 46: 4613-9.
106. Osborne CK, Coronado EB, Kitten LJ, Arteaga CI, Fuqua SA, Ramasharma K, Marshall M, Li CH. Insulin-like growth factor-II: a potential

- autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via IGF-I receptor. *Mol Endocrinol* 1989; 3:1701-9.
107. Furlanetto RW, DiCarlo JN. Somatomedin-C receptors and growth factors effects in human breast cancer cells maintained in long-term tissue culture. *Cancer Res* 1986; 44: 2122-8.
  108. Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor (IGF)-independent actions of IGF-binding-protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem* 1993; 268:4964-71.
  109. Yee D, Morales FR, Hamilton TC, Von Hoff D.D. Expression of insulin-like growth factor-I, its binding proteins, and its receptors in ovarian cancer. *Cancer Res* 1991; 51:5107-12.
  110. Klienamn D, Roberts Jr CT, LeRoith D, Schally AV, Levy J, Sharoni Y. Regulation of endometrial cancer cell growth by insulin-like growth factors and the leutinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Regul Pept* 1993; 48:91-98.
  111. Rutanen EM, Nyman T, Lehtovirta P, Ammala M, Pekonen F. Suppressed expression of insulin-like growth factor binding protein-I mRNA in the endometrium: a molecular mechanism associating endometrial cancer with its risk factors. *Int J Cancer* 1994; 59: 307-12.
  112. Pearl ML, Talavera F, Gretz III HF, Roberts JA, Menon KM. Mitogenic activity of growth factors in the human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC-1-A and KLE. *Gynecol Oncol* 1993; 49:325-332.
  113. Cohen P, Peehl DM, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors and IGF binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 401-7.
  114. Figureoa JA, Lee AV, Jackson JG, Yee D. Proliferation of cultured human prostate cancer cells is inhibited by insulin-like growth factor (IGF) binding protein – 1: evidence for an IGF-II autocrine growth loop. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;60: 3476-82.

115. Mantzoros CS, Tzonou A, Signorello LB, Stampfer M, Trichopoulos D, Adami HO. Insulin-like growth factor-I in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer* 1997; 76: 1115-8.
116. Jungwirth A, Schally AV, Pinski J, Groot K, Armatis P, Halmos G. Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits in vivo proliferation of Caki-I renal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5810-3.
117. Raile K, Hoflich A, Kessler U, Yang Y, Pfuender M, Blum WF, Kolg H, Schwarz HP, Kiess W. Human osteosarcoma (U-2 OS) cells express both insulin-like growth factor (IGF) – I receptors and IGF – II receptors and synthesize IGF – II: autocrine growth stimulation by IGF-II via the IGF receptor. *J Cell Physiol* 1994; 159:531-41.
118. Rodeck U, Herlyn M, Nenssen HD, Furlanetto RW, Koprowski H. Metastatic but not primary melanom cell lines grow in vitro independently of exogeneous growth factors. *Int J Cancer* 1987; 40: 687-90.
119. Neely EK, Morhenn VB, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratocytes and a squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 1991; 96:104-10.
120. Vetter U, Schlickerrieder JH, Zapf J, Hartmann W, Heit W, Hitzler H, Byrne P, Gaedicke G, Heinze E, Teller WM. Human leukemic cells: receptor binding and biological effects of insulin and insulin-like growth factors. *Leukemia Res* 1986; 10: 1201-7.
121. Estrov Z, Meir R, Barak Y, Zaizov R, Zadik Z. Human growth hormone and insulin-like growth factor-I enhance the proliferation of human leukemic blasts. *J Clin Oncol* 1991; 9: 394-9.
122. Minuto F, Del Monte P, Barreca A, Alama A, Cariola G, Catrambone G, Giordano G. Evidence for increased somatomedin – C/insulin-like growth factor – I on an established human lung cancer cell line. *Cancer Res* 1986; 46: 985-8.
123. Nakanishi Y, Mulshine JL, Kasprzyk PG, Natale RB, Maneckjee R, Avis I, Treston AM, Gazdar AF, Minna JD, Cuttitta F. Insulin-like growth factor-I can

- mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell line *in vitro*. *J Clin Invest* 1988; 82:354-359.
124. Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Ciernik IF, Carbone DP. Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor-I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56:3038-41.
125. Long L, Rubin R, Brodt P. Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells over expressing the type I IGF receptor. *Exp Cell Res* 1998;238:116-21.
126. Pavelić J, Pavelić LJ, Karadža J, Križanac Š, Unušić J, Spaventi Š, Pavelić K. Insulin – like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma. *Mol Med* 2002; 8: 149-157.
127. Reeve JG, Morgan J, Schwander J, Bleehen NM. Role for membrane and secreted insulin – like growth factor – binding protein – 2 in the regulation of insulin-like growth factor action in lung tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 4680-4685.
128. Reeve JG, Brinkman A, Hughes S Mitchell J, Schwander J, Bleehen NM. Expression of insulin – like growth factor (IGF) and IGF – binding protein in human lung tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 628-634.
129. Reeve JG, Payne JA, Bleehen NM. Production of immunoreactive insulin-like growth factor I (IGF – I) and IGF – I binding protein by human lung tumors. *Br J Cancer* 1990; 61: 727-731.
130. Jaques G, Kiefer P, Schoneberger HJ, Wegmann B, Kaiser U, Brandscheid D, Havemann K. Differential expression of insulin – like growth factor binding protein in human non – small cell lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1992; 28A:1899- 1904.
131. Suzuki H, Veda R, Takahashi T, Takahashi T. Altered imprinting in lung cancer. *Nat Genet* 1994; 6: 332 – 333.
132. Kong FM, Anscher MS, Washington MK, Killian JK, Jirtle RL. M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 2000; 19: 1572-1578.



133. Gemma A, Hosoya Y, Uematsu K, Seike M, Kurimoto F, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S. Mutation analysis of the gene encoding the human mannose 6 – phosphate/insulin – like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF -  $\beta_1$ ). *Lung Cancer* 2000; 30: 91-98.
134. Kong FM, Anscher MS, Sporn TA, Washington MK, Clough R, Barcellos – Hoff MH, Jirtle RL. Loss of heterozygosity at the mannose 6 – phosphate insulin – like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) locus predisposes patients to radiation – induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 35 – 41.
135. Gall – Trošelj K, Kusić B, Pećina – Šlaus N, Pavelić K, Pavelić J. Nested polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus RNA in blood derivatives. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 733-736.
136. Pavelić K, Spaventi Š, Glunčić V, Matejčić A, Pavičić D, Karapandža N, Kusić Z, Lukač J, Dohoczky C, Čabrijan T, et al. The expression and role of insulin – like growth factor II in malignant hemangiopericytomas. *J Mol Med* 1999; 77: 865 – 879.
137. Pavelić K, Pavelić ZP, Čabrijan T, Samaržija M, Stambrook PJ. Insulin – like growth factor family in malignant hemangiopericytomas: the expression and role of insulin – like growth factor I receptor. *J Pathol* 1999; 188: 69 – 75.
138. Killian JK, Jirtle RL. Genomic structure of the human M6P/IGF 2 receptor. *Mamm Genome* 1999; 10: 74- 77.
139. Sard L, Accornero P, Torielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, et al. The tumor – suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8489-8492.
140. Bosserhoff AK, Glabl A, Stolz W, Buettner R. Detection of telomerase activity in skin, melanocytic nevi, and melanoma by telomerase PCR ELISA. *Biochimica* 1997; 3: 16 -18.
141. Wetterau LA, Francis MJ, Ma L, Cohen P. Insulin –like growth factor I stimulates telomerase activity in prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3354-3359.

142. Pavelić J, Križanc Š, Kapitanović S, Pavelić Lj, Samaržija M, pavičić F, Spaventi Š, Jakopović M, Herceg-Ivanovi Z, Pavelić K. The consequences of insulin- like growth factors/receptors dysfunction in lung cancer. *Am J respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 65 – 71.
143. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effect of insulin – like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine Rev* 2000; 21 (3): 215 – 244.
144. Myamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A. Matrix metalloproteinase - 7 facilitates insulin – like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin – like growth factor binding protein 3. *Cancer Res* 2004; 64: 665 – 671.
145. Hochscheid R, Jaques G, Wegmann B. Transfection of human insulin – like growth factor – binding protein 3 gene inhibits cell growth and tumorigenicity: a cell culture model for lung cancer. *J Endocrinol* 2000; 166: 553-563.
146. London SJ, Yuan JM, Travlos GS, Gao YT, Wilson RE, Ross RK, Yu MS. Insulin – like growth factor I, IGF – binding protein 3, and lung cancer risk in a prospective study of men in China. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 749 – 754.
147. Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, Favrot MC. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin – like growth factor – 1 receptor – dependent pathway in non – small cell lung cancer cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:354-357.
148. Camirand A, Pollak M. Co – targeting IGF – 1R and c- kit: synergistic inhibition of proliferation and induction of apoptosis in H 209 small cell lung cancer cells. *Br J Cancer* 2004; 90: 1825-1829.
149. Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Ito H, Itoh F, Lee CT, Nadaf S, Carbone DP, Imai K. Genetic blockade of the insulin – like growth factor I receptor. A promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 6432-6441.

150. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin – like growth factor (IGF) – I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta – regression analysis. *Lancet* 2004; 363: 1346-1353.
151. Seely BL, Samimi G, Webster NJG. Retroviral expression of a kinase – defective IGF-1 receptor suppresses growth and causes apoptosis of CHO and U87 cells in – vivo. *BMC Cancer* 2002; 2:15-32.
152. Lamonerie T, Laviaille C, Haddada H, Brison O. IGF – II autocrine stimulation in tumorigenic clones of a human colon- carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1995; 61: 587-592.
153. Guo YS, Jin GF, Townsend CM Jr, Zhang T, Sheng HM, Beauchamp RD, Thompson JC. Insulin – like growth factor II expression in carcinoma in colon cell lines: implications for autocrine action. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 145-154.
154. Pavelić K, Kolak T, Kapitanović S, Radošević S, Spaventi Š, Krušlin B, Pavelić J. Gastric cancer: the role of insulin – like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF1R and M6-P/IGF2R). *J Pathol* 2003; 201: 430-438.
155. Almeida A, Muleris M, Dutrillaux B, Malfoy B. The insulin – like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 11: 63-65.
156. Dennis PA, Rifkin DB. Cellular activation of latent transforming growth factor  $\beta$  requires binding to the cation – independent mannose 6 – phosphate(insulin – like growth factor type II receptor). *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 580-584.
157. Gemma A, Hosoya Y, Uematsu K, Seike M, Kurimoto F, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S. Mutation analysis of the gene encoding the human mannose 6 – phosphate/insulin – like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF -  $\beta_1$ ). *Lung Cancer* 2000; 30: 91-98.
158. Artandi SE. Telomeres, Telomerase, and Human Disease. *N Engl J Med* 2006; 335: 1195 – 1197.
159. Ohmura Y, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Telomerase activity and Bcl – 2 expression in non – small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2980 – 2987.

160. Krystal GW, Sulanke G, Litz J. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase – akt signaling blocks growth, promotes apoptosis, and enhances sensitivity of small cell lung cancer cell to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 913-922.
161. Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, Tai Y – T, Mitsiades CS, Mitsiades N, Chauhan D, Richardson P, Munshi NC, Anderson KC. Cytokines modulate telomerase activity in human multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 2002; 62: 3876-3882.
162. Fischer JR, Lahm H. Validation of molecular and immunological factors with predictive importance in lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 2: S151 – S161.

## 10. ŽIVOTOPIS

Dr. Marko Jakopović rođen je 05. 10. 1976. godine u Zagrebu, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2001. godine s prosjekom 4,69. Tijekom studija dobio je Dekanovu nagradu. Od 2002. godine dr. Jakopović je znanstveni novak – mladi asistent na Katedri za internu Medicinu Klinike za plućne bolesti 'Jordanovac'. Državni ispit položio je 2002. g., a specijalizaciju iz interne medicine započeo je 2003. godine. Dr. Jakopović odslušao je tri godine Znanstvenog poslijediplomskog Doktorskog studija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te položio sve ispite. Objavio je 26 radova (od čega 6 citiranih u Current Contentsu). Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pulmološkog društva te Američkog torakalnog društva. Bio je član atletske reprezentacije na Olimpijskim igrama u Sydneyu 2000 g.