

# Polimorfizam TNF-a gena (TNF-a 308) i TNF-a 238) u bolesnika s primarnim karcinomom pluća

---

**Flego, Veljko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2008**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:306683>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-04**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Veljko Flego**

**POLIMORFIZAM TNF- $\alpha$  GENA (TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238) U BOLESNIKA S  
PRIMARNIM KARCINOMOM PLUĆA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Rijeka, 2008.**

Mentor rada: **Prof.dr.sc. Anđelka Radojčić Badovinac**

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

UDK \_\_\_\_\_

*Rad je izrađen na Zavodu za pulmologiju Klinike za interne bolesti Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.*

*Zahvaljujem Prof. dr. sc. Anđelki Radojčić Badovinac, prodekanici Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci , što je uz brojne obveze našla vremena i razumijevanja te stručnim savjetima i uputama kao mentor pomogla u izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem i ostalim nastavnicima i suradnicima Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku na pomoći, susretljivosti i lijepom prijemu. Posebno se od srca zahvaljujem Prof. dr. sc. Smiljani Ristić na podršci, učestvovanju u istraživanju i obradi rezultata te spremnosti da uvijek pruži dragocjenu pomoć.*

*Zahvaljujem kolegama i ostalim suradnicima Zavoda za pulmologiju Klinike za interne bolesti na pomoći pri prikupljanju materijala za istraživanje. Hvala kolegama i laborantima Zavoda za transfuzijsku medicinu.*

*Zahvaljujem obitelji na strpljivosti i podršci.*

# SADRŽAJ

## SAŽETAK

## SUMMARY

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. KARCINOM PLUĆA .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Epidemiologija .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Etiologija i prevencija karcinoma pluća .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3. Imunopatologija karcinoma pluća .....</b>	<b>7</b>
1.1.3.1. Imunohistokemija u otkrivanju prognostičkih genskih produkata .....	7
1.1.3.2. Imunohistokemija angiogeneze kao mogući prognostički marker .....	9
1.1.3.3. Nove mogućnosti liječenja .....	10
1.1.3.4. Prijeneoplastičke i <i>in situ</i> lezije bronhalnog stabla .....	11
<b>1.1.4. Biologija karcinoma pluća .....</b>	<b>12</b>
1.1.4.1. Čimbenici rasta .....	16
1.1.4.2. Angiogeneza .....	17
1.1.4.3. Rezistencija na lijekove .....	17
1.1.4.4. Imunologija .....	18
<b>1.1.5. Probir karcinoma pluća .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.6. Klasifikacija karcinoma pluća .....</b>	<b>24</b>
1.1.6.1. Karcinom pločastih stanica .....	26
1.1.6.2. Adenokarcinom .....	26
1.1.6.3. Mikrocelularni karcinom .....	27

1.1.6.4. Makrocelularni karcinom .....	27
<b>1.1.7. Klinička slika .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.8. Dijagnostika karcinoma pluća .....</b>	<b>29</b>
1.1.8.1. Fiberbronhoskopija .....	30
1.1.8.2. Citološka i histološka dijagnostika karcinoma pluća .....	30
<b>1.1.9. Stupnjevanje karcinoma pluća .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.10. Liječenje karcinoma pluća .....</b>	<b>34</b>
1.1.10.1. Kirurško liječenje .....	35
1.1.10.2. Radioterapija .....	35
1.1.10.3. Kemoterapija .....	36
<b>1.2. CITOKINI .....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.1. Čimbenik nekroze tumora (TNF) .....</b>	<b>39</b>
1.2.1.1. TNF- $\alpha$ i pluća .....	43
1.2.1.2. TNF- $\alpha$ i ostale bolesti .....	45
<b>1.3. POLIMORFIZMI GENA .....</b>	<b>48</b>
<b>1.3.1. Polimorfizmi gena TNF-<math>\alpha</math> u pojedinim humanim bolestima .....</b>	<b>50</b>
<b>1.3.2. Polimorfizmi gena TNF-<math>\alpha</math> u malignim bolestima .....</b>	<b>53</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>59</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1. ISPITANICI .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2. METODE .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.1. Kliničke metode .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.2. Izolacija DNA .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.3. Genotipizacija .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.4. Statističke metode .....</b>	<b>67</b>

<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1. REZULTATI KLINIČKIH I PATOHISTOLOŠKIH ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2. HEMATOLOŠKI I BIOKEMIJSKI REZULTATI .....</b>	<b>71</b>
<b>4.3. UTJECAJ TNF-<math>\alpha</math>-308 I TNF-<math>\alpha</math>-238 POLIMORFIZAMA NA         PREDISPOZICIJU I EKSPRESIJU BOLESTI .....</b>	<b>73</b>
<b>4.4. KORELACIJA IZMEĐU OSNOVNIH LABORATORIJSKIH NALAZA         I GENOTIPOVA TNF-<math>\alpha</math>-308 I TNF-<math>\alpha</math>-238 .....</b>	<b>78</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>84</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>102</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>103</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Karcinom pluća je najčešći maligni tumor. Čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) je citokin koji sudjeluje na više načina u patogenezi mnogih upalnih bolesti i malignih tumora. Dosadašnja istraživanja o ulozi polimorfizma TNF- $\alpha$  gena u bolesnika s karcinomom pluća dala su različite rezultate. U ovom istraživanju cilj nam je bio vidjeti da li TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmi utječu na podložnost i/ili težinu karcinoma pluća u hrvatskoj populaciji. Ovo je prvo istraživanje u kavkaskoj etničkoj skupini, koje uključuje ova dva polimorfizma, u svim tipovima karcinoma pluća.

**Ispitanici i metode:** Ispitano je slučajnim odabirom 230 bolesnika s primarnim karcinomom pluća, uključujući karcinome pluća ne-malih stanica (NSCLC) i karcinom pluća malih stanica (SCLC). Kontrolna skupina sačinjavala je 230 zdravih, nesrodnih ispitanika, uparenih po dobi i spolu. Nakon izolacije DNA iz periferne krvi učinjena je genotipizacija pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) i identifikacije polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP).

**Rezultati:** Nismo našli statistički značajne razlike u frekvenciji genotipova i alela za TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizme između bolesnika s karcinomom pluća i kontrolne skupine. Nismo utvrdili povezanost između genotipova i kliničkog stadija karcinoma pluća, kao ni za pojedine patohistološke nalaze, kada smo promatrali ukupno sve bolesnike. Međutim, usporedbom genotipova i stadija bolesti u podskupinama karcinoma pluća utvrđeno je da je genotip GG TNF- $\alpha$ -238 statistički značajno češći ( $p=0,02$ ) u odnosu na genotipove GA i AA u proširenoj fazi karcinoma pluća malih stanica, dok u skupini karcinoma pluća ne-malih stanica nije bilo te razlike.



Ispitujući korelaciju između genotipova i laboratorijskih nalaza krvi nađen je statistički značajan međusoban odnos samo za povišene vrijednosti neutrofilnih granulocita i snižene vrijednosti ukupnih proteina periferne krvi i TNF- $\alpha$ -308 A alela. Za navedene parametre u krvi TNF- $\alpha$ -308 A alel je predisponirajući, dok je -308 G alel protektivan. Analizom genotipova bolesnika u kojih je primarni karcinom pluća bio drugi ili treći primarni maligni tumor ustanovljeno je da su svih 28 imali TNF- $\alpha$ -238 GG genotip ( $p=0,000$ ). To govori da je G alel TNF- $\alpha$ -238 predisponirajući za ovo ponavljanje maligne bolesti.

**Zaključak:** Utvrđeno je da TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmi nemaju utjecaja na podložnost za bilo koji tip karcinoma pluća u hrvatskoj populaciji. Također, navedeni polimorfizmi ne utječu na klinički stadij bolesti u karcinoma ne-malih stanica, dok je G alel TNF- $\alpha$ -238 značajno češći kod težeg oblika karcinoma pluća malih stanica. Isto tako G alel TNF- $\alpha$ -238 ima predisponirajuću ulogu za karcinom pluća, kada je taj tumor drugi primarni maligni tumor u istog bolesnika.

**Ključne riječi:** Karcinom pluća; Kavkaska etnička skupina; Podložnost za karcinom; Stadij tumora; TNF- $\alpha$  polimorfizam; Vrste tumora.

## SUMMARY

**Objectives:** Lung cancer is the most frequent malignant tumor. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is cytokine involved in many way in the pathogenesis of various inflammatory diseases and malignant tumor. Previous studies investigating the role of the TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in lung cancer patients have generated different results. In the present study, the aim was investigated whether the TNF- $\alpha$ -308 and TNF- $\alpha$ -238 polymorphisms influence on the susceptibility and/or severity of lung cancer in Croatian population. This is the first study in Caucasian population which include this two polymorphisms in all types of lung cancer.

**Patients and Methods:** In this randomised study 230 lung cancer patients was investigated. Non-small cell lung cancers (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC) were included. Control group was 230 appropriate age and sex-matched healthy controls. After DNA isolation from peripheral blood that were genotyped by the polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method, results are statistically analysed.

**Results:** There were no significant differences in the genotype and allele frequencies for the TNF- $\alpha$ -308 and TNF- $\alpha$ -238 polymorphisms between lung cancer patients and controls. We did not detect any association between the genotypes, different stages of lung cancer and the pathohistological findings, when we observed all the patients. Meanwhile, when the genotypes were compared between stages of lung cancer and non-small cell lung cancer and small cell lung cancer, GG TNF- $\alpha$ -238 in small cell lung cancer was statistically significantly more frequent ( $p=0,02$ ), than genotypes GA and AA in extensive disease of small cell lung cancer. In the group of NSCL there was not any differences. Investigating

laboratory blood findings in correlation with genotypes frequencies, a significant statistically correlation was found only for high level of neutrophil granulocytes and low total proteins in the peripheral blood and TNF- $\alpha$ -308 A allele. For these blood parameters in the patients the TNF- $\alpha$ -308 A allele is risky, whereas -308 G allele is protective. We analysed also genotypes of patients in which lung cancer was the second or third primary malignant tumor. TNF- $\alpha$ -238 GG genotype was presented in all of them (28) ( $p=0,000$ ). It mean that G allele TNF- $\alpha$ -238 has promotive effect for lung cancer development as a second primary tumor.

**Conclusion:** The present study indicates that the TNF- $\alpha$ -308 and TNF- $\alpha$ -238 polymorphisms do not influence susceptibility to or severity of lung cancer in Croatian population, when we take into consideration all patients together. Moreover, when we formed NSCLC and SCLC group, G allele TNF- $\alpha$ -238 take to more severe form of SCLC. As well, G allele TNF- $\alpha$ -238 had promotive effect for lung cancer when this tumor was the second primary malignant tumor in the same patient.

**Key words:** Cancer susceptibility; Caucasian population; Lung cancer; TNF- $\alpha$  polymorphism; Tumor stage; Tumor type.

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Karcinom pluća je najčešći maligni tumor u svijetu i najčešći uzrok smrti među malignim bolestima (1). Smatra se da su čimbenici okoliša i individualne genetske osobine odgovorni za nastanak, progresiju i prognozu bolesti (2). Pušenje je glavni vanjski čimbenik rizika za rak pluća, međutim, samo oko 16% pušača oboli od te bolesti tijekom svog života (3). Utvrđeno je da pušenje kao posljedicu može izazvati promjene na kromosomima (4). U pušača, u najvećem broju slučajeva, dolazi do oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid, DNA). Genetska oštećenja se mogu otkriti detekcijom točkastih mutacija s tehnikom lančane reakcije polimerazom (engl. polimerase chain reaction, PCR), detekcijom kromosomskih promjena s tehnikom fluorescentne in situ hibridizacije (engl. fluorescence in situ hybridisation, FISH) i detekcijom promjena u broju DNA kopija u tumoru s komparativnom genomskom hibridizacijom (5). Također je uočeno da u pojedinim familijama se češće javlja rak pluća (6). Danas je posve jasno da pored pušenja i čimbenika okoliša postoji genomska predispozicija u osoba u kojih će se tumor razviti. Postoji više čimbenika koji određuju predispoziciju za nastanak raka pluća. Proces nastanka te bolesti odvija se kroz više stupnjeva. Između početne mutacije genskog materijala u stanicama respiratornog epitela i klinički ustanovljenog raka pluća protiče razdoblje od 20-tak godina (7). Kroz to dugo vrijeme više je patoloških mehanizama uključeno u karcinogenezu.

Kao odgovor na tumorske antigene nastaje protutumorska imunološka reakcija (5). Stanična imunost najvažniji je mehanizam specifičnog nadzora nad tumorskim rastom (6). Pri tome glavnu ulogu imaju limfociti T i stanice prirodne ubojice (engl. natural killer cells, NK). Limfociti T luče citokine koji utječu na

aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica imunološkog sustava. Prije 20-tak godina otkriven je citokin koji je nazvan čimbenik nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor, TNF) jer je prvo uočeno njegovo inhibitorno (citotoksično) djelovanje na tumore (7). Vremenom je otkriveno da ima značajniju ulogu u proupalnom djelovanju (8). Opisana je DNA sekvenca i dva osnovna tipa, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  gena (9). Uočeno je da je TNF- $\alpha$  važan i za imunološke i genetske promjene u malignim tumorima (10). U zadnje su vrijeme od znanstvenog interesa naročito polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238. Nađena je povezanost između specifičnog genskog polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 i multiple skleroze (11). Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 je ispitan u bolesnika s reumatoidnim artritismom i Behçet-ovom bolesti, ali nije potvrđeno da se radi o rizičnom čimbeniku za te bolesti, niti utječe na njihovu težinu i klinički tijek (12, 13). Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 povećava rizik u koronarnoj bolesti srca, naročito u žena s dijabetesom tipa II (14). Povezanost istog gena s nastankom kronične opstruktivne bolesti pluća (KOPB) u Tajlandu i Kini nije nađena (15, 16). Bolesnici s vezikoureteralnim refluksom i TNF- $\alpha$ -308 AA genotipom imaju povećani rizik za refluksnu nefropatiju (17).

U bolesnika s rakom pluća u Njemačkoj nije nađena korelacija između te bolesti i polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 (18). Jedino ispitivanje do sada koje je imalo za cilj utvrditi povezanost polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 s rakom pluća u odnosu na predispoziciju i klinički tijek bolesti izrađeno je u Kini. Potvrđena je povezanost polimorfizama u tom genu s javljanjem raka pluća i prognozom bolesti. Nađeno je da alel -308 A ima promotivni utjecaj na razvoj i progresiju bolesti, dok alel -238 A ima protektivnu funkciju prema raku pluća (19).

## **1.1.KARCINOM PLUĆA**

### **1.1.1.Epidemiologija**

Rak pluća je najčešći maligni tumor u svijetu od 1985. godine do 2002. godine, kada je bilo 1,35 milijuna novooboljelih, što čini 12,4% svih novootkrivenih malignih tumora (1). Isto tako rak pluća je i najčešći uzrok smrti od malignih tumora s 1,18 milijuna umrlih (1). Stopa incidencije raka pluća u žena je 12,1/100 000, a u muškaraca 35,5/100 000 stanovnika. Petogodišnje preživljavanje je oko 15% u SAD, 10% u Zapadnoj Europi i 9,8% u zemljama u razvoju.

U Europi je rak pluća najčešći uzrok smrti od malignih tumora u muškaraca (20). Najviša stopa incidencije i mortaliteta u 2000. godini bila je u Belgiji (76,4/100 000 i 70,9/100 000 stanovnika), a najniža u Švedskoj (21,4 i 22,6/100 000 stanovnika (21, 22). Odnos javljanja bolesti između spolova se znatno razlikuje među europskim zemljama (23, 24, 25). Najniži odnos muškaraca i žena je u Danskoj (9, 26,), a najviši u Španjolskoj (1, 27). U najvećem broju država Europe postoji tendencija zaustavljanja ili čak pada oboljelih od raka pluća u muškaraca, dok mortalitet od raka pluća u žena raste (22, 28).

U SAD stopa incidencije i mortaliteta u 2000. godini bila je 58,6 i 53,2 u muškaraca te 34,0 i 27,2 u žena s odnosom spolova 1,7 (21). U žena je mortalitet zbog raka pluća ispred raka dojke od 1987. godine (29). Paralelno s porastom pušenja, stopa mortaliteta zbog raka pluća u žena porasla je 600% od 1990. do 1997. godine (30).

Prema podacima Državnog registra za rak, u našoj je zemlji ukupni broj novooboljelih od raka pluća porastao s 1191 u 1968. godini na 2703 u 2004. godini. Od toga je muškaraca bilo 2119 (21%), a žena 584 (7%). Stopa incidencije iznosila je za oba spola u 1968. godini 27,4, a 2004. godine 60,9/100 000

stanovnika. Za muškarce su te vrijednosti bile 49,3 i 99,2/100 000 stanovnika, a za žene 7,1 i 25,4/100 000 stanovnika. Stope incidencije povećale su se u istom razdoblju za 150% u muškaraca i 324% u žena. Broj umrlih porastao je s 899 u 1968. godini na 2635 u 2004. godini. Od toga je muškaraca bilo 2123 (29%), a žena 512 (10%). Maligni tumori pluća su na prvom mjestu po smrtnosti od malignih tumora u muškaraca, a na drugom mjestu u žena. Ukupna stopa incidencije mortaliteta bila je 59,4/100 000 stanovnika i to za muškarce 99,4/100 000, a za žene 22,3/100 000 stanovnika (26).

### **1.1.2. Etiologija i prevencija karcinoma pluća**

Karcinom pluća nastaje postepeno. Od prve mutacije do maligne transformacije stanica, gdje su uključeni mnogi onkogeni i tumor-supresorski geni, može proći razdoblje i do 20 godina. Proces nastanka tumora vrlo je kompleksan i uključuje niz genetičkih promjena koje omogućuju tumorskoj stanici da nadvlada sve mehanizme nadzora koji vrijede za normalnu stanicu. Ranija ispitivanja na životinjama danas su zamijenile molekularne analize pojedinih gena i čimbenika rasta, koji su u vezi s tumorskim rastom (31). Različiti kancerogeni, u prvom redu oni koji nastaju prilikom pušenja, započinju proces maligne transformacije stanica (32). Upala i proliferacija su prve mikroskopske promjene u tom procesu, a čimbenici rasta su uključeni već u ovom prvom razdoblju nastanka tumora. Mnogostruke genetske promjene su neophodne da bi konačno došlo do malignog fenotipa. Gene koji dovode do promjena u malignim stanicama dijelimo u dvije skupine: proto-onkogeni i tumorski supresorski geni (6). Proto-onkogeni svojom aktivacijom prelaze u onkogene i induciraju stvaranje abnormalnih proteina, čije

sve veće stvaranje dovodi do povećanja metaboličkih i transkripcijskih procesa u stanici. Aktivaciju mogu započeti točkasta mutacija, genska amplifikacija, povećana sinteza onkoproteina ili translokacija. Postojanje nepravilnosti u jednom od dva alela dominantnih onkogeno dovoljno je za abnormalnu funkciju stanice. Tumorski supresorski geni su geni u kojih genetske promjene dovode do smanjenja aktivnosti proteina, koji imaju važnu ulogu u kontroli staničnog rasta. Genetske promjene javljaju se prije histoloških te stoga mogu biti od važnosti u ranoj detekciji tumora.

Mnoga ispitivanja pokazala su statistički značajnu povezanost pušenja i raka pluća. U dimu cigarete ima oko 400 kemijskih spojeva od kojih je 40 kancerogenih. Broj popušanih cigareta na dan i dužina pušenja korelira s rizikom od nastanka raka pluća. Pušenje je najviše povezano s nastankom planocelularnog karcinoma pluća, ali je uočeno da je podskupina K-ras pozitivnih adenokarcinoma također jako povezana s pušenjem (33). Mjere odvikavanja od pušenja intenzivno se provode naročito u razvijenim zemljama Europe i Amerike, sa zadovoljavajućim rezultatima (34, 35). Pasivno pušenje je značajan problem te oko 2000 ljudi zbog toga godišnje umire u SAD.

U nastanku raka pluća važna je i genetska predispozicija jer prema Seifartu i suradnicima u istraživanoj njemačkoj populaciji samo mali broj pušača oboli od te bolesti (11%) (18). Također je uočeno češće familijarno javljanje raka pluća u nepušača, posebno bronhioloalveolarnog karcinoma.

Izloženost čimbenicima rizika od raka pluća u radnoj i životnoj okolini je također važna. Tu se najčešće spominju azbest, metali (krom, nikl, berilium), proizvodi od ugljena i nafte (štetni plinovi) (36). Zračenje (x i  $\gamma$  zrake) je također poznati rizik za rak pluća, kao i izloženost radonu kod minera. Od kemijskih



spojeva koji povećavaju rizik od raka pluća poznati su: iperit, vinil klorid, bis klorometileter (BCME), klormetil metileter (CMME) (37). Ranije bolesti pluća koje povećavaju mogućnost nastanka raka pluća su difuzna plućna fibroza i kronična opstruktivna plućna bolest (38).

Utvrđeno je da nedovoljno uzimanje voća i povrća povećava rizik od najčešćih malignih tumora pa tako i raka pluća. Potencijalno „zaštitni“ sastojci hrane su vitamin E, folna kiselina, vitamin C, selen, koji djeluju kao antioksidansi.

Usprkos poboljšanju terapijskih metoda nije postignuto značajnije preživljavanje u bolesnika s rakom pluća zadnjih 40-tak godina. U svijetu umire od raka pluća oko tri milijuna ljudi godišnje, a očekuje se da će se taj broj udvostručiti u narednih 30 godina. Smanjenje mortaliteta može se postići samo prevencijom, ranim otkrivanjem bolesti i uvođenjem novih metoda liječenja. Glavna stvar u prevenciji je eliminiranje glavnog izvora kancerogena – pušenje. U prevenciji raka pluća dugo se radi na ranom otkrivanju te bolesti. Ranije metode citološke analize sputuma i standardne radiološke snimke toraksa nisu se pokazale uspješnim. Znatno bolje rezultate u probiru raka pluća dala je kompjutorizirana tomografija (CT) toraksa i nove tehnologije obrade krvi i sputuma, koje koriste morfologiju jezgre i specifična protutijela s većom osjetljivošću (39). Mnogo obećavaju molekularne laboratorijske tehnike kojima se mogu utvrditi tumorski markeri indikativni za (prije) karcinom.

Kemoprevencija označuje uzimanje tvari kojima se prevenira, inhibira ili vraća u nazad proces karcinogeneze. Od ranije su poznate dvije vrste takvih tvari: blokirajuće i suprimirajuće tvari, koje se suprotstavljaju nastanku invazivnog tumora. Za respiratorni trakt danas postoje dvije skupine tvari koje preveniraju

promjene koje bi nastale zbog inhalacije kancerogena: retinoidi i antioksidansi (40, 41). Prve studije pokazuju kontraverzne rezultate te je potrebno daljnje praćenje.

### **1.1.3. Imunopatologija karcinoma pluća**

Podjela raka pluća na karcinom pluća malih stanica (engl. small cell lung cancer, SCLC) i karcinom pluća ne-malih stanica (engl. non-small cell lung cancer, NSCLC) ostaje prva i najvažnija karakteristika za planiranje liječenja. Usprkos otkrivanju novih biomarkera, tumor, limfni čvor, presadnica (engl. tumour, node, metastasis, TNM) podjela daje najtočnije prognostičke podatke u bolesnika s NSCLC. Posljednjih godina citogenetika, molekularna biologija, biologija stanice i biokemija su dale nova shvaćanja plućne karcinogeneze, otkrivanjem većeg broja genetskih promjena i abnormalnosti bioloških funkcija, kako u staničnom ciklusu tako i u intratumorskoj vaskularizaciji. Otkrivanje proteina koji su uključeni u te procese i proizvodnja velikog broja protutijela omogućava otkrivanje imunobojanjima, da li se neka genska promjena pojavljuje u raku pluća, prijeneoplastičkim ili *in situ* lezijama. Konačni je cilj otkriti nove prognostičke markere i dati upute za liječenje.

#### **1.1.3.1. Imunohistokemija u otkrivanju prognostičkih genskih produkata**

Najviše ispitivani prognostički marker u raku pluća je zasigurno p53 (42). Ispitivanja ekspresije proteina p53 su pokazala da veliki broj NSCLC, kao i ostalih tumora, ima abnormalnu nuklearnu akumulaciju ovog proteina. Upotrebom imunohistokemije (protutijela) u svrhu evaluacije promjena u genskoj ekspresiji,

normalni p53 protein je rijetko nađen ili je viđen samo u određenom broju stanica. Ako se u stanicama tumora imunohistokemijski ne potvrdi p53, znači da nema ekspresije zbog teškog genskog oštećenja, koje onemogućuje produkciju proteina ili zbog toga što je gen potpuno normalan. Vrijednost p53 imunodetekcije kao prognostičkog čimbenika u raku pluća se vrlo mnogo ispituje, ali različita ispitivanja pokazuju kontradiktorne rezultate. Ekspresija p53 može biti znak loše prognoze, dobre prognoze ili nema prognostičkog značaja (43).

Drugi tumor supresorski geni koji su ispitivani imunobojenjem u raku pluća su retinoblastom (engl. retinoblastoma, Rb) gen i FHIT gen (engl. fragile histidine triad) (44). Ovi se geni lakše otkrivaju imunohistokemijski nego p53 budući da normalni bronhalni epitel ima oba proteina, kao i tumori bez promjena u oba gena. Zbog toga je moguće razlikovati tumore sa ili bez promjena FHIT i Rb gena.

Osim tumor supresorskih gena ispitivani su kao mogući prognostički markeri i neki onkogeni. Bcl-2 protein inhibira apoptozu i nalazi se u mnogo tumora (45, 46). Nađe se u točki loma kromosoma 18 u folikularnih limfoma sa 14:18 translokacijom. Zbog translokacije, bcl-2 gen je pod kontrolom promotora gena za teški lanac imunoglobulina i nije normalno izražen. U normalnom epitelu bronha izražen je u bazalnim stanicama, ali ga nema u stupačastim stanicama. Njegova ekspresija je od 20–40% u NSCLC zbog razloga koji je do sada nepoznat. Hipermetilacija na lokusu bcl-2 na kromosomu 18 je utvrđena u raku pluća, ali bez bilo kakve korelacije s ekspresijom proteina.

Receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) i HER2/Erb/Neu gen su također ispitivani (47). EGFR je receptor za epidermalni čimbenik rasta, koji stimulira tumorski rast epitelnih stanica. HER2 je receptor sličan tirozin kinazi (engl. receptor – like tyrosine kinase) s 80%

homologije s EGFR. On je izražen u velikom broju NSCLC i povezan je s većom agresivnosti tumora. Ispitivani su i antigeni krvnih grupa. Istraživanje ekspresije antigena krvne grupe A i B i njihovih prekursora H/Ley/Leb, otkrivenih monoklonalnim protutijelom MIA-15-5, osnovano je na zapažanju da je ekspresija antigena krvnih grupa u tumorskim stanicama često smanjena, dok je ekspresija prekursora povećana (48). Ovi antigeni prekursora su u vezi s rastom staničnog mobiliteta. To sugerira da tumorske stanice, koje imaju manje antigena krvnih grupa i zbog toga je porast ekspresije prekursora, spadaju u agresivnije tumore. Usprkos brojnih ispitivanja niti jedan zaključak nije donesen za neki od ovih markera.

#### 1.1.3.2. Imunohistokemija angiogeneze kao mogući prognostički marker

Drugi mogući prognostički čimbenik je broj intratumorskih malih krvnih žila. Veći broj krvnih žila dovodi do povećane oksigenacije i rasta tumora, a također raste i mogućnost da tumorske stanice uđu u krv i metastaziraju. Angiogeneza je povezana i sa stromalnom lizom i remodeliranjem što dovodi do širenja tumora (49). NSCLC se u odnosu na angiogenezu dijeli prema vrsti intratumorskih krvnih žila, a ne prema broju krvnih žila. Iako najveći broj raka pluća destruiira normalno plućno tkivo i stvara nove krvne žile i stromu, u manjem broju tumora (oko 15%) ne dolazi do destrukcije parenhima, niti stvaranja strome, niti krvnih žila. Jedino su prisutne krvne žile u alveolarnim septama i to u cijelom tumoru, tako da su plućne alveole prepune tumorskih stanica. Ti se tumori nazivaju „putative nonangiogenic.“ To govori da, ako postoji jedan izvor krvnih žila, tumor se može iz njega hraniti i rasti bez da se potiče stvaranje novih krvnih žila.

Saznanje da je angiogeneza neophodna za rast tumora ima implikacije za izbor liječenja, s ciljem da se tumor zaustavi uništavanjem krvnih žila ili inhibicijom angiogeneze. U ispitivanju prognostičkih čimbenika, naročito angiogeneze, potrebno je uzeti u obzir više čimbenika i to simultano, koji se, također, mogu međusobno uspoređivati.

#### 1.1.3.3. Nove mogućnosti liječenja

Upotreba imunohistokemije je i u otkrivanju molekula koje su mogući ciljevi terapije. U liječenju raka pluća koriste se terapijska monoklona protutijela i/ili antagonisti molekula u intratumorskim krvnim žilama. Integrin  $\alpha$  V $\beta$ 3 je jedan od tih ciljeva, za kojeg je prvo rečeno da je to novoformirani endotel *in vitro*. Iako je potvrđeno da je endotelna ekspresija V $\beta$ 3 osnova za angiogenezu potaknutu od bazičnog fibroblastičnog čimbenika rasta ili TNF- $\alpha$ , nađeno je da to može biti samo nepravilno reguliran ostatak endotela.

Druga mogućnost liječenja je usmjerena na aktivaciju glavnih čimbenika rasta. Jedna takva molekula je EGFR. Ona može biti prisutna u nefosforiliranoj i fosforiliranoj formi sa strukturalnim konformacijskim razlikama između te dvije forme. Smatra se da inhibicija fosforilirane forme može biti od terapijske vrijednosti. Ovakva saznanja otvaraju nove terapijske mogućnosti, vrlo specifične, koje obećavaju dobre rezultate kao monoterapija ili u kombinaciji s konvencionalnim liječenjem (50).

#### 1.1.3.4. Prijeneoplastičke i *in situ* lezije bronhalnog stabla

Imunohistokemija pomaže u razumijevanju biologije *in situ* ranih bronhalnih promjena. Imunohistokemijska ispitivanja mogu pomoći za shvaćanje kronoloških promjena koje dovode do NSCLC. Abnormalna ekspresija p53 je rana, ali ne i obavezna promjena u malignoj transformaciji bronhalnog epitela. Ipak, kada se pojavi, znači povećani rizik progresije u karcinom (51). No, rak pluća može nastati i bez p53 oštećenja.

Različiti rezultati su nađeni ispitivanjem ekspresije FHIT proteina. FHIT gen je tumor supresorski gen i sudjeluje u regulaciji apoptoze i u kontroli staničnog ciklusa. Gen se nalazi na p kraku kromosoma 3 (3p 14.2) i njegova mRNA nedostaje ili je promijenjena u NSCLC. FHIT protein je izražen u normalnom epitelu, ali ga nema u prijeneoplastičkim i neoplastičkim stanicama. Zbog velike osjetljivosti imunohistokemije moguće je dokazati gubitak ekspresije FHIT proteina, što je najčešće prisutno u *in situ* bronhalnim lezijama (94%) i u invazivnom NSCLC (70%). Možemo zaključno reći da se gubitak FHIT proteina vrlo vjerojatno javlja u ranim fazama nastajanja karcinoma pluća i to više nego u kasnijim fazama (progresivna faza karcinoma). Angiogeneza se nalazi već u ranim *in situ* bronhalnim lezijama.

Važno je ustanoviti karcinom u što ranijoj fazi jer je onda i statistički značajno duže preživljavanje (52).

#### 1.1.4. Biologija karcinoma pluća

Ima mnogo novih saznanja u laboratorijskim i kliničkim istraživanjima, kao i sve većeg razumijevanja raka pluća iz rezultata molekularne biologije, a svi ti rezultati dolaze iz povezanosti čimbenika okoliša i individualnih genetskih osobina. Poznati genetski čimbenici u raku pluća određuju posebne aspekte biologije stanica u toj bolesti. Konačni cilj svega ovoga je uvođenje novih spoznaja u kliničku praksu.

Pušenje je glavni čimbenik rizika za karcinom pluća i 90% bolesnika s karcinomom pluća su pušači (53). Rak pluća je sigurno bolest koju određuju čimbenici okoliša, ali i genetski čimbenici utječu na individualni rizik od raka pluća (54). Osim socio-ekonomskih čimbenika postoji genetska predispozicija za naviku pušenja. Neka ispitivanja su utvrdila da bi se predispozicija za pušenje mogla povezati s promjenama na q kraku kromosoma 5 i na kromosomu 4 (4, 55). Rezultati ispitivanja polimorfizma dopamin D2 receptor gena u pušača i onih koji se odvikavaju od pušenja su bili kontradiktorni (56). Tri glavne skupine kancerogena u dimu cigarete jesu: aromatski amini, nitrozamini i policiklički hidrokarbonati. U pušača, u najvećem broju slučajeva, dolazi do oštećenja stanične DNA, posebno u DNA genskoj sekvenciji (57).

Detekcija točkastih mutacija gena može se ustanoviti tehnikom lančane reakcije polimerazom, otkrivanjem kromosomskih promjena s fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom i promjena u broju DNA kopija u tumoru s komparativnom genomskom hibridizacijom (5). Osim DNA biomarkera važan je i marker izmjene sestrinskih kromatida (58). Postoji i niz drugih tumorskih markera u karcinomu pluća, koji se još istražuju (59). Poznati su citokeratin 18 i dezmozoplakin u NSCLC

(60). Razlika je u genskoj ekspresiji, sadržaju proteina i biodistribuciji, u odnosu na zdravu populaciju. Citokeratin 18 je jače izražen u adenokarcinoma, a dezmozoplakin u karcinomu pluća pločastih stanica. Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein B1 (engl. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein B1, hnRNP B1) je rani biomarker u okultnom karcinomu pluća, kao i u displaziji sluznice bronha (61, 62, 63, 64). Ekspresija toga biomarkera znači lošu prognozu u NSCLC.

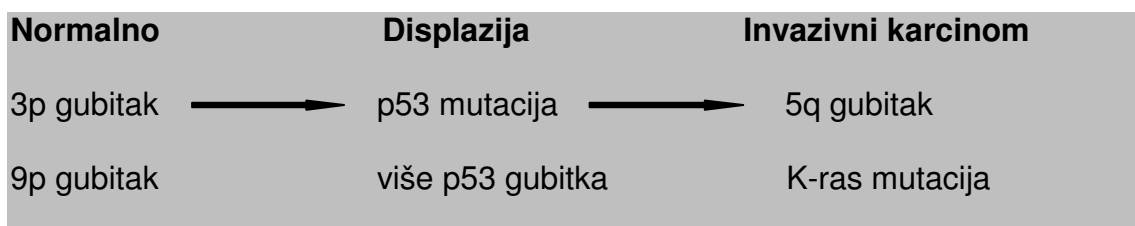
Što određuje predispoziciju za rak pluća? Brojna ispitivanja su pokazala da postoji povezanost između karcinoma pluća i rizika javljanja karcinoma u pripadnika iste obitelji. Također, vršena su ispitivanja različitih genskih polimorfizama i citogenetičkih promjena u bolesnika s rakom pluća (65) (Tablica 1.). Ispitivanja genskih polimorfizama koji određuju enzime uključene u metabolizam lijekova nisu dala pouzdane rezultate za rizik nastanka karcinoma pluća (66). Genetičko-epidemiološka i molekularno-genetička istraživanja su potrebna da bi se točnije mogla odrediti genetska predispozicija za rak pluća. Karcinom pluća se najčešće otkriva prekasno i postoji dugo i „tiho“ pretkliničko razdoblje. Zbog toga su važna genetska ispitivanja prijemalnih promjena (Slika 1.). Smatra se da su najranija oštećenja na kromosomima 3p i 9p što je nađeno u hiperplastičkom i metaplastičkom epitelu bronha. Displazija epitela bronha je povezana s mutacijama p53 i gubitkom 3p. Gubitak 5q i mutacije K-ras su povezane s javljanjem mikroinvazije u adenokarcinomu (67). Razlike u kancerogenezi između muškaraca i žena ukazuju na moguću ulogu hormona, posebno estrogena (68).



**Tablica 1. Glavne genetske promjene u karcinomu pluća**

Promjene	SCLC	NSCLC
Kromosom 3q LOH	++++	+++
Kromosom 5q LOH	+++	++
p16 mutacija (povezana s 9p LOH)	-	++
p53 mutacija (povezana s 9p LOH)	+++	++
Rb mutacija (povezana s13q LOH)	+++	+
L-myc amplifikacija (povezana s 1p gain)	+	-
N-myc amplifikacija (povezana s 2p gain)	+	-
c-myc amplifikacija (povezana s 8q gain)	+	+

LOH: engl. loss of heterozygosity (gubitak heterozigotnosti); Rb: engl. retinoblastoma (retinoblastom); +:slaba ekspresija; ++:umjerenjena ekspresija; +++: velika ekspresija; ++++: vrlo velika ekspresija; -: bez ekspresije.



**Slika 1. Postepena evolucija karcinoma pluća**

Postoje tri glavne skupine gena uključenih u nastanak raka pluća. To je skupina proto-onkogeni, tumorskih supresorskih gena i DNA reparirajućih gena. Primjeri proto-onkogeni koji se aktiviraju u raku pluća su: HER2/<sub>neu</sub>, kit, ras i myc geni (69, 70).

Najbolje poznati tumor supresorski gen u raku pluća je p53 (71). p53 je transkripcijski čimbenik jako izražen u oštećenjima DNA, kada je regulacija ekspresije produkata drugih gena uključena u G2/M DNA oštećenje kontrolne točke i apoptoze (43). Mnoge različite mutacije su utvrđene u p53 genu i one mogu djelovati kao specifični kancerogeni (2, 65). Drugi geni koji se nalaze u kontroli staničnog ciklusa, a mogu biti mutirani u raku pluća jesu: p16 i Rb gen (72). Utvrđena je uloga tumor supresorskog gena karcinoma pluća 1 (engl. tumour suppressor in lung cancer 1 gene, TSLC1) i tumor supresorskog gena različito izraženog u adenokarcinomu pluća 1 (differentially expressed in adenocarcinoma of the lung gene, DAL-1) u odnosu na supresiju rasta tumora i nastanka metastaza (73). Mediator kolapsin odgovora protein 1 (engl. collapsin response mediator protein-1, CRMP-1) je uključen u proces rasta tumora i stvaranja metastaza. (74). CRMP-1 gen je tumor supresorski gen koji učestvuje u progresiji karcinoma.

Stanični protein Ki-67 djeluje na proliferaciju stanica i njegova ekspresija predstavlja lošu prognozu za bolesnika s rakom pluća (75, 76).

Rak pluća nastaje postepeno. Mnoge promjene, posebno karakteristične genetske abnormalnosti pojavljuju se rano u prirodnom tijeku razvoja raka pluća, mnogo prije nego se mogu vidjeti jasne maligne promjene (77). Prijemaligne promjene epitela sluznice bronha obuhvaćaju različite stupnjeve displazije, koje postepeno mogu evoluirati u maligni tumor i povezane su s određenim genskim promjenama. Posebne biološke osobine raka pluća očituju se u čimbenicima rasta, angiogenezi, rezistenciji na lijekove i imunologiji.

#### 1.1.4.1. Čimbenici rasta

Čimbenici rasta su glavni elementi u biologiji svih normalnih i malignih stanica. Oni igraju glavnu ulogu u regulaciji proliferacije, diferencijacije i smrti stanica (78). Tumorske stanice mogu ovisiti o signalima rasta, koji se trajno oslobađaju ili na parakrini ili autokrini način. Čimbenici rasta mogu biti peptidi, steroidi ili druge molekule, koji se oslobađaju od jednog tipa stanice i prenose poruku kroz ekstracelularni prostor do staničnih receptora s najvećim afinitetom. U tumorima su čimbenici rasta od posebnog značaja zbog signala za tumorske stanice koje se dijele i rastu, kao i za stimuliranje neoangiogeneze. SCLC stanice oslobađaju mnogo neuropeptida. To su angiotenzin, inzulinu sličan faktor 1 (engl. insulin-like growth factor 1), serotonin, substanca P i vazopresin zajedno s bombezinom. Ti peptidi se vežu s visoko afinitetnim receptorima na površini tumorske stanice. SCLC stanice mogu izražavati više neuropeptidnih čimbenika rasta i inhibicija bilo kojeg od ovih čimbenika što može blokirati staničnu proliferaciju. Zbog toga su znanstvenici našli mnogo antagonista neuropeptida, koji obećavaju u liječenju SCLC. Također je moguće inhibirati intracelularne signale npr. inhibicijom regulatora kakav je protein kinaza C (79).

SCLC može izražavati i druge tipove receptora, kao što je EGFR, iako se on češće nalazi u stanicama NSCLC (31, 80). Danas postoje komercijalna blokirajuća protutijela za receptore koji se nalaze na površini stanica NSCLC kao što je HER2<sub>-neu</sub> proto-onkogeni produkt (81). Ti su receptori prisutni u oko 10% NSCLC i najviše ima receptora epidermalnog čimbenika rasta. Općenito je poznato da se ta ekspresija receptora u raku pluća znatno razlikuje između pojedinih bolesnika (82).

#### 1.1.4.2. Angiogeneza

Ako tumor poraste za 3 mm onda mora razviti novu krvnu mrežu (neoangiogeneza) (83). To je postepeni proces koji uključuje stimulaciju proliferacije endotelnih stanica s endogenim aktivatorima angiogeneze, „otapanje“ tkiva enzimima kao što su metaloproteinaza i kolagenaza te povećanje endotelne bazalne membrane (84). Ti procesi mogu biti zaustavljeni od inhibitora endogene angiogeneze kao što su angiostatin i endostatin, zatim inhibicijom peptida endogene angiogeneze, kao što su bazični čimbenik rasta fibroblasta (engl. basic fibroblast growth factor, bFGF), ili vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF), koristeći monoklonalna protutijela ili lijekove protiv signala angiogeneze kao što je talidomid (85). Razaranje tkiva se može zaustaviti inhibitorima metaloproteinaze, kao što je marimastat. Za uspješnu antiangiogeničnu terapiju potrebno je liječenje kroz duži period.

#### 1.1.4.3. Rezistencija na lijekove

Rezistencija na lijekove je jedan od glavnih uzroka loših rezultata kemoterapije u liječenju raka pluća. NSCLC je često već u početku rezistentan na kemoterapiju. SCLC je obično osjetljiv na kemoterapiju, barem u početku liječenja (86). Obje vrste tumora, koje su bile osjetljive na kemoterapiju u početku, obično postaju rezistentne u relapsu bolesti. Uzrok ove rezistencije se ispituje dugi niz godina. Jedan od uzroka razvoja rezistencije na lijekove je ekspresija MDR 1 gena, koji utječe na P-glikoproteinsku pumpu (87). To nema veće kliničke važnosti

jer je mala korelacija između ekspresije MDR 1 gena i osjetljivosti na kemoterapiju. Očito postoje drugi mehanizmi kojima se lijekovi istiskuju iz stanica raka pluća.

Ostali mehanizmi rezistencije na lijekove, do sada poznati, uključuju povećanje kapaciteta DNA reparacije, naročito u relapsu NSCLC, kao i porast ekspresije enzima topoizomeraze II, na koji djeluju lijekovi kao etopozid, a taj enzim je potreban i za DNA replikaciju stanica. One stanice koje imaju nižu razinu topoizomeraze, rezistentnije su na lijekove poput etopozida. Druga mogućnost izbjegavanja rezistencije je davanje većih doza kemoterapije, što nije dalo pozitivnih rezultata u preživljavanju.

#### 1.1.4.4. Imunologija

Poznato je da imunološki sistem domaćina reagira na tumorske stanice. Jedan od usputnih efekata toga imunološkog odgovora je razvoj paraneoplastičkog sindroma. Također je ustanovljeno da povećani specifični antitumorski imunološki odgovor nastaje vakcinacijom s peptidnim antigenima. Ta ispitivanja povećavaju broj kliničkih markera imunološke aktivnosti, iako za dokaz njihove kliničke vrijednosti su potrebna daljnja ispitivanja. Imunološki odgovor često nastaje na površinskim staničnim markerima kao što je BEC2 u SCLC (88). Nespecifični imunološki aktivatori kao SRL 172, koji djeluju pojačavanjem staničnog imuniteta, predmet su trajnih kliničkih ispitivanja (89).

### 1.1.5. Probir karcinoma pluća

Negativni rezultati velikih probira raka pluća u 1970-im i 1980-im pružali su pesimističko raspoloženje jer je stotine tisuće ljudi umiralo svake godine zbog raka pluća. Prvi rezultati probira raka pluća s CT-om dali su povoda raspravama o njegovoj opravdanosti u dijagnostici, cijeni i o tehničkom poboljšanju koje bi dovelo i do veće dijagnostičke efikasnosti. Možda je najveći razlog tadašnjem optimizmu bio prepoznavanje ponovnog zanimanja, truda i ulaganja protiv te smrtonosne bolesti.

Liječenje ranootkrivenog raka pluća je dosta uspješno; međutim, rano otkrivanje raka pluća je poteškoća. Petogodišnje preživljavanje operiranog stadija I karcinoma pluća je oko 70% (90). U trenutku kada se rak pluća otkrije, samo oko jedan od četiri slučaja je za kirurško liječenje. Zbog toga je petogodišnje preživljavanje 14% u SAD, 10% u Europi. Zbog navedenog, primarna prevencija (prestanak pušenja) i efikasno rano otkrivanje raka pluća imaju veliki potencijal u spašavanju života.

Metode ranog otkrivanja raka pluća se moraju najviše provoditi među osobama s najvećim rizikom od te bolesti. Pušenje je najveći pojedinačni rizik za nastanak raka pluća. Rizik od raka pluća raste s brojem popušanih cigareta na dan, s udjelom katrana i trajanjem pušenja. Rizik od raka pluća je isto u vezi sa izloženosti azbestom, radonom, prisutnosti raka pluća u porodici, kao i s bronhopneumonijom (91).

Probir (engl. screening) je jedan oblik ranog otkrivanja raka pluća koji uključuje osjetljive tehnike otkrivanja bolesti, kako bi se što ranije moglo provesti što efikasnije liječenje. Za to je prvo potrebno otkrivanje raka pluća prije prisustva

simptoma bolesti (77). To je moguće jer rak pluća nastaje postepeno, progresijom atipičnih stanica do karcinoma *in situ* i invazivnog karcinoma. Drugo, mora postojati način liječenja za vrijeme prijesimptomatske faze, koji utječe na tijek bolesti (92). Iako je rak pluća pristupačan za probir, ne postoji probir kojim bi se smanjio mortalitet od te bolesti. Također, lažno pozitivni nalazi predstavljaju problem u probiru raka pluća. 1960-tih godina rađena su prospektivna, nerandomizirana, kontrolirana ispitivanja sa standardnim radiološkim snimkama torakalnih organa i nađeno je da češće radiološko snimanje rezultira ranijim otkrivanjem raka pluća, ali ne i smanjenjem mortaliteta. Rentgen torakalnih organa se je radio jednom godišnje. Budući da se efikasnost probira pokazuje smanjenjem mortaliteta, potrebna su kontrolirana, randomizirana ispitivanja, da se eliminira utjecaj pristranosti. Prve metode probira bile su citološka analiza sputuma i rentgen torakalnih organa, koje su započete 1970-tih godina. Ispitivana je i rizična skupina, muškarci iznad 45 godina, pušači. Sputum se je uzimao svakih četiri mjeseca, a jednom godišnje se je radio rentgen torakalnih organa. Rezultati više ispitivanja su pokazali da mortalitet od raka pluća nije bio statistički značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu. To je dosta obeshrabrilo daljnja takva ispitivanja. Otkrivanje raka pluća i utvrđivanje stadija jedan (I) standardnim radiološkim snimkama torakalnih organa bilo je u svega 16%. Zbog toga je bilo potrebno naći osjetljiviju radiološku metodu za otkrivanje raka pluća. CT je prepoznat kao mnogo osjetljivija metoda za otkrivanje plućnih lezija (93). Razvojem spiralnog niskodoznog CT-a mnogo se je smanjilo zračenje bolesnika, kao i vrijeme trajanja pretrage. Spiralnim CT-om mogu se otkriti lezije manje od 5 mm. Nakon provedenih ispitivanja niskodozni spiralni CT se pokazao mnogo efikasnijom pretragom, u odnosu na standardni rentgen, u probiru raka pluća (94).

Dodatna poboljšanja u probiru raka pluća donijela je visoko rezolucijska kompjutorizirana tomografija (engl. high-resolution computed tomography, HRCT), višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. multislice computed tomography, MSCT) i pozitronska emisijska tomografija (engl. positron emission tomography with 18 fluorodeoxyglucose, FDG-PET) (95). Ovdje treba napomenuti relativno veliki broj lažno pozitivnih CT nalaza (96).

Sputum se je rano počeo koristiti u probiru raka pluća. Citologija sputuma je najtočnija kod planocelularnog karcinoma pluća, koji se radiološki ne vidi. Pozitivni citološki nalaz može značiti i uznapredovali stadij drugih tipova tumora. Napredak u molekularnoj biologiji je doveo do tehnika kojima se sputum ispituje s većom osjetljivošću nego citologijom u otkrivanju raka pluća. Koristi se imunocitokemija stanica sputuma, kao i monoklona protutijela. Antigen jednog od monoklalnog protutijela je hnRNP, koji je prisutan na malignim stanicama u sputumu i serumu, i koji se može kvantificirati (97). Dosadašnji rezultati otkrivanja malignih stanica u sputumu monoklalnim protutijelima pokazuju da se rak pluća može otkriti mnogo mjeseci i godina prije mikroskopske citološke analize sputuma i može se koristiti u probiru. Koriste se i fluorescentne tehnike u istu svrhu (98). Genetske promjene u sputumu imaju također značenje u probiru raka pluća. Ras familija onkogen je bila otkrivena prvo u NSCLC (67). K-ras mutacije su nađene u oko 1/3 adenokarcinoma. Mutacije K-ras onkogen su nađene u sputumu i bronhoalveolarnom lavatu (BAL), u bolesnika s rakom pluća. Analizom „arhiviranog“ sputuma bolesnika, koji su kasnije oboljeli od raka pluća, nađene su jednake K-ras i p53 mutacije, kao i u tumoru. Najranija klonalna detekcija bila je jednu godinu prije kliničke dijagnoze. Biološki marker engl. gastrin-releasing



peptide, GRP, nađen je u stanicama bronhoalveolarnog lavata i može se koristiti za rano otkrivanje raka pluća.

Postoji mnogo genetičkih i molekularnih promjena u raku pluća i prijeneoplastičkim lezijama (99). Mutacije specifičnih gena (onkogeni, tumor supresorski geni, DNA reparirajući enzimi, metilacijske promjene u genomu) mogu biti mjerljivi indikatori molekularnih promjena koje se rano javljaju samo u tumorima, a ne u normalnom epitelu bronha. Takve promjene otkrivene u raku pluća su: otkrivanje LOH na raznim kromosomima, kao na kratkom kraku kromosoma 2, 3, 8, 9, 12 i 17, mikrosatelitske promjene ili nestabilnost (engl. microsatellite instability, MIN), mutacije specifičnih gena, promjene specifične metilacije karcinoma i detekcija produkata mutanata primjenjujući imunohistokemiju (100). U ispitivanju genetskih promjena korištene su PCR, LOH. Porast frekvencije molekularnih genetskih promjena korelira s abnormalnim nalazom fluorescentne bronhoskopije (engl. lung imaging fluorescence endoscope, LIFE) i s progresijom histoloških promjena. Delecije 8p 21-23 regije su česte i rane promjene u patogenezi raka pluća. Otkrivena je i kvantificirana trisomija 7 u nemalignom epitelu bronha u bolesnika s rakom pluća s FISH-om (101).

Bronhoskopija nije bila ranije korištena u probiru raka pluća. Danas se ispituje mjesto i uloga bronhoskopije u ranom otkrivanju raka pluća.

Fluorescentne tehnike korištene zajedno s bronhoskopijom su pokazale svoje mjesto u otkrivanju ranog invazivnog karcinoma i *in-situ* karcinoma (engl. carcinoma in situ, CIS), koji se ne vide standardnim svjetlosnim tehnikama. Koristeći autofluorescentnu bronhoskopiju postignut je napredak u osjetljivosti otkrivanja umjerene i teške displazije, kao i karcinoma *in situ*, u osoba sa

suspektnim rakom pluća (102, 103). Relativna osjetljivost svjetlosne bronhoskopije plus LIFE u odnosu na svjetlosnu bronhoskopiju je 6,3 u otkrivanju umjerene i teške displazije i CIS (104, 105, 106). Te se patološke promjene, osim kirurškog liječenja, mogu ponekad ukloniti i bronhoskopom, koristeći fotodinamičnu terapiju, elektrokauterizaciju, krioterapiju ili brahiterapiju (103, 107).

Mogućnost otkrivanja genetskih promjena u citološki normalnim stanicama ukazuje da analize kromosoma mogu biti od koristi za otkrivanje prijemalnih promjena u epitelu bronha i mogu služiti kao visoko rizični marker za rak pluća. Koje su genetske promjene najvažnije nije još razjašnjeno. Do danas, niti jedno ispitivanje nije pokazalo da probir raka pluća značajno smanjuje mortalitet od te bolesti (52).

Jednostavnije od skupih tehnika koje se koriste u probiru raka pluća (CT, molekularne tehnike) je upućivati i educirati ljude da ne puše. No, i da se značajno smanji prevalencija pušenja, rak pluća će ostati kao vodeći uzrok smrti od malignoma u cijelom svijetu (108). Napretci u znanosti, koja se bavi ranom detekcijom raka pluća, obećavaju. Te metode, uključujući spiralni CT, uz kontrolirane, randomizirane studije, moraju dovesti do smanjenja mortaliteta, prije njihove široke upotrebe u masovnom probiru raka pluća. Važni čimbenik u probiru raka pluća je i suradnja pučanstva u postupcima ranog otkrivanja te bolesti (91).

### **1.1.6. Klasifikacija karcinoma pluća**

Upotpunjena i izmijenjena klasifikacija tumora pluća prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) objavljena je 1999. godine (109). U Tablici 2. prikazani su invazivni maligni epitelni tumori pluća.

Klasifikacija karcinoma pluća u terapijske svrhe razlikuje karcinom malih stanica ili mikrocelularni karcinom i karcinom ne-malih stanica ili nemikrocelularni karcinom, koji obuhvaća sve ostale tipove karcinoma pluća. U vrijeme otkrivanja mikrocelularnog karcinoma najčešće postoje udaljene metastaze te se kirurško liječenje uglavnom ne preporučuje. Najčešće zastupljeni tipovi karcinoma su: planocelularni karcinom ili karcinom pločastih stanica ili skvamozni karcinom ili epidermoidni karcinom; adenokarcinom ili žljezdani karcinom; mikrocelularni ili karcinom malih stanica; makrocelularni karcinom ili karcinom velikih stanica.

**Tablica 2. Patomorfološka klasifikacija karcinoma pluća**

<p><b>1. KARCINOM PLOČASTIH STANICA</b> papilarni, svjetlostanični, mikrocelularni, bazaloidni</p>
<p><b>2. KARCINOM MALIH STANICA</b> kombinirani</p>
<p><b>3. ŽLJEZDANI KARCINOM</b> acinarni, papilarni, bronhioloalveolarni (nemucinozni, mucinozni, miješani), solidni mucinogeni, miješani, varijante (dobro diferencirani fetalni, koloidni, mucinozni cistadenom, svjetlostanični)</p>
<p><b>4. KARCINOM VELIKIH STANICA</b> neuroendokrini, bazaloidni, „lymphoepithelioma-like“ svjetlostanični, s rabdoidnim fenotipom</p>
<p><b>5. ŽLJEZDANI KARCINOM I KARCINOM PLOČASTIH STANICA</b></p>
<p><b>6. KARCINOMI S PLEOMORFNIM, SARKOMATOIDNIM I SARKOMSKIM ELEMENTIMA</b> pleomorfni, vretenastostanični, orijaškostanični, karcinosarkom, plućni blastom</p>
<p><b>7. KARCINOID</b> tipični, atipični</p>
<p><b>8. KARCINOMI SALIVARNIH ŽLIJEZDA</b> mukoepidermoidni, adenoidno cistični</p>
<p><b>9. NESVRSTANI</b></p>

#### 1.1.6.1. Karcinom pločastih stanica

Karcinom pločastih stanica javlja se u 25-40% slučajeva karcinoma pluća (110). Uglavnom je povezan s pušenjem (111). Obično je smješten centralno, u velikim bronhima, širi se prema torakalnoj stijenci, zahvaćajući plućni parenhim i limfne čvorove. Razvija se nakon višegodišnjih progresivnih promjena mukoze u smislu skvamozne metaplazije, displazije i karcinoma *in situ*. Za postavljanje dijagnoze karcinoma pločastih stanica nužna je prisutnost međustaničnih mostića i roževine. Široki i brojni dezmozomi vežu stanice međusobno. Stanice su obično veličine oko 30  $\mu$  i čine nakupine. Prema stupnju diferenciranosti dijeli se na dobro, umjereno i slabo diferencirani tip, što klinički korelira s prognozom. Dobro diferencirani planocelularni karcinomi narastu do znatne veličine prije nego što metastaziraju u regionalne limfne čvorove ili se prošire u okolne strukture (112). Skloni su raspadanju, a time i krvarenju.

#### 1.1.6.2. Adenokarcinom

Učestalost adenokarcinoma je u porastu u oba spola, ali se češće javlja u žena. Javlja se u oko 25 do 40% slučajeva karcinoma pluća i djelomično nije povezan s pušenjem. Histološka slika je prilično raznolika ovisno o stupnju diferenciranosti. Osnovni patomorfološki kriterij je formiranje žljezdanih oblika ili acinusa, a u većine i sekrecije mucina. Tumori koji nastaju u bronhalnim žljezdama smješteni su u većim bronhima i češći su u osoba mlađe životne dobi. Većina adenokarcinoma je periferna i tu se obično nalazi papilarni tip adenokarcinoma. Adenokarcinom se često proširi na pleuru i limfnim putem metastazira prije nego

što je primarni tumor otkriven. Metastaziraju u mozak, jetru, nadbubrežne žlijezde. Bronhioloalveolarni karcinom nastaje iz terminalnih bronhiola i alveola. Može biti solitaran ili multicentričan, sa ili bez mucina (113).

#### 1.1.6.3. Mikrocelularni karcinom

Oko 15% primarnih karcinoma pluća čini mikrocelularni karcinom. Povezan je s pušenjem najviše od svih histoloških tipova (114). Građen je od vretenastih, poligonalnih ili stanica poput zrna prosa. Stanice su veličine 10-15  $\mu$ , s malo citoplazme i više hiperkromatskih jezgara. Uglavnom je lokaliziran centralno. Pokazuje tipična obilježja neuroendokrine diferencijacije: gusta granula u jezgri, kromogranin A, neuron specifičnu enolazu (NSE) i produkciju hormona i neuropeptida (115). Rano se širi limfogeno i hematogeno, te brzo stvara regionalne i udaljene metastaze. Tumor je najčešće prilično raširen u trenutku otkrivanja (116).

#### 1.1.6.4. Makrocelularni karcinom

Anaplastični karcinom velikih stanica javlja se u oko 7% slučajeva. Nediferenciran je pod svjetlosnim mikroskopom, nema područje skvamoze, dijagnoza se postavlja isključivanjem ostalih tipova. U većini slučajeva nije povezan s bronhima, zahvaća plućni parenhim i pleuru (117).

### 1.1.7. Klinička slika

Karcinom pluća uzrokuje simptome u prsnom košu i na udaljenim mjestima koji su posljedica širenja primarnog tumora, metastaza ili paraneoplastičkog sindroma. Torakalni simptomi ovise o lokalizaciji tumora i o regionalnom širenju tumora. Simptomi centralno smještenog tumora jesu kašalj, stridor, torakalna bol, hemoptizije, pneumonitis uzrokovan endobronhalnom ili kompresivnom opstrukcijom. Periferni tumori uzrokuju bol, kašalj i dispneju. Veliki tumori se mogu raspadati i imitirati plućni apsces. Intratorakalno širenje karcinoma pluća uzrokuje više simptoma. Paraliza povratnog živca uzrokuje promuklost. Kompresija jednjaka uzrokuje disfagiju. Paraliza ošitnog živca uzrokuje elevaciju dijafragme i dispneju. Tumor u vršku pluća daje karakterističnu kliničku sliku koja se naziva Pancoastov sindrom. Tumor raste brzo, infiltrira visceralnu pleuru, prelazi na torakalnu stijenu gdje destruiira najčešće prvo i drugo rebro, infiltrira brahijalni plexus i trunkus simpatikus. Kliničke manifestacije tih promjena jesu jaka bol u ramenu, slabost ruke, parestezije i atrofija miškulature. Kada tumor zahvati trunkus simpatikus razvija se Hornerov sindrom, koji se manifestira ptozom vjeđe, miozom i enoftalmusom.

Širenjem tumora u pleuru stvara se pleuralni izljev, u 60% slučajeva adenokarcinoma i 35% slučajeva planocelularnog karcinoma. Pleuralni izljev uzrokuje nedostatak zraka i bol u prsištu. Sindrom gornje šuplje vene posljedica je tumora pluća koji se je proširio u mediastinalne limfne čvorove i pritišće gornju šuplju venu. Perikardijalni izljev nastaje u oko 15% slučajeva tumora pluća i rezultira tamponadom srca, aritmijama i srčanom dekompenzacijom (118).

Paraneoplastički sindrom događa se u 7 do 15% slučajeva bolesnika s karcinomom pluća. To je skupina znakova i simptoma vezanih uz karcinom, koji se dešavaju udaljeno od tumora ili njegovih metastaza. Posljedica su stvaranja sistemskih čimbenika, kao što su polipeptidni hormoni, protutijela, imuni kompleksi, prostaglandini i citokini. Najčešće su posljedica stvaranja polipeptidnih hormona. Cushingov sindrom posljedica je ektopičnog lučenja ACTH. Posljedica ektopičnog lučenja arginin vazopresina je sindrom neadekvatnog lučenja antidiuretskog hormona. Javljaju se uglavnom kod mikrocelularnog karcinoma. Neurološke manifestacije pojavljuju se u obliku neuromiopatija te miasteničnog (Eaton-Lambert) sindroma. Hiperkalcemija kao paraneoplastički sindrom javlja se uglavnom kod planocelularnog karcinoma. Posljedica je povišene aktivnosti osteoklasta, koja je uzrokovana stvaranjem humoralnih medijatora od strane samog tumora ili kao posljedica djelovanja prostaglandina E, vitamina D, TNF- $\alpha$ , interleukina 1. Od sistemskih čimbenika uključeni su tumorski čimbenici rasta alfa i beta i paratireoidnom hormonu pridružen protein (119, 120).

#### **1.1.8. Dijagnostika karcinoma pluća**

Dijagnoza karcinoma pluća obično započinje promijenjenim radiološkim nalazom u okviru rutinskih pretraga ili zbog određenih tegoba. Radiološka slika karcinoma pluća ovisi o njegovoj lokalizaciji, koja može biti centralna, periferna ili bronhioloalveolarna. Centralne lezije obično čine distalnu opstrukciju. Svako zasjenjenje koje ne prolazi za dva do tri tjedna odgovarajućeg liječenja zahtijeva daljnju obradu. Potpuno zasjenjenje pluća obično je uzrokovano tumorom u području karine ili glavnog bronha. Približno trećina tumora prikazuje se kao



periferna sjena. Sjene malignog karaktera obično su veće od 3 cm, imaju nazubljene rubove i ne sadrže kalcifikate (121).

#### 1.1.8.1. Fiberbronhoskopija

Fiberbronhoskopija je najvažniji postupak u dijagnostici centralnih endobronhalnih tumora. Centralne lezije prikazuju se kao endobronhalne mase ili kao submukozne ili peribronhijalne infiltrativne lezije. Također omogućuje prikupljanje materijala za citološku ili histološku dijagnozu. Četkanje bronha i biopsija kliještima omogućuje i citološku i histološku analizu kod endobronhalnih tumora u centralnim bronhima i do 85% slučajeva (122).

#### 1.1.8.2. Citološka i histološka dijagnostika karcinoma pluća

Citološka analiza uzoraka dobivenih četkanjem bronha značajan je dijagnostički postupak, osobito u kombinaciji s biopsijom kliještima. Najviše koristi u dijagnostici tumora koji se prikazuju kao infiltrativna ili stenotična lezija. Podudaranje s histološkim nalazom varira od 58% do 82% (123).

Ispiranje bronha je pored četkanja bronha najčešće korištena metoda u dijagnosticiranju karcinoma bronha. Obično se provodi nakon biopsije kliještima i četkanja bronha kako bi se sakupile odljuštene stanice tumora ispiranjem s 30 do 50 ml fiziološke otopine (0,9% NaCl) (124).

Bronhoalveolarna lavaža pretraga je koja je ranije korištena isključivo u dijagnostici intersticijalnih bolesti pluća, a danas se koristi i u citološkoj dijagnostici primarnih karcinoma pluća.

Transbronhalna aspiracija iglom koristi se u dijagnostici submukoznih promjena ili masa koje pritišću lumen bronha izvana, te za dokazivanje prisutnosti metastaza u limfnim čvorovima hilusa ili medijastinuma.

U citološkoj i histološkoj dijagnostici perifernih sjena koristi se transtorakalna biopsija iglom pod kontrolom rentgena, CT-a ili ultrazvuka (125, 126, 127).

### **1.1.9. Stupnjevanje karcinoma pluća**

Stupnjevanje proširenosti karcinoma pluća uključuje anatomske proširenosti bolesti (TNM). Pri tome se koriste standardne dijagnostičke metode u koje pripadaju bronhoskopija, standardna radiološka snimka torakalnih organa, CT torakalnih organa. U određivanju proširenosti tumora u medijastinalne limfne čvorove dugo su se vremena koristili invazivni kirurški postupci, uključujući medijastinoskopiju (128). Danas se koriste manje invazivne transbronhalne iglene biopsije (engl. transbronchial needle aspiration, TBNA) limfnih čvorova medijastinuma, koji su prethodno prikazani endobronhalnim ultrazvukom (engl. endobronchial ultrasound, EBUS) i/ili PET-om (129, 130). Važno je odrediti i udaljene metastaze. Uobičajene, konvencionalne, pretrage su UTZ, CT, PET i scintigrafija kosti. Mnogo bolji rezultati postižu se integriranom primjenom PET/CT-a, kada se kombiniranjem metaboličkih i anatomske podataka ustanove, ostalim pretragama nedostupne, ekstrapulmonalne metastaze, što je od velike koristi u određivanju stadija karcinoma pluća (131). Uspješno se koriste u ustanovljavanju udaljenih metastaza karcinoma pluća, kao i uspješnosti liječenja, tumorski markeri, od kojih je u najširoj upotrebi karcinoembrionalni antigen (engl. carcinoembryonic

antigen, CEA) (132). Osim CEA važan tumorski marker u prognozi raka pluća je i tkivni polipeptidni antigen (engl. tissue polypeptide antigen, TPA) (52).

U Tablici 3. prikazano je TNM stupnjevanje, a u Tablici 4. stadiji karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji (133).

TNM klasifikacija korisna je u odluci o daljnjem liječenju, uz histološki nalaz i procjenu općeg stanja bolesnika.

Okultni karcinom pluća dijagnosticira se prisustvom malignih stanica u sputumu ili bronhalnom sekretu, bez radiološkog ili bronhoskopskog nalaza. Kod stadija I i II tumor ne prelazi visceralnu pleuru i obično je pogodan za kiruršku resekciju. Kod stadija IIIA širi se u okolne strukture, metastazira u ipsilateralne limfne čvorove i ponekad je pogodan za kiruršku resekciju. Kirurška resekcija samo rijetko je moguća u IIIB stadiju kada je tumor proširen u kontralateralne hilarne limfne čvorove i medijastinalne limfne čvorove. Stadij IV uključuje udaljene metastaze. Pravilno stupnjevanje od posebnog je značaja za bolesnike i s nemikrocelularnim i s mikrocelularnim karcinomom pluća, zbog odluke o daljnjoj terapiji kao i prognozi bolesti (134). Za klasifikaciju mikrocelularnog karcinoma u uporabi je podjela na ograničenu i proširenu bolest. Kemoterapija je nesumnjivo početna terapija gotovo svih bolesnika s mikrocelularnim karcinomom, no uključivanje drugih terapijskih mogućnosti, kao što je radioterapija, rijetko kirurška terapija ili transplantacija koštane srži, ovisi o prisutnosti ili odsutnosti ekstratorakalnih metastaza. Kod nemikrocelularnog karcinoma stupnjevanje je od posebne važnosti budući da o njemu ovisi odluka o kirurškoj terapiji (135).

U stupnjevanju karcinoma bronha od dijagnostičkih postupaka najvažniji je CT toraksa. Pokazuje proširenost primarnog tumora, povećanje regionalnih limfnih čvorova, kao i limfnih čvorova medijastinuma.

**Tablica 3. TNM stupnjevanje karcinoma pluća**

<b>PRIMARNI TUMOR (T)</b>	
<b>Tx</b>	maligne stanice u sputumu ili bronhalnom lavatu
<b>T0</b>	bez evidentnog primarnog tumora
<b>Tis</b>	karcinoma in situ
<b>T1</b>	manji od 3 cm, nije proksimalno od lobarnog bronha
<b>T2</b>	veći od 3 cm, ili u glavnom bronhu, najmanje 2 cm distalno od karine, ili invazija visceralne pleure, ili atelektaza odnosno opstruktivni pneumonitis koji ne zahvaća cijela pluća
<b>T3</b>	bilo koja veličina s invazijom torakalne stijenke, abdominalne dijafragme, medijastinalne pleure, perikarda, ili tumor glavnog bronha, manje od 2 cm od karine, ili atelektaza odnosno opstruktivni pneumonitis cijelih pluća
<b>T4</b>	bilo koja veličina s invazijom medijastinuma, srca, velikih krvnih žila, traheje, jednjaka, kralježnice, karine, drugi tumor u istom lobusu, maligni pleuralni izljev
<b>REGIONALNI LIMFNI ČVOROVİ (N)</b>	
<b>Nx</b>	ocjena nije moguća
<b>N0</b>	nema metastaza
<b>N1</b>	peribronhijalne, hilarne iste strane, intrapulmonalne, uključujući direktnu invaziju tumora
<b>N2</b>	ipsilateralne medijastinalne, subkarinalne
<b>N3</b>	kontralateralne medijastinalne i hilarne , uz musculus scalenus, supraklavikularno
<b>UDALJENE METASTAZE (M)</b>	
<b>Mx</b>	ocjena nije moguća
<b>M0</b>	nema metastaza
<b>M1</b>	udaljene metastaze ili drugi tumor u drugom lobusu

**Tablica 4. Stadiji karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji**

<b>OKULTNI KARCINOM</b>	Tx	N0	M0
<b>STADIJ 0</b>	Tis	N0	M0
<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
	T3	N0	M0
<b>STADIJ IIIA</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
<b>STADIJ IIIB</b>	bilo koji T	N3	M0
	T4	bilo koji N	M0
<b>STADIJ IV</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1

#### 1.1.10. Liječenje karcinoma pluća

U liječenju karcinoma pluća presudno je utvrditi da li se radi o nemikrocelularnom ili mikrocelularnom karcinomu. Kod nemikrocelularnog karcinoma metoda izbora je operacija, dok je kod mikrocelularnog osnovno liječenje kemoterapija. U kasnim fazama karcinoma pluća, osobito kod opstrukcija centralnih bronha, koristi se resekcija tumora laserom, elektrokauterizacija, argon plazma koagulacija, metalni i silikonski stentovi.

#### 1.1.10.1. Kirurško liječenje

Cilj radikalne operacije je odstraniti čitavo tumorsko tkivo i sve dostupne limfne čvorove. Pri tome može biti reseciran i dio torakalne stijenke, dijafragme i osrčja. Operacija je indicirana kada je funkcionalno dozvoljena, tehnički izvodljiva i kada bolesnik na nju pristaje. Palijativna operacija, kod koje operater unaprijed zna da nije moguće odstraniti čitavo tumorsko tkivo, iznimno je indicirana kod jakih krvarenja iz tumora, septičkog stanja zbog raspadanja tumorskog tkiva i jakih bolova (136).

Resekcija jednog plućnog režnja najmanji je zahvat koji se preporučuje. Manje opsežne operacije, segmentektomija, klinasta resekcija, dozvoljene su iznimno ukoliko lobektomija zbog funkcionalnih razloga nije izvodljiva.

Tumor je inoperabilan u slučaju N3 i T4 stadija bolesti, kao i u slučaju pareze povratnog živca, malignog pleuralnog i perikardijalnog izljeva, Pancoast sindroma, sindroma gornje šuplje vene i udaljenih metastaza. Iznimka je solitarna, operabilna metastaza u mozgu, gdje dolazi u obzir radikalna operacija u glavi (137).

U malim inoperabilnim NSCLC koristi se perkutana, CT-om vođena, radiofrekvencijska termalna ablacija (engl. radiofrequency thermal ablation, RFTA) s vrlo dobrim rezultatima (138).

#### 1.1.10.2. Radioterapija

Cilj zračenja je devitalizirati tumor i regionalne metastaze, umanjiti simptome koje tumor izaziva i produžiti preživljavanje. Prije terapije zračenjem

nužna je citološka potvrda tumora, osim kod sindroma gornje šuplje vene i Pancoast tumora, kod kojih se zračenje provodi i bez citološke potvrde. Radikalno zračenje vrši se najmanje s 5000 cGy kroz 5 tjedana u kontinuiranom režimu ili podijeljenoj dozi. Zračenje je indicirano u slučaju dispneje, nadražajnog kašlja, hemoptizija, disfagije, sindroma gornje šuplje vene, jakih bolova. Postoperativno zračenje indicirano je kod neradikalne operacije. Prijeoperativno zračenje indicirano je kod potencijalno operabilnih tumora u plućnom vršku. Doza zračenja je 3000 cGy kroz dva tjedna, a potom slijedi operacija za nekoliko tjedana (139).

#### 1.1.10.3. Kemoterapija

Rutinski se kemoterapija provodi samo kod mikrocelularnog karcinoma, koji je osjetljiv na kemoterapiju. U pravilu se koristi polikemoterapija. Provodi se svaka 3 do 4 tjedna, ukupno 4 do 6 ciklusa. U bolesnika s potpunom remisijom i ograničenom bolesti može se provesti profilaktičko zračenje glave, koje smanjuje rizik od metastaza mozga (140).

Kod nemikrocelularnog karcinoma kemoterapija je indicirana u slučaju karcinoze pleure i perikarda, lokalno ili sistemski, i u kombinaciji sa zračenjem (118, 141). Obećavajuće rezultate daje kirurško liječenje nakon kemoradioterapije (142).

## 1.2. CITOKINI

Citokini su niskomolekularni glikoproteini koji posreduju djelovanje jedne stanice na drugu. To su topljivi produkti limfoidnih i nelimfoidnih stanica koje

sudjeluju u centralnoj i perifernoj regulaciji imunoloških reakcija, te reguliraju stanični rast i diferencijaciju u mnogim biološkim procesima, kako u fiziološkim tako i u patološkim uvjetima (143). Otkriveni su i proučavani u početku samo u imunološkom (prirođeni i stečeni), i hematopoetskom sustavu, no uključeni su u mnoge procese u organizmu, uključujući i embrionalni razvoj. Luče ih limfociti T, makrofagi, kao i fibroblasti, endotelne, epitelne i druge stanice (144). Neophodni su u interakciji između stanica uključenih u imunološki odgovor te služe u posredovanju i regulaciji upalnog odgovora. Kod prirođene imunosti, produkti bakterija, kao što je lipopolisaharid, direktno stimuliraju mononuklearne fagocite na lučenje citokina (145). U ove spadaju proinflamatorni citokini, interferoni tip I, aktivatori NK i T stanica i kemokini (146). Suprotno tome citokini T stanica, medijatori stečene imunosti, nastaju prvenstveno kao odgovor na specifično prepoznavanje antigena. Utječu na aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju T i B limfocita, kao i na efektorsku fazu specifičnog imunološkog odgovora.

Lučenje citokina je kratkotrajan, vremenski ograničen događaj, a njihova je sinteza potaknuta aktiviranjem specifičnih gena. Jedna stanica može proizvoditi više citokina. Većinu citokina proizvodi više različitih stanica. Za djelovanje mnogih citokina svojstven je i pleiotropizam, što znači da jedan te isti citokin djeluje na nekoliko vrsta stanica i ima više različitih učinaka. Citokini često imaju brojne različite efekte na istu ciljnu stanicu. Neki efekti nastaju istovremeno, dok se drugi zbivaju u različitom vremenskom periodu. Za citokine je karakteristična i redundancija, što znači da isto djelovanje na istu stanicu može imati nekoliko citokina. To osigurava funkcionalnu raznovrsnost upalnog odgovora i imunološkog sustava (147). Stoga se rijetko događa da gubitak ili neutralizacija jednog citokina značajno djeluje na ukupnu funkciju bilo kojeg od tih dvaju sustava.



Citokini često utječu na sintezu drugih citokina, što vodi u kaskadu, u kojoj drugi ili treći citokin posreduje biološke efekte prvog citokina. Sposobnost jednog citokina da poveća ili smanji stvaranje drugog može osigurati važan pozitivan ili negativan regulatorni mehanizam za imunosni ili upalni odgovor. Međusobno djelovanje pojedinih citokina može biti sinergističko, može dovesti do dodatnih efekata, ili može biti antagonističko (148).

Poput polipeptidnih hormona citokini započinju djelovanje vežući se na specifični receptor na površini ciljne stanice. Ciljna stanica može biti ista stanica koja luči citokin (autokrino djelovanje), susjedna stanica (parakrino djelovanje) ili udaljena stanica koja je stimulirana putem citokina koji je izlučen u cirkulaciju (endokrino djelovanje).

Receptori za citokine pokazuju vrlo visoki afinitet za njihove ligande. Vrlo mala količina citokina potrebna je da potakne biološki efekt (149). Izražavanje citokinskih receptora regulirano je pomoću specifičnih signala. Signal može biti drugi citokin ili isti citokin koji se veže na receptor.

Citokini se klasično svrstavaju u četiri glavne skupine: interleukini, interferoni, citoksini i čimbenici stimulacije kolonija. U novije vrijeme citokini se svrstavaju u podskupine prema građi i mehanizmu djelovanja njihovih receptora. Tako se citokini dijele u nekoliko obitelji: IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15), obitelj IL-6 (IL-6, IL-11, i LIF), obitelj hematopoetina (GM-CSF, IL-3, IL-5, eritropoetin), obitelj s receptorom poput imunoglobulina (IL-1, M-CSF), obitelj TNF (TNF-alfa, TNF-beta, CD4OL, FasL) i interferonska obitelj (svi interferoni) (150). Ta podjela omogućuje bolje shvaćanje pleiotropizma i redundancije u njihovom djelovanju te defekata pri nedostatku sinteze pojedinih citokina. Do danas je

otkriveno više od 100 različitih citokina. Citokini kao imunoregulacijski čimbenici imaju važnost u nadzoru rasta malignih tumora (151).

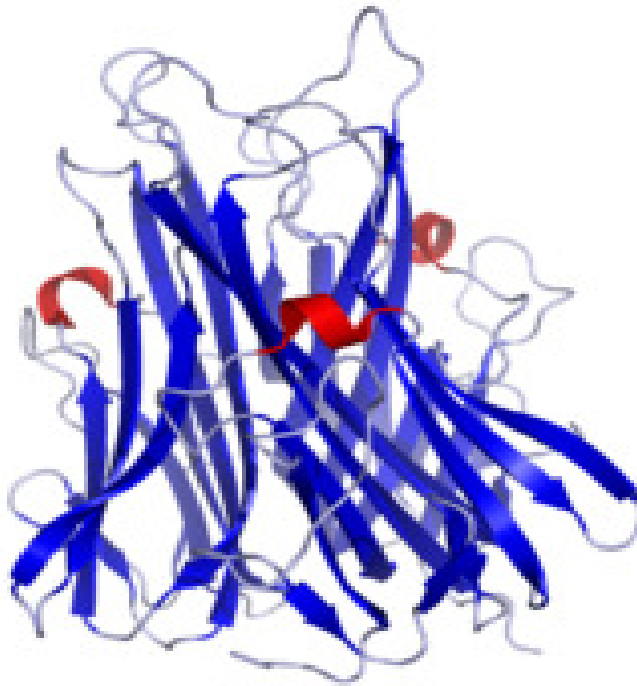
### **1.2.1. Čimbenik nekroze tumora (TNF)**

Čimbenik nekroze tumora citokin je koji se javlja u domaćina tijekom akutnog upalnog odgovora. Citotoksičan je za neke tumorske stanične linije *in vitro*, a dovodi i do nekroze nekih tumora *in vivo* (152). Ovaj je fenomen opisan krajem prošlog stoljeća kada je uočeno da teške infekcije mogu dovesti do regresije nekih tumora što je kasnije pripisano otpuštanju citotoksičnih citokina tijekom infekcije (153). TNF- $\alpha$  kahektin i TNF- $\beta$  limfotoksin strukturno su i funkcijski homologni proteini. TNF- $\alpha$  uglavnom stvaraju stanice monocitno makrofagne linije, NK stanice i T stanice (154). Djeluje u lokalnoj upali i aktivaciji endotela, a posjeduje i snažno citotoksično djelovanje. TNF- $\beta$  uglavnom stvaraju T i B limfociti (155). Sudjeluje u ubijanju stanica i aktivaciji endotela. Homologija u aminokiselinskoj građi između TNF alfa i beta je oko 30%, ali se oba proteina vežu na iste receptore TNF-R55 i TNF-R75 i općenito potiču slične biološke odgovore (9). TNF-R55 i TNF-R75 slični su u ekstracelularnim regijama, gdje oba sadrže karakteristični 6-cisteinski slijed, dok je u citoplazmatskoj regiji slijed različit što ukazuje na različite načine signaliziranja i funkcije (156). Brojne studije s protutijelima protiv TNF-55 receptora dokazuju da je TNF-R55 receptor važan za većinu pleiotropnih aktivnosti TNF- $\alpha$ , uključujući citotoksičnost, proliferaciju fibroblasta, rezistenciju na klamidije, sintezu prostaglandina E2, protuvirusnu aktivnost i indukciju dizmutaze magnezijevog superoksida (157).

TNF- $\alpha$  se najviše luči lipopolisaharidima stimuliranim makrofagima (158) i uzrokuje nekrozu tumora *in vivo* injiciran u tumor miša i od tuda mu potječe naziv. Eksperimentalno TNF- $\alpha$  uzrokuje citolizu ili citostazu u nekih transformiranih stanica te tako djeluje sinergistički s gama interferenom u citotoksičnosti. Molekularna težina TNF- $\alpha$  je 17 kD. Specifičan je za vrstu. TNF- $\alpha$  produciraju mnoge različite stanice. Glavni izvor *in vivo* su stimulirani monociti, fibroblasti i endotelne stanice. TNF- $\alpha$  proizvode i stimulirani makrofagi, T stanice, B limfociti, granulociti, glatke mišićne stanice, eozinofili, hondrociti, osteoblasti, mastociti, glija stanice, keratinociti. Stanice glioblastoma također produciraju TNF- $\alpha$ , a ovaj se čimbenik može naći i u cerebrospinalnom likvoru (159). Majčino mlijeko također sadrži TNF- $\alpha$  (160).

Fiziološki stimulusi za sintezu TNF- $\alpha$  su IL-1, bakterijski endotoksini, čimbenik rasta trombocita (PDGF), onkostatin M. U fibroblastima sinteza TNF- $\alpha$  je stimulirana s IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF i virusnim infekcijama. TNF- $\alpha$  može stimulirati ili inhibirati svoju vlastitu sintezu, ovisno o tipu stanica. U epitelnim, endotelnim i fibroblastima sekrecija TNF- $\alpha$  je inducirana s IL-17 (161).

TNF- $\alpha$  je protein od 185 aminokiselina glikoziliran na pozicijama 73 i 172 (Slika 2.). On se sintetizira iz prekursora (inaktivnog) proteina od 212 aminokiselina.



**Slika 2. TNF- $\alpha$  protein**

TNF- $\alpha$  konvertirajući enzim (TACE) uzrokuje cijepanje TNF- $\alpha$  te se stvara bioaktivni solubilni TNF- $\alpha$ . Izlučeni proteini postoje kao multimeri od dva, tri ili pet nekovalentnih povezanih jedinica, a u nereduciranim uvjetima su jednostruka 17-kDa pruga u SDS-PAGE elektroforezi. Monociti imaju najmanje pet različitih molekularnih formi TNF- $\alpha$  s molekularnim masama od 21,5 do 28 kDa. Oni se uglavnom razlikuju prema post-translacijskim izmjenama kao što je glikozilacija i fosforilacija. TNF- $\alpha$  je sasvim usko povezan s 25-kDa proteinom TNF- $\beta$  (limfotoksin), s oko 30% jednake sekvence aminokiselina i dijele jednake receptore i stanične aktivnosti. TNF- $\alpha$  sudjeluje u važnim funkcijama homeostaze i patofiziologije.

TNF- $\alpha$  sudjeluje u kompleksnim biološkim događanjima u najmanje 29 članova familije različitih receptora čimbenika nekroze tumora (TNFR). U fiziološkim homeostatskim uvjetima biološke funkcije ove familije citokina

obuhvaćaju korisne i protektivne uloge u prirođenoj imunosti i hematopoezi i imaju presudnu ulogu u organogenezi. Članovi TNF familije su također uključeni u mehanizme signaliziranja u staničnoj proliferaciji, preživljavanju i apoptozi (162).

TNF- $\alpha$  različit je od drugih citokina po tome što ukoliko se otpušta, sistemski može izazvati velika oštećenja, šok pa i smrt. Citotoksičan je za mnoge tumore, djeluje kao čimbenik rasta za fibroblaste i stvara sistemske efekte kao što su vrućica i kaheksija (163). TNF- $\alpha$  identičan je kahektinu, peptidu poznatom po sposobnosti da potiče vrućicu i gubitak težine. Biološki efekti TNF- $\alpha$  *in vivo* kombinacija su neposrednih učinaka na ciljne stanice, koji povisuju specifične TNF receptore i posrednih učinaka koji su posljedica djelovanja citokina i upalnih medijatora potaknutih TNF-om (164).

TNF- $\alpha$  djeluje sinergistički s IL-1 u stvaranju lokalne upale. Razina TNF- $\alpha$  raste brzo u serumu nakon stimulacije s lipopolisaharidom (LPS). TNF- $\alpha$  posreduje u nastanku lokalne upale preko mehanizama koji utječu i na celularnu i na vaskularnu komponentu upale. Aktivira neutrofile, limfocite i monocite. Djeluje na endotelne stanice povećavajući lokalni protok krvi i vaskularnu permeabilnost i potiče prokoagulantnu aktivnost. Uzrokuje hemoragičnu nekrozu tumorskih stanica, kao i okolnog tkiva (Shwartzman-ova reakcija) (165).

*In vivo*, davanje bakterijskog lipopolisaharida dovodi do visoke razine produkcije TNF- $\alpha$  u životinjskim modelima i stvaranja mnogo zajedničkih okolnosti kao i septičkom šoku sa snažnim proupalnim reakcijama. Visoka razina TNF- $\alpha$  je također uočena u ljudima koji su primili bakterijski endotoksin. Ova *in vitro* i *in vivo* ispitivanja pokazuju da visoka razina TNF- $\alpha$  dovodi do egzacerbacija upalnih i prooksidativnih reakcija, koje su važne u patogenezi mnogih bolesti.

Teške lokalne upale često su praćene promjenama tkiva koje se sastoje u angiogenezi i fibrozi (27). TNF- $\alpha$  potiče rast novih krvnih žila kod povreda i upala (166).

Direktni antitumorski mehanizmi TNF- $\alpha$  postižu se neposrednim oštećenjem DNA, aktivacijom fosfolipaze, što može rezultirati stvaranjem slobodnih radikala kisika i aktivacijom proteaza.

Brojni agensi inhibiraju stvaranje ili djelovanje TNF- $\alpha$  (167). Inhibitori fosfodiesteraze mogu smanjiti stvaranje TNF- $\alpha$ , zatim kortikosteroidi te IL-10 ili inhibitori metaloproteaze, enzima ključnog u nastanku TNF- $\alpha$ . Kao antagonisti već stvorenog TNF- $\alpha$  djeluju humani solubilni TNF receptori, koji oponašaju inhibitorne učinke fizioloških solubilnih TNF receptora, ili protutijela na TNF- $\alpha$  receptore (168). U kliničkoj uporabi su infliximab, etanercept i adalimumab, koji se najviše koriste u liječenju reumatoidnog artritisa (RA) (167). Bolesnici koji su primali te biološke lijekove češće su kao komplikaciju liječenja imali teške infekcije i povećani rizik od malignoma (169). Uočeno je da u bolesnika, koji su liječeni s anti-TNF protutijelima, dolazi do reaktivacije latentnog melanoma (170). U bolesnika s reumatoidnim artritisom koji su primali infliximab češći su bili limfomi u odnosu na placebo, ali su limfomi u nekim ispitivanjima inače učestaliji u bolesnika s RA (171, 172).

#### 1.2.1.1. TNF- $\alpha$ i pluća

Alveolarni makrofazi najvažniji su izvor TNF- $\alpha$  u plućima. Najvažniji poticaj za produkciju TNF- $\alpha$  od strane alveolarnih makrofaga (AM) je endotoksin (173). Interferon gama također može biti važan endogeni medijator u poticanju

otpuštanja TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  u plućima aktivira makrofage povećavajući njihovu citotoksičnu aktivnost, time što otpuštaju lipidne modulatore upale, kao što je prostaglandin E2 i pojačava upalni odgovor sudjelovanjem citokina kao što je IL-1 (174). PGE2 potiče i mnoge druge funkcije alveolarnih makrofaga, kao tumoroubilačko djelovanje, fagocitozu, oslobađanje medijatora. PGE2 inhibira oslobađanje mnogih citokina iz AM, među njima i TNF- $\alpha$  i tako djeluje protuupalno, ali i potiče ekspresiju protuupalnog citokina IL-10 (175). TNF- $\alpha$  može povećati protok krvi otpuštanjem vazodilatatora iz endotelnih stanica, kao što su prostaglandini i nitrični oksidi koji relaksiraju glatke mišiće krvnih žila. Uzrokuje prokoagulantnu aktivnost što može doprinijeti mikrovaskularnoj trombozi primijećenoj tijekom upale. TNF- $\alpha$  potiče fibroblaste na otpuštanje kemotaktičnih citokina kao što su IL-8 i monocitni kemotaktični protein. IL-2 također inducira otpuštanje TNF- $\alpha$  u humanim perifernim monocitima kao i alveolarnim makrofagima (176). TNF- $\alpha$  mjereno u BAL-u uvijek je proizvod alveolarnih makrofaga, dok su limfociti u plućima glavni izvor TNF- $\beta$ . Endotel i glatke mišićne stanice krvnih žila pluća također proizvode TNF- $\alpha$  (177).

Pod fiziološkim uvjetima neutrofilni nisu nazočni u sluznici bronha ili alveolarnom parenhimu u značajnijem broju. Njihov broj povećava se tijekom bronhitisa ili pneumonitisa. TNF- $\alpha$  regulira funkciju neutrofila i lizozomalnih enzima. Limfociti jesu prisutni u sluznici bronha u fiziološkim uvjetima. Tijekom upalnog procesa u bronhalnoj sluznici i alveolarnom parenhimu njihov broj raste brzo i oni izražavaju TNF receptore. TNF- $\alpha$  djeluje kao komitogen i povisuje proliferaciju T stanica, kao odgovor na mitogene, antigene i IL-2. TNF- $\alpha$  također doprinosi proliferativnom odgovoru B stanica i povećava proizvodnju

imunoglobulina. Također povećava i aktivnost NK stanica i limfokinima aktiviranu ubilačku staničnu aktivnost (8).

#### 1.2.1.2. TNF- $\alpha$ i ostale bolesti

TNF- $\alpha$ , kao proinflamatorni i prooksidativni citokin, sudjeluje u patogenezi i komplikacijama mnogih bolesti. Zbog snažnog proupalnog djelovanja TNF- $\alpha$  ima svoje važno mjesto u septičkom šoku (178). Mijenjajući aktivnost CD4+ i CD8+ T stanica djeluje apoptotički protiv alogeničnih mikrovaskularnih endotelnih stanica. U teškoj sepsi i septičkom šoku NK stanice izlučuju TNF- $\alpha$  koji dovodi do funkcionalne inaktivacije i apoptoze NK stanica (8). Tako, aktivirane NK stanice produciraju TNF- $\alpha$ , a TNF- $\alpha$  možda kontrolira NK stanice u tumorskoj inicijaciji, rastu i metastaziranju. Postoji hipoteza da TNF- $\alpha$  koji potječe iz NK stanica potiče funkcionalnu inaktivaciju i apoptozu NK stanica.

U akutnom respiracijskom distress sindromu (engl. acute respiratory distress syndrome, ARDS) TNF- $\alpha$  ima proupalno djelovanje i njegova razina je značajno povećana u BAL-u (179, 180). Povišena razina TNF- $\alpha$  može sudjelovati u nastanku ARDS-a. U teškom akutnom respiracijskom sindromu (engl. severe acute respiratory syndrome, SARS) TNF- $\alpha$  je bio viši u serumu bolesnika koji su umrli od SARS-a u odnosu na preživjele (181). Smatra se da C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein, CRP) i TNF- $\alpha$  mogu biti prognostički čimbenici u SARS-u. U sistemskom upalnom sindromu (engl. systemic inflammatory response syndrome, SIRS) i još klinički težem sindromu multiplog organskog popuštanja (engl. multiple organ dysfunction syndrome, MODS), hemofiltracija smanjuje koncentraciju TNF- $\alpha$  u plazmi, na taj način smanjuje upalu i poboljšava



preživljavanje u SIRS-u i MODS-u (182). TNF- $\alpha$  ekspresija u imunskim stanicama BAL-a je povećana u progresiji idiopatske plućne fibroze tj. obične intersticijske upale pluća (engl. idiopathic pulmonary fibrosis, IFP; usual interstitial pneumonia, UIP) (183).

Između ostalih citokina i TNF- $\alpha$  može kod transfuzije koncentriranih eritrocita dovesti do sistemske upalne reakcije, kao i akutne transfuzijske reakcije (184).

Solubilni TNF- $\alpha$  je povišen u autoimunom tireoiditisu jer patološki tireociti produciraju više TNF- $\alpha$  nego zdrave stanice posredno preko povećane aktivnosti protein kinaze C (engl. protein kinase C, pKC) (185).

TNF- $\alpha$  kao proupalni citokin sudjeluje u neoangiogenezi u reumatoidnom artritisu i to parakrinom regulacijom angiogeneze između endotelnih stanica i sinoviocita (186, 187). Razina TNF- $\alpha$  u serumu pokazuje aktivnost reumatoidnog artritisa i odgovor na terapiju (188).

Sarkoidoza je multisistemska granulomatozna bolest povezana sa širenjem i aktivacijom CD4+ T limfocita i makrofaga. TNF- $\alpha$  ima važnu ulogu u stvaranju granuloma. TNF- $\alpha$  se statistički značajno više stvara u alveolarnim makrofazima u aktivnoj sarkoidozi i TNF- $\alpha$  može odrediti fenotip stanica BAL-a u sarkoidozi (189). U drugom istraživanju nije nađeno spontano oslobađanje TNF- $\alpha$  iz alveolarnih makrofaga u aktivnoj sarkoidozi, iako je došlo do aktivacije TLy i oslobađanja IL-2 (190). TNF- $\alpha$  je važan u započinjanju upale u sarkoidozi, u stvaranju granuloma i u progresiji fibroze (neki to ne potvrđuju), kao i u negranulomskoj upali (191). Kortikosteroidi blokiraju oslobađanje TNF- $\alpha$  iz stanica. Poznato je da alveolarni makrofagi luče dva solubilna TNF receptora (engl. soluble TNF receptor, sTNFR), koji blokiraju TNF- $\alpha$  (192). To je važno za patogenezu sarkoidoze i za

postojanje eventualnih kontraregulatora TNF- $\alpha$ . Sniženi TNF- $\alpha$  iz alveolarnih makrofaga u BAL-u je loš prognostički čimbenik za plućnu sarkoidozu, što je posebno važno za one bolesnike koji nemaju indikaciju za liječenje kod postavljanja dijagnoze (193). TNF- $\alpha$  najvjerojatnije nema utjecaja na razvoj fibroze u sarkoidozi (190). T limfociti imaju jaku antiproliferativnu aktivnost u sarkoidoznim granulomima i u perifernoj krvi, ali ipak potpuno ne inhibiraju stvaranje TNF- $\alpha$ . Periferni T limfociti imaju snažnu antiproliferativnu aktivnost, koja može biti odgovorna za stanje anergije (194).

U monocitima periferne krvi u bolesnika s tvrdokornom astmom povećana je ekspresija za membranu vezanog TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  receptora 1 i TNF- $\alpha$  konvertirajućeg enzima. Ti rezultati govore u prilog povećanju TNF- $\alpha$  osovine, a samim time i učinkovitosti antagonista TNF- $\alpha$  (195).

TNF- $\alpha$  je istraživao i u pleuralnim izljevima. Utvrđeno je da se najviše javlja u izljevima uzrokovanim tuberkulozom, ali budući da je u samo 46% od svih tuberkuloznih bolesnika s pleuralnim izljevom nađena povišena razina TNF- $\alpha$ , ne može se smatrati „dijagnostičkim citokinom“ (196).

Patogeneza Wegenerove granulomatoze uključuje TNF- $\alpha$ . Povišena razina TNF- $\alpha$  u plazmi korelira s aktivnim glomerulonefritisom. Jaka *in situ* TNF- $\alpha$  ekspresija je prisutna u infiltrirajućim mononuklearnim stanicama i u epitelnim stanicama Bowmanove čahure u aktivnim lezijama bubrega (197).

Nije nađena povezanost esencijalne arterijske hipertenzije i razine TNF- $\alpha$  (198). Utvrđena je povezanost specifičnog genskog polimorfizma i multiple skleroze (10).

U istraživanjima TNF- $\alpha$  u malignim tumorima dobiveni su različiti rezultati. Maligne stanice stvaraju proinflamatorne citokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), koji dovode

do akutne upale (porast CRP), a ona povećava bazalni metabolizam, što rezultira gubitkom tjelesne mase (163). U istraživanju imunosupresije u odnosu na TNF- $\alpha$  u karcinomima pluća i dojke, utvrđeno je da je imunosupresija u karcinomu dojke jače izražena, a da je u karcinomima pluća TNF- $\alpha$  bio tek neznatno smanjen (11).

### **1.3. POLIMORFIZMI GENA**

Polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphisms, SNP) predstavlja najčešći oblik varijacije u odsječku DNA i javlja se jednom na svakih 1000 baza (199). Neko se mjesto smatra polimorfnim ukoliko postoje najmanje dvije inačice, a učestalost najmanje zastupljene inačice iznosi 1% ili više. SNP-ovi predstavljaju potencijalno ogromno područje za pronalaženje genskih različitosti koje bi mogle biti vezane za razumijevanje procesa u razvoju bolesti, te uloge i funkcije gena koji su uključeni u razvoj bolesti. Procjenjuje se da se na svakih 1000 baza unutar kromosoma čovjeka jedan položaj nukleotida razlikuje od bilo koje druge dvije kopije tog istog kromosoma. Određeni položaj nukleotida smatra se polimorfnim ukoliko postoji u najmanje dvije inačice, a pri tome je učestalost alela najčešće inačice manja od 99%. Polimorfizam jednog nukleotida predstavlja najčešći oblik varijacije u odsječku DNA (200). Nađeno je da SNP-ovi predstavljaju 90% svih polimorfizama. Da bismo razliku u jednom nukleotidu nazvali SNP-om, najmanje zastupljen alel mora biti prisutan u najmanje 1% ispitivane populacije. No, u praksi se pojam SNP rabi puno šire od navedene definicije. Do danas je otkriveno 1,8 milijuna SNP-ova te pohranjeno u baze podataka dostupne javnosti. Najviše pažnje pobuđuju SNP-ovi koji mijenjaju funkciju ili izražaj gena. Pretpostavlja se da broj takvih SNP-ova u genomu

čovjeka iznosi 50 000-250 000. Taj broj predstavlja samo mali postotak od ukupnog broja SNP-ova od kojih većina ne mijenja fenotip. 70% SNP-a ima frekvenciju u populaciji manju od 5%, tako da ih nazivamo rijetkim SNP-om. Pojavnost SNP-ova na razini kromosoma je relativno stalna kroz cijeli genom izuzevši spolne kromosome gdje je pojava mnogo manja u odnosu na autosome. Ipak, postoje razlike u gustoći SNP-ova između specifičnih područja na svakom kromosomu, pa čak i unutar pojedinih gena (201). S obzirom na visoku učestalost u genomu, za pretpostaviti je da bi SNP-ovi mogli biti usko povezani s određenim bolestima. Povezanost određenih, naslijeđenih inačica gena i razvoja bolesti predmet je moderne medicinske genetike. Ukoliko određena inačica gena rezultira razvojem bolesti u promatranom vremenskom periodu, kažemo da je ta inačica visoko prodorna. Ako je zastupljenost inačice u populaciji mala (manje od 1%), onda se to naziva mutacijom, dok se zastupljenost inačice iznad 1% naziva SNP-om. U skladu s prihvaćenom praksom često se koristi pojam SNP šire od navedene definicije, što konkretno znači da upotreba pojmova mutacija i SNP nije strogo razgraničena.

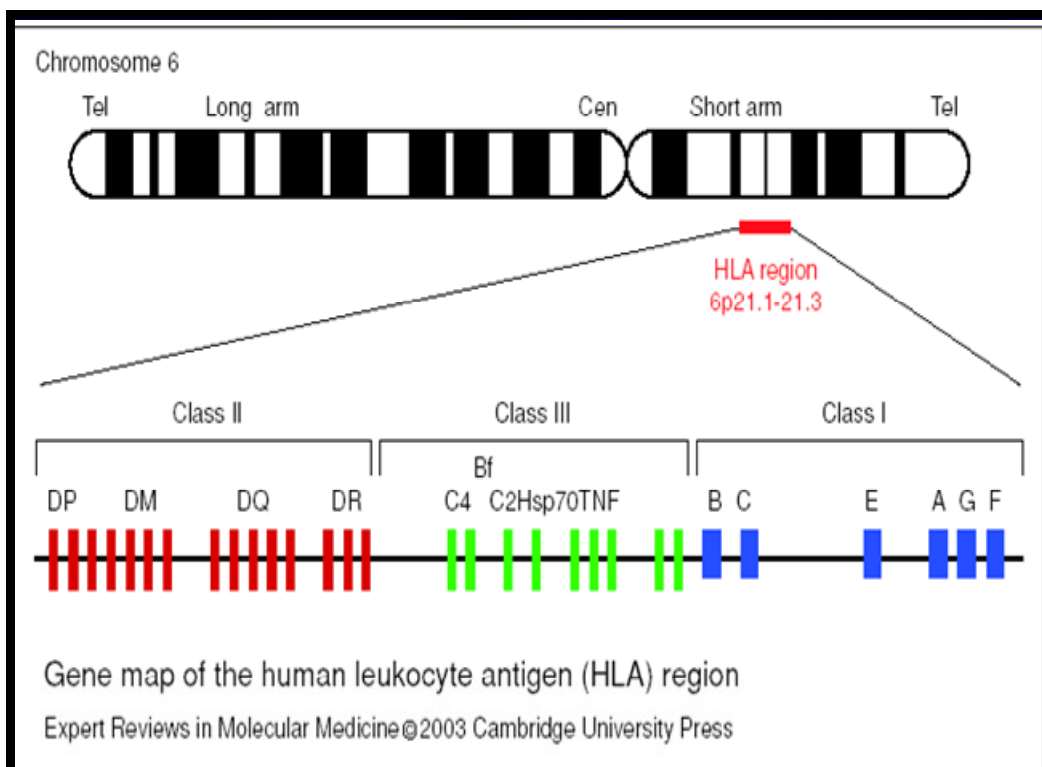
Osim promjene samo jednog nukleotida (SNP) polimorfizam uključuje i deleciju manjeg ili većeg dijela sekvencije DNA, umetanje određenog broja nukleotida ili pak ponavljanja di-, tri- ili oligonukleotida različit broj puta, a koji varira među pojedincima.

Polimorfizam za posljedicu može imati zamjenu jedne aminokiseline drugom ili delecije nekoliko njih. Na razini DNA polimorfizmi su posljedica točkastih mutacija (substitucija) ili fenomena DNA preuređenja (inercija, delecija i inverzija). Polimorfizmi se mogu detektirati elektroforezom ili analizom DNA.

Pretpostavlja se da će u bliskoj budućnosti biti moguće odrediti gensku osnovu složenih bolesti kao što su karcinom, krvožilne bolesti, autoimune bolesti i psihičke bolesti. Broj otkrivenih polimorfizama koji imaju ulogu u razvoju bolesti gotovo eksponencijalno raste iz dana u dan. Također raste i broj polimorfizama bitnih kod odgovora na lijekove (202, 203). Sva ta otkrića dovode do novog pristupa liječenju, ali i sprječavanja bolesti, koje će biti više individualizirano i time učinkovitije i sigurnije.

### 1.3.1. Polimorfizam gena TNF- $\alpha$ u pojedinim humanim bolestima

Do sada je utvrđeno više DNA varijanti ili SNP-ova unutar TNF promotorske regije. TNF gen se nalazi u trećem razredu HLA regije na kromosomu 6p (Slika 3.).



**Slika 3. Genska mapa HLA regije kromosoma 6p**

Učinjen je veliki broj znanstvenih ispitivanja polimorfizma TNF- $\alpha$  u različitim bolestima (204). Najviše su ispitivani polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238. Ispitivana je podložnost pojedinoj bolesti, kao i klinička težina bolesti, povezane s navedenim polimorfizmima. Rezultati pojedinih ispitivanja se razlikuju u incidenciji javljanja, kao i u težini bolesti. Zbog različitih rezultata pojedinih ispitivanja u istih bolesti u nastajanju i kliničkom tijeku nastala je hipoteza da polimorfizmi gena TNF- $\alpha$  nisu povezani s aktivnosti nijedne pojedine bolesti, već s podložnosti da se razviju određeni uvjeti za nastanak bolesti (204).

Smatra se da funkcijski polimorfizmi gena utječu na patogenezu pojedinih bolesti (201).

Do sada nije utvrđen niti jedan genetski čimbenik rizika, osim homozigoteta  $\alpha$ -1 antitripsin gena, za KOPB (205, 39). Rađeno je više istraživanja kojima je bio cilj utvrditi povezanost polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 i KOPB-a. Uvijek se u takvim istraživanjima uzima u obzir čimbenik pušenja jer samo manji broj pušača oboli od KOPB-a. Uzimanjem u obzir navedene funkcijske polimorfizme, kontrolnu skupinu, etničke skupine, nije nađena podložnost za KOPB u kavkaskoj populaciji (206). U drugom istraživanju pod istim uvjetima utvrđeno je da u azijskoj populaciji postoji povezanost polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 i podložnosti i progresije KOPB-a, dok to nije nađeno u kavkaskoj populaciji (207, 208). Istraživanjem polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 u Han populaciji u Kini nije nađena značajna razlika u frekvenciji genotipova i alela između bolesnika s KOPB-om i kontrolne skupine (16). Isti polimorfizam je ispitivan u Tajlandu i nije nađena povezanost s nastankom KOPB-a u pušača (15).

Opstruktivni sindrom prekida disanja tijekom spavanja (engl. obstructive sleep apnoea syndrome, OSAS) ispitivan je u jednom navratu u odnosu prema

polimorfizmu TNF- $\alpha$ -308 (209). Utvrđena je značajna povezanost TNF- $\alpha$ -308 A alela sa OSAS-om, što upućuje da bi proces upale mogao sudjelovati u patogenezi ove bolesti. Ispitanici su pripadali kavkaskoj populaciji.

Ispitivan je TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam u refluksnoj nefropatiji i utvrđeno je da bolesnici s AA genotipom imaju veću podložnost za refluksnu nefropatiju, dok povezanost s aktivnosti bolesti nije nađena (17).

Klinička i molekularna ispitivanja utvrdila su da je TNF- $\alpha$  ključni medijator u nastajanju i propagaciji Kronove bolesti. Utvrđena je povišena razina TNF- $\alpha$  mRNA i proteina u upaljenoj i normalnoj sluznici crijeva, kao i u serumu bolesnika s Kronovom bolesti. Ispitivanjem polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 nije nađena značajna povezanost tih polimorfizama i Kronove bolesti u Newfoundland populaciji (210). U populaciji bijelaca nađena je statistički značajna povezanost TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma i ulceroznog kolitisa. Novije istraživanje pokazuje da TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam je povezan s povećanim stvaranjem TNF- $\alpha$  i povećanim rizikom za podložnost artritisu u bolesnika s Kronovom bolesti s razvijenim fistulama (211).

U turskoj populaciji istraživani su polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u bolesnika s Behçet-ovom bolesti i nije nađena povezanost navedenih polimorfizama s nastankom i težinom Behçet-ove bolesti (13).

TNF- $\alpha$  ima važnu ulogu u patogenezi reumatoidnog artritisa, a anti-TNF- $\alpha$  terapija značajno smanjuje težinu bolesti. TNF- $\alpha$  snažno utječe na upalni odgovor i najvažniji je imunoregulator u RA. Ispitivani su polimorfizmi TNF- $\alpha$  na pozicijama -308 i -238 u Poljaka (91 bolesnik). Navedeni polimorfizmi nisu genetski čimbenici rizika za podložnost i klinički tijek RA (12).

TNF- $\alpha$  je najvažniji citokin u upalnom procesu ateroskleroze. On djeluje na metabolizam lipida, rezistenciju na inzulin, funkciju endotela i na taj način učestvuje u koronarnoj bolesti srca. Ispitivana je mediteranska populacija, koja manje oboljeva od koronarne bolesti u odnosu prema ostaloj europskoj kavkaskoj populaciji. Misli se da je uzrok tome način života i ishrane na Mediteranu. Ovim je istraživanjem potvrđeno da polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 utječe na povećani rizik oboljevanja od koronarne bolesti posebno u bolesnika s dijabetesom tipa 2 u žena (14).

Ispitivan je polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 u bolesnika s ARDS-om u kavkaskoj populaciji. Nađena je povezanost između -308 A alela i smrtnosti u ARDS-u, posebno u mlađih bolesnika. Povezanost -308 GA polimorfizma i razvoja ARDS-a je heterogena i vjerojatno ovisi o noksi koja je prethodila razvoju ARDS-a (212).

Ispitivanja polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 u bolesnika sa sistemskim lupusom eritematodesom (SLE) utvrdila su da polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 GA može doprinijeti podložnosti za SLE, posebno u europskoj populaciji, ali ne u azijskoj i afričkoj (213).

Nađeno je da je A alel TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma značajno povećan u sistemskoj sklerozi ( $p=0,03$ ) i da doprinosi nastanku bolesti (214).

Urađeno je još mnogo ispitivanja na drugim bolestima i stanjima i rezultati su dosta heterogeni s time da vrlo često ovise o etničkoj skupini koja se istražuje.

### **1.3.2. Polimorfizmi gena TNF- $\alpha$ u malignim bolestima**

Polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 su ispitivani i u pojedinim malignim tumorima čovjeka. Rezultati ispitivanja pokazuju predisponirajuću ili protektivnu



ulogu navedenih polimorfizama u odnosu na zdravu populaciju (215). Razna ispitivanja pokazuju različite rezultate u istim tumorima. Osim što je uočeno da polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 predstavljaju rizik za oboljevanje od pojedinog tumora, imaju protektivnu ulogu ili nije ustanovljena statistički značajna razlika u odnosu na zdravu populaciju, također je primijećeno da se rezultati ispitivanja razlikuju u odnosu prema pripadnosti pojedinoj rasi, narodu ili skupini naroda.

U kavkaskoj populaciji ispitivani su bolesnici s malignim melanomom. Utvrđeno je da su polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 uključeni u mehanizme progresije malignog melanoma (216).

Prvo istraživanje u tajvanskoj populaciji utvrdilo je da polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 predstavljaju rizik oboljevanja od skvamoznog karcinoma usta (217).

Ispitivani su bolesnici iz Koreje koji boluju od karcinoma mokraćnog mjehura. Ustanovljeno je da je TNF- $\alpha$ -308 GA genotip ima značajno djelovanje na produkciju TNF- $\alpha$ , koji je viši u serumu bolesnika koji boluju od karcinoma mokraćnog mjehura u odnosu na zdravu populaciju. Također, razina TNF- $\alpha$  raste sa stupnjem tumora pa se smatra da sam tumor izlučuje TNF- $\alpha$  jer GA polimorfizam može biti povezan sa statistički značajnim rastom transkripcije gena (218). Slični rezultati su dobiveni i u kavkaskoj populaciji (219).

Polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 su ispitivani u karcinomu dojke i nađeno je da nemaju utjecaja na razvoj raka dojke u Sjevernoj Europi, osim što je -308 polimorfizam povezan s vaskularnim prodorom tumora dojke (220). Isti polimorfizmi ispitivani su u bolesnica s visokim rizikom od raka dojke, a eventualna povezanost s preživljavanjem u njih nije nađena (221). Istraživanjem

polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 u karcinoma dojke u engleskoj populaciji nije utvrđena podložnost niti prognoza za tu bolest (222).

Više istraživanja je rađeno s polimorfizmima TNF- $\alpha$  u karcinomu želuca. Polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 ne predstavljaju rizik za nastanak karcinoma želuca u Meksikanaca i Tajvanaca (223, 224). U istraživanju portugalske populacije nađeno je da TNF- $\alpha$ -308 A alel povećava rizik za nastanak raka želuca, kao i neki genotipovi TNF- $\alpha$ , što govori da proinflamatorni polimorfizam TNF- $\alpha$  povećava rizik za rak želuca (225). U istraživanju istih polimorfizama u karcinomu želuca u Koreji nije nađena povezanost tih polimorfizama i želučane karcinogeneze (226). Ispitivan je polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 u karcinomu želuca u dvije talijanske regije u kojima postoji značajna razlika u prevalenciji tog malignoma. Utvrđeno je da polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 nije u vezi s povećanim rizikom od raka želuca (227). Poznato je da je *Helicobacter pylori* karcinogen za adenokarcinom želuca. Ispitivanjem polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 u kineskoj populaciji nije nađena značajna povezanost s *Helicobacter pylori* infekcijom u bolesnika s rakom želuca (228).

TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam nije u vezi s razvojem karcinoma jednjaka (229).

Ispitivanjem karcinoma bubrega u turskoj populaciji nađeno je da TNF- $\alpha$ -308 GG genotip ima predisponirajuću ulogu u razvoju karcinoma bubrega, dok TNF- $\alpha$ -308 GA genotip ima protektivnu ulogu (230).

Ispitivani su polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u displaziji vrata maternice. Uočeno je da TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam utječe na podložnost za cervikalnu displaziju, dok TNF- $\alpha$  polimorfizam na poziciji -238 se ne razlikuje u bolesnika i kontrolne skupine (231). Ispitivanjem karcinoma vrata maternice u dvije etničke skupine u Južno Afričkoj Republici u odnosu na polimorfizam TNF- $\alpha$ -

308, nije nađeno značajnih razlika. Kada su se rezultati usporedili s rezultatima istih ispitivanja u kontrolnim skupinama u ostalim krajevima svijeta uočeno je da etničke razlike mogu utjecati na razinu TNF- $\alpha$  produkcije (232).

Najčešći malignom u kavkaskoj populaciji je bazalni karcinom kože (bazaliom). Ispitivanjem polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 nije nađena značajna povezanost frekvencije genotipova ili alela s razvojem bazalioma (233). S druge strane tumorske stanice luče veće količine TNF- $\alpha$ .

Ispitivanjem hepatocelularnog karcinoma nađeno je da je TNF- $\alpha$ -308 A alel značajni prediktor tog tumora neovisno od hepatitisa B i C pa zbog toga bi se mogao koristiti kao biomarker za podložnost hepatocelularnom karcinomu (234).

Ispitivanjem polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 nije utvrđen veći rizik od nastanka multiplog mijeloma u engleskoj populaciji (235).

Polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 nisu povezani s nastankom i progresijom primarnog B-staničnog limfoma želuca (236). TNF- $\alpha$ -308 polimorfizam je negativni prognostički čimbenik u pedijatrijskom Burkitt-ovom limfomu (BL) i B-stanica akutnoj limfoblastičnoj leukemiji (B-ALL) (237).

Polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 ispitan je zajedno s polimorfizmima TNF- $\beta$ , IL-6 i IL-10, u primarnim karcinomima pluća svih tipova, od Seifarta i suradnika 2005. godine, na uzorku od 117 bolesnika u njemačkoj populaciji, i ustanovljeno je da nema korelacije između polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 i podložnosti za karcinom pluća (18).

Shih i suradnici su 2006. godine ispitivali polimorfizme TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u 202 bolesnika s karcinomom pluća ne-malih stanica u kineskoj populaciji (19). Rezultati ovog istraživanja pokazuju povezanost polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 s podložnosti i težinom raka pluća. Alel -308 A ima predisponirajuću

ulogu za nastanak karcinoma pluća i njegovu progresiju, dok -238 A alel ima protektivnu ulogu prema karcinomu pluća (Tablica 5.).

Do sada nije provedeno istraživanje polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 na svim mikromorfološkim tipovima karcinoma pluća u kavkaskoj populaciji, a time niti u hrvatskoj populaciji.

**Tablica 5. Polimorfizmi TNF- $\alpha$  u tumorima različitih populacija**

Tumor	Etnička skupina	Zemlja porijekla	TNF- $\alpha$ -238	TNF- $\alpha$ -308	Autor
melanom	kavkaska	Bugarska	+	+	<i>Nikolova i sur. 2007.</i>
usta	azijska	Tajvan	+	+	<i>Liu i sur. 2005.</i>
mokraćni mjehur	azijska	Koreja		+	<i>Jeong i sur. 2004.</i>
dojka	kavkaska	Engleska	–	–	<i>Azmy i sur. 2004.</i>
dojka	miješana	SAD	–	–	<i>DeMichele i sur. 2003.</i>
dojka	kavkaska	Engleska	–	–	<i>Smith i sur. 2004.</i>
želudac	latinoamerička	Meksiko	–	–	<i>Gonzalez i sur. 2005.</i>
želudac	azijska	Tajvan	–	–	<i>Wu i sur. 2004.</i>
želudac	kavkaska	Portugal		+	<i>Machado i sur. 2003.</i>
želudac	azijska	Koreja	–	–	<i>Lee i sur. 2005.</i>
želudac	kavkaska	Italija		–	<i>Perri i sur. 2005.</i>
želudac	azijska	Kina		–	<i>Li i sur. 2005.</i>
jednjak	kavkaska	Engleska	–		<i>Gough i sur. 2005.</i>
bubreg	kavkaska	Turska		+	<i>Basturk i sur. 2005.</i>
vrat maternice	crnačka	Južnoafrička Republika		–	<i>Govan i sur. 2006.</i>
vrat maternice	kavkaska	Engleska	–	+	<i>Kirkpatrick i sur. 2004.</i>
koža	kavkaska	Danska		–	<i>Skov i sur. 2003.</i>
jetra	azijska	Tajvan		+	<i>Ho i sur. 2004.</i>
multipli mijelom	kavkaska	Engleska	–	–	<i>Morgan i sur. 2005.</i>
limfom	kavkaska	Njemačka	–	–	<i>Hellmig i sur. 2005.</i>
limfom	kavkaska	Njemačka		+	<i>Seidemann i sur. 2005.</i>
limfom	azijska	Tajvan	–	–	<i>Wu i sur. 2004.</i>
pluća	kavkaska	Njemačka		–	<i>Seifart i sur. 2005.</i>
pluća	azijska	Kina	+	+	<i>Shih i sur. 2006.</i>

+ = povećani rizik i/ili progresija tumora

– = nema povećanog rizika i/ili progresije tumora

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj polimorfizama TNF- $\alpha$  (pozicije TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238) na predispoziciju, kliničku ekspresiju, i prognozu bolesti u pacijenata s rakom pluća. Predispozicija za karcinom pluća je važan čimbenik u kliničkim i genetičkim istraživanjima, jer se tako mogu utvrditi osobe u kojih čimbenici okoliša izazivaju manifestni tumor ranije i češće nego u ostalih pojedinaca. Osim toga, učestalost familijarnog javljanja tumora istog ili drugog sijela je važna za pristup potencijalnom budućem bolesniku od maligne bolesti. Češći pregledi i probir pučanstva su tako sve učinkovitiji u ranom otkrivanju i spriječavanju raka pluća. U kliničkoj slici bolesti od posebnog je značaja stadij bolesti u kojem se bolest ustanovljava. Mnogo se češće bolest utvrđuje u uznapredovalim stadijima bolesti (prisutne regionalne i udaljene metastaze), nego u početnim stupnjevima, pa je pojavnost i progresija bolesti, u povezanosti s poznatim polimorfizmima TNF- $\alpha$ , bila od posebnog značaja u ovom istraživanju. Prognoza bolesti tj. vrijeme preživljavanja bolesnika s rakom pluća je uvijek značajan čimbenik u istraživanjima malignih bolesti jer se time određuju agresivnost malignoma i rezultati provedenog liječenja. Da li polimorfizmi TNF- $\alpha$  utječu na preživljavanje bolesnika važno je pitanje za svakog koji se bavi istraživanjem karcinogeneze raka pluća.

Trebalo je utvrditi da li polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i polimorfizmi TNF- $\alpha$ -238 imaju predisponirajuću ili protektivnu ulogu u usporedbi s frekvencijom polimorfizama zdrave populacije, odnosno da li postoji bilo kakva povezanost ili utjecaj tih polimorfizama na nastanak i progresiju karcinoma pluća. Rezultati takvih istraživanja na malignim tumorima drugih lokalizacija bili su vrlo

neujednačeni i povezani s etničkom skupinom koja se ispitivala. Karcinomi pluća ispitivani su do sada u kavkaskoj (Njemačka) i azijskoj (Kina) etničkoj skupini i dobiveni su oprečni rezultati. Zbog visoke incidencije karcinoma pluća bilo je važno ispitati polimorfizme TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 i u hrvatskoj populaciji, čime se doprinosi saznanjima o tim polimorfizmima u kavkaske etničke skupine. Po prvi puta se ovi polimorfizmi ispituju na svim tipovima primarnih karcinoma pluća (NSCLC i SCLC) i po prvi put u našoj populaciji.

Kako citokini sudjeluju u upalnim, ali i procesima karcinogeneze, od interesa je ustanoviti sudjelovanje pojedinih njihovih polimorfizama u tim procesima. Isto tako takvi rezultati mogu pomoći u određivanju važnosti upalnih procesa prema malignoj transformaciji. TNF- $\alpha$  je citokin koji se mnogo istražuje u malignim bolestima. Postoje lijekovi koji inhibiraju aktivnost TNF- $\alpha$ , te je doprinos o njegovim genetičkim svojstvima od važnosti za daljnja saznanja o karcinomu pluća.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

Ispitani su slučajnim odabirom bolesnici u kojih se utvrdio primarni karcinom pluća na Zavodu za pulmologiju, Klinike za interne bolesti, Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Ispitano je 230 bolesnika s primarnim karcinomom pluća svih tipova. Kontrolna skupina sačinjavala je 230 zdravih, nesrodnih ispitanika, uparenih po dobi i spolu iz DNA banke Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta u Rijeci.

#### **3.2. METODE**

##### **3.2.1. Kliničke metode**

Za svakog bolesnika učinila se je kompletna klinička obrada, uključujući obiteljsku anamnezu, laboratorijske pretrage periferne krvi, praćenje rezultata liječenja, vrijeme preživljavanja. Izdvojili su se slijedeći klinički podaci: dob, spol, klinička dijagnoza, sedimentacija eritrocita (SE), C-reaktivni protein, leukociti, neutrofilni, limfociti, eritrociti, hemoglobin, trombociti, alkalna fosfataza (AF), karcinoembrionalni antigen, laktat dehidrogenaza (LDH), gama glutamil-transferaza ( $\gamma$ -GT), alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST), glukoza, proteini, kalcij, zanimanje, indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI), pušenje, histološka dijagnoza, klinički stadij bolesti, provedeno liječenje i vrijeme preživljavanja od postavljanja dijagnoze karcinoma pluća.



Biokemijske i hematološke analize rađene su u Kliničkom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Rijeka – lokalitet Sušak, citološke analize u Citološkom laboratoriju Zavoda za pulmologiju KBC Rijeka, a patohistološke u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

### **3.2.2. Izolacija DNA**

Svakom se bolesniku izvadilo po 5 ml periferne krvi koja je do DNA izolacije zamrznuta u epruветama s antikoagulansom na -20°C. Za molekularno genetičku analizu izolirali smo prema protokolu DNA iz periferne krvi ispitanika. Krv (5 ml) smo odmrznuli pri sobnoj temperaturi, u epruветu dodali 25 ml SLR pufera za lizu (20mM TRIS, 5 Mm EDTA) i inkubirali u hladnjaku 15 minuta na 4°C, i potom pomoću vakum sisaljke odstranili supernatant. Isti postupak ponovili smo 3-5 puta, ovisno o čistoći taloga. Nakon zadnjeg centrifugiranja dodali smo 8 ml SLB pufera (10mM TRIS, 10mM EDTA, 50mM NaCl, 2mM SDS) i dobro promiješali. Potom smo dodali 10 µl otopljene proteaze K i inkubirali preko noći na 37-42°C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije dodali smo 1/3M amonijevog acetata, promiješali i cetrifugirali 30 minuta na 3000 okretaja/minuti pri 4°C. Po centrifugiranju odlili smo supernatant i dodali apsolutni alkohol do konačnog volumena od 40 ml. Epruветu smo lagano okrenuli nekoliko puta dok se nije pojavila DNA. Dobivenu DNA isprali smo prvo u apsolutnom pa 70% i ponovo u apsolutnom alkoholu, te je posušili u termostatu pri 37°C. Osušenu DNA rastopili smo u 200-400 µl TE pufera. Tako dobiven uzorak DNA pohranjujemo na -20°C u banku DNA.

### 3.2.3 Genotipizacija

TNF- $\alpha$ -308 utvrđivali smo metodom lančane reakcije polimerazom nakon čega je slijedila restrikcija PCR produkta s  $N_{CO}$  I restrikcijskom endonukleazom, a za TNF- $\alpha$ -238 polimorfizam koristio se je restrikcijski enzim Msp I (Tablice 6.-8.) (19). Uzorke smo analizirali u serijama od po 10-20 uzoraka, uz negativnu kontrolu.

**Tablica 6. Početnice i temperatura njihovog spajanja**

Početnice	Sekvenca početnica		Ts
	TNF- $\alpha$ -308	TNF- $\alpha$ -238	
TNF1	5'- ATAGGTTTTGAGGGGCA TGG-3'	5'- ATCTGGAGGAAGCGGTA GTG-3'	60,0
TNF2	5'- AATAGGTTTTGAGGGGC ATGACCATCG-3'	5'- AGAAGACCCCCCTCGGA ACC-3'	60,0

**Tablica 7. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15  $\mu$ l**

	Količina (za 1 uzorak)	Konačna koncentracija
10 x PCR pufer	1,71 $\mu$ l	1 x PCR pufer
50 x mM MgCl	0,51 $\mu$ l	1 mM
10 x mM dNTP	0,34 $\mu$ l	0,05 mM
10 x primer	1,71 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
10 x primer	1,71 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
Formamid	0,86	
Taq polimeraza	0,17	1,5 U
Bidestilirana voda	7	
DNA	1 $\mu$	

**Tablica 8. PCR-temperaturni ciklusi**

Korak PCR postupka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94°C	5 min.	1
2.	94°C	1 min.	40x
	60°C	1 min.	
	72°C	1 min.	
3.	72°C	10 min.	1

PCR produkt provjerili smo elektroforezom u trajanju 20-30 min. pri 80 V. Po 4  $\mu$ l PCR produkta i 2  $\mu$ l boje BPB nanosili smo na 1% agarozni gel u koji smo prethodno dodali 2,5  $\mu$ l Etidium Bromida. PCR produkte analizirali smo pod UV

lampom na transluminatoru. Veličinu PCR produkta utvrdili smo primjenom standardnog DNA markera.

Nakon te aplikacije napravili smo restrikciju PCR produkta. U preostalim 9  $\mu$ l PCR produkta dodali smo:

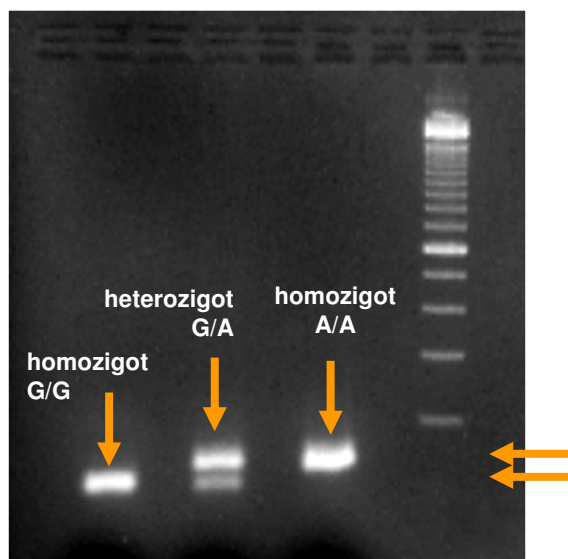
- 2,0  $\mu$ l pufera
- 0,2  $\mu$ l endonukleaze
- 7,8  $\mu$ l bidestilirane vode

Restrikcijsku smjesu smo inkubirali 16-18 sati na 37°C u vodenoj kupelji ili termostatu.

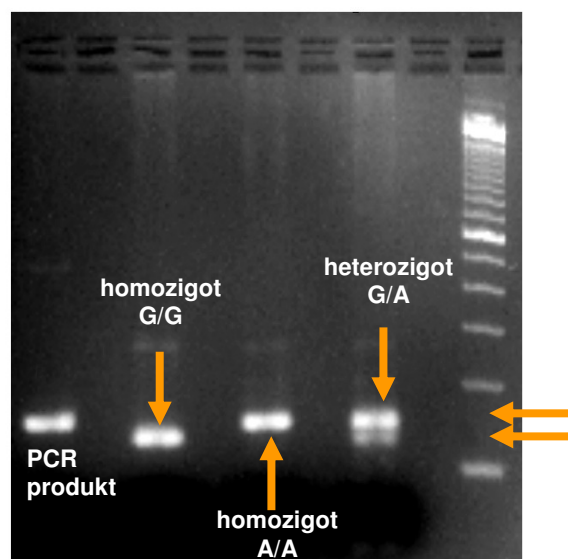
Restrikcijski fragment (8  $\mu$ l produkta + 2  $\mu$ l boje BPB) provjeravali smo elektroforezom (45 min. na 80 V) na 3% agaroznom gelu u koji smo prethodno dodali 2,5  $\mu$ l Etidium Bromida. Restrikcijske fragmente analizirali smo UV lampom, a veličinu restrikcijskih fragmenata utvrdili smo primjenom standardnog DNA markera. Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu jasno su se razlikovali GG, GA, AA genotipovi (Tablica 9. i Slike 4. i 5.).

**Tablica 9. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata u analizi polimorfizma u promotorskoj regiji TNF1 i TNF2**

Genotip	TNF- $\alpha$ -308		TNF- $\alpha$ -238	
	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragmenti (bp)	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragmenti (bp)
GG	107	87, 20	152	132, 20
GA		107, 87, 20		152, 132, 20
AA		107		152



Slika 4. Identifikacija TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma



Slika 5. Identifikacija TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma

### 3.2.4. Statističke metode

Statistička obrada podataka provedena je uz pomoć računalnih programa Statistika 7.1 i Epi 6. Usporedba učestalosti pojedinih alela i genotipova u skupini i podskupinama bolesnika sa skupinom zdravih ispitanika izvršena je pomoću  $\chi^2$  testa i Fisherovog egzaktnog testa.  $\chi^2$  test je korišten i za usporedbu opaženih vrijednosti distribucije različitih TNF- $\alpha$  genotipova u odnosu na predviđene Hardy-Weinbergovom jednadžbom. Također je ispitana korelacija između genotipova i fenotipske ekspresije bolesti, pri čemu je povezanost ispitivanih polimorfizama s kliničkopatološkom slikom, te stadijem bolesti testirana  $\chi^2$  i Fisherovim egzaktnim testom, uz izračune omjera izgleda (OR) i 95% intervale pouzdanosti (CI). U okviru analize laboratorijskih pokazatelja koristila se deskriptivna statistika (srednje vrijednosti, standardne devijacije), a povezanost između ispitivanih polimorfizama i navedenih pokazatelja testirana je analizom varijancije, metodom parametrijske statistike jednosmjernim ANOVA testom i analizom logističke regresije. Rezultati su smatrani statistički značajno različitim na razini  $p < 0,05$ .

Na osnovu 230 bolesnika i 230 kontrola uključenih u istraživanje statistička snaga studije iznosi 80% da bismo mogli identificirati u bolesnika povećanje frekvencije nositelja TNF- $\alpha$ -308 A alela od 1,5 (26% u kontrolnoj skupini) i povećanje od 2,2 za nositelje TNF- $\alpha$ -238 A alela (7% u kontrolnoj skupini).

## 4. REZULTATI

### 4.1. REZULTATI KLINIČKIH I PATOHISTOLOŠKIH ISTRAŽIVANJA

Među ispitanicima bilo je 163 (70,9%) muškaraca i 67 (29,1%) žena. Karakteristike ispitivane populacije obzirom na spol i dob prikazane su u Tablici 10.

**Tablica 10. Karakteristike ispitanika prema spolu i dobi**

<b>Ispitanici</b>	<b>Broj</b>	<b>Dob/godine*</b>
<b>Muški</b>	<b>163</b>	<b>65,1 ± 11,1 (46-85)</b>
<b>Ženski</b>	<b>67</b>	<b>65,4 ± 10,4 (31-92)</b>
<b>Ukupno</b>	<b>230</b>	<b>65,3 ± 10,5 (31-92)</b>

\*Srednja vrijednost ± standardna devijacija, te raspon godina.

Populacija ispitanih bolesnika s primarnim karcinomom pluća bila je sačinjena od osoba različitih zanimanja. U 26 (11,3%) ispitanika ustanovljena je dugotrajna izloženost poznatim kancerogenim tvarima, dok u 204 (88,7%) ispitanika nije bilo izloženosti do sada poznatim kancerogenima.

Pleuralni izljev bio je prisutan u 53 (23,0%) bolesnika, a u 177 (77,0%) ga nije bilo.

Prosječni indeks tjelesne mase bio je  $24,7 \pm 4,2$  (za normalno uhranjenu osobu vrijednosti su 18,5-25,0 kg/m<sup>2</sup>).

Obzirom na naviku pušenja ustanovljeno je 200 (87,0%) pušača (154 muškaraca i 46 žena) i 30 (13,0%) nepušača (9 muškaraca i 21 žena). Brinkmanov indeks (broj dnevno popušanih cigareta pomnožen s brojem godina pušenja) za sve ispitanike iznosio je  $884,4 \pm 660,4$ .

Histološki tipovi karcinoma pluća i klinički stadiji (lakši i teži) prikazani su u Tablici 11. U odnosu na spol bilo je u muškaraca 39 (23,9%) ispitanika s adenokarcinomom, 91 (55,8%) ispitanik sa skvamoznim karcinomom, 19 (11,7%) ispitanika s karcinomom malih stanica i 14 (8,6%) ispitanika s ostalim karcinomima pluća. U žena bilo je 28 (41,8%) ispitanica s adenokarcinomom, 22 (32,8%) ispitanica sa skvamoznim karcinomom, 10 (14,9%) ispitanica s karcinomom malih stanica i 7 (10,5) ispitanica s ostalim karcinomima pluća.

**Tablica 11. Histološki tipovi i klinički stadiji ispitanika**

<b>Tip tumora</b>	<b>Broj(%)</b>	<b>Klinički stadij</b>	<b>Broj(%)</b>
<b>Adenokarcinom</b>	<b>67(29,1)</b>	<b>I + II</b>	<b>45(19,6)</b>
<b>Skvamozni karcinom</b>	<b>113(49,1)</b>		
<b>Karcinom malih stanica</b>	<b>29(12,6)</b>	<b>III + IV</b>	<b>185(80,4)</b>
<b>Ostali karcinomi*</b>	<b>21(9,2)</b>		
<b>Ukupno</b>	<b>230(100,0)</b>		<b>230(100,0)</b>

\*U skupini „ostali karcinomi“ bila su tri karcinoma velikih stanica i 18 nedeterminiranih karcinoma pluća ne-malih stanica.



U ispitivanje su uključeni i maligni tumori drugih sijela, ustanovljeni i liječeni prije primarnog karcinoma pluća. U 28 (12,2%) bolesnika bili su ranije dijagnosticirani drugi primarni malignomi, dok je u 202 (87,8%) bolesnika karcinom pluća bio prvi ustanovljeni malignom. U 6 bolesnika ranije je ustanovljen rak grkljana, u 5 bolesnica rak vrata maternice, u tri bolesnika rak debelog crijeva, u tri bolesnice rak dojke, u tri bolesnika rak kože, u dva bolesnika rak mokraćnog mjehura, te po u jednog bolesnika rak prostate, bubrega, glave, ždrijela. Jedan je bolesnik ranije bolovao od malignog tumora mozga i grkljana, a drugi od raka grkljana i prostate.

U obiteljima bolesnika u njih 28 (12,2%) ustanovljen je ranije karcinom pluća i to u 26 slučajeva u prvih srodnika, a u dva u drugih srodnika. U 202 (87,8%) bolesnika nitko u obitelji nije ranije bolovao od raka pluća.

U 49 (21,3%) ispitanika otkriven je ranije maligni tumor drugog sijela u njihovih srodnika, dok u 181 (78,7%) ispitanika to nije bio slučaj. U prvom redu srodnosti bilo je 6 karcinoma debelog crijeva, 5 karcinoma maternice, četiri karcinoma grkljana, četiri karcinoma gušterače, po dva maligna tumora želuca, jetre, mokraćnog mjehura, kosti, dojke, jednjaka i mozga, te po jedan malignom pleure i prostate. Bilo je srodnika u prvom redu srodnosti s dva maligna tumora i to želuca i non-Hodgkin limfoma; grkljana i jednjaka; kože i jetre; prostate i debelog crijeva; želuca i krvi; dojke i jetre; želuca i mozga. U drugom redu srodnosti bila su dva karcinoma želuca i jedan maligni tumor glave. U tri srodnika bili su prisutni maligni tumori u prvom i drugom redu srodnosti i to rak maternice i grkljana; limfnih čvorova i kože; dojke i maternice. Jedan ispitanik imao je dva srodnika u prvom redu srodnosti s rakom grkljana i maternice, a u drugom redu srodnosti maligni tumor glave.

Srednje vrijeme preživljavanja, od otkrivanja bolesti do smrti, u mjesecima bilo je  $9,8 \pm 11,6$ .

U Tablici 12. prikazane su vrste terapijskih postupaka, koji su provedeni nakon što je ustanovljen karcinom pluća. Glavnina bolesnika nije podvrgnuta nikakvoj terapiji (61,7%), dok ih je manji broj (12,6%) bilo podvrgnuto radiokemoterapiji ili samo radioterapiji (10,0%). Ostale metode liječenja su uporabljene u gotovo zanemarivim postocima.

**Tablica 12. Provedeno liječenje u ispitanika**

<b>Vrsta liječenja</b>	<b>Broj(%)</b>
<b>Nije liječen</b>	<b>142(61,7)</b>
<b>Kirurško liječenje (OP)</b>	<b>9(3,9)</b>
<b>Radioterapija (RT)</b>	<b>23(10,0)</b>
<b>Kemoterapija (KT)</b>	<b>17(7,4)</b>
<b>OP + RT</b>	<b>1(0,5)</b>
<b>OP + KT</b>	<b>4(1,7)</b>
<b>RT + KT</b>	<b>29(12,6)</b>
<b>OP + KT + RT</b>	<b>5(2,2)</b>
<b>Ukupno</b>	<b>230(100,0)</b>

#### **4.2. HEMATOLOŠKI I BIOKEMIJSKI REZULTATI**

U Tablici 13. prikazani su neki hematološki i biokemijski laboratorijski nalazi koji su u vezi s nastankom i/ili progresijom malignog tumora.

**Tablica 13. Vrijednosti laboratorijskih parametara**

<b>Parametri</b>	<b>X ± SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Normal.</b>
SE (mm/3,6 ks)	55,5 ± 31,9	2,0	150,0	do 20
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	9,7 ± 4,5	1,7	34,0	4,0-9,0
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	7,0 ± 4,2	0,3	31,9	2,1-6,5
Limfociti (x10 <sup>9</sup> /L)	1,7 ± 0,9	0,0	4,9	1,2-3,4
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	4,3 ± 0,7	2,1	5,7	4,3-5,7
Hemoglobin (g/L)	125,1 ± 21,0	65	168	138-175
Trombociti(x10 <sup>9</sup> /L)	310,9 ± 133,0	5	935	158-424
CRP (mg/L)	45,5 ± 58,9	0,3	390,2	do 5,0
AF (U/L)	113,7 ± 88,0	20	796	60-142
CEA (µg/L)	26,3 ± 100,6	1,0	1270,0	0,1-5,0
LDH (U/L)	270,2 ± 297,7	72	3662	0-241
γ-GT (U/L)	71,0 ± 108,9	9	1035	11-55
ALT (U/L)	27,1 ± 27,1	4	218	12-48
AST (U/L)	27,9 ± 30,1	9	316	11-38
Glukoza (mmol/L)	6,5 ± 2,7	3,6	25,4	4,4-6,4
Proteini (g/L)	70,0 ± 6,1	49	86	60-78
Kalcij (mmol/L)	2,3 ± 0,2	1,8	3,8	2,1-2,5

X ± SD =srednja vrijednost i standardna devijacija.

Min = minimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Max = maksimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Normal. = normalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Utvrđene su povišene vrijednosti SE, leukocita, neutrofilnih granulocita, CRP, CEA, LDH,  $\gamma$ -GT, glukoze i smanjena vrijednost hemoglobina.

#### 4.3. UTJECAJ TNF- $\alpha$ -308 I TNF- $\alpha$ -238 POLIMORFIZAMA NA PREDISPOZICIJU I EKSPRESIJU BOLESTI

U Tablici 14. prikazana je frekvencija genotipova TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma obzirom na kliničkopatološka obilježja ispitanika, uključujući i stadije bolesti.

**Tablica 14. Frekvencija genotipova TNF- $\alpha$ -308 polimorfizma i kliničkopatološka obilježja ispitanika**

Karakteristike	Genotipovi			Ukupno (%)	p	OR (95% CI)
	AA(%)	GA(%)	GG(%)			
Kontrola	6(3)	53(23)	171(74)	230(100)		1,00
Karcinom pluća	9(4)	52(23)	169(73)	230(100)	0,83	0,96 (0,62-1,48)
<u>Tip tumora</u>						
AD	3(4)	12(18)	52(78)	67(29)	0,59	1,20 (0,60-2,41)
SQ	4(4)	30(27)	79(70)	113(49)	0,38	0,80 (0,47-1,36)
OK	1(5)	5(24)	15(71)	21(9)	0,77	0,86 (0,30-2,62)
NSCLC ukupno	8(4)	47(24)	146(73)	201(87)	0,69	1,09 (0,71-1,68)
SCLC	1(3)	5(17)	238(79)	29(13)	0,56	1,32 (0,48-3,83)
<u>Stadij tumora</u>						
I + II	2(4)	8(18)	35(78)	45(20)	0,47	
III + IV	7(4)	44(24)	134(72)	185(80)		

AD: adenokarcinom, SQ: skvamozni karcinom, OK: ostali karcinomi, NSCLC: karcinom ne-malih stanica, SCLC: karcinom malih stanica, OR: omjer izgleda [95% CI (interval pouzdanosti)]: GA plus AA u odnosu na GG, koji je označen s 1,00.

U Tablici 15. prikazana je frekvencija genotipova TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma s obzirom na kliničkopatološka obilježja ispitanika, uključujući i stadije bolesti.

**Tablica 15. Frekvencija genotipova TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma i kliničkopatološka obilježja ispitanika**

Karakteristike	Genotipovi			Ukupno (%)	p	OI (95% IP)
	AA(%)	GA(%)	GG(%)			
Kontrola	0(0)	16(7)	214(93)	230(100)		1,00
Karcinom pluća	0(0)	14(6)	216(94)	230(100)	0,71	1,15 (0,52-2,57)
<b>Tip tumora</b>						
AD	0(0)	5(7)	62(93)	67(29)	0,89	0,93 (0,30-3,0)
SQ	0(0)	5(4)	108(96)	113(49)	0,36	1,61 (0,54-5,19)
OK	0(0)	2(10)	19(90)	21(9)	0,45	0,71 (0,14-4,83)
NSCLC ukupno	0(0)	12(6)	189(94)	201(87)	0,94	0,97 (0,44-2,15)
SCLC	0(0)	2(7)	27(93)	29(13)	0,67	1,01 (0,20-6,73)
<b>Stadij tumora</b>						
I + II	0(0)	4(9)	41(91)	45(20)	0,28	
III + IV	0(0)	10(5)	175(95)	185(80)		

AD: adenokarcinom, SQ: skvamozni karcinom, OK: ostali karcinomi, NSCLC: karcinom ne-malih stanica, SCLC: karcinom malih stanica, OR: omjer izgleda [95% CI (interval pouzdanosti)]: GA plus AA u odnosu na GG, koji je označen s 1,00.

Distribucije genotipova su bile podudarne s očekivanim vrijednostima prema Hardy Weinberg-ovoj jednadžbi. Za TNF- $\alpha$ -308 u bolesnika p=0,46, a u kontrolnoj skupini p=0,78. Za TNF- $\alpha$ -238 u bolesnika p=0,85, a u kontrolnoj skupini p=0,86.

U Tablicama 16. i 17. prikazani su TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 genotipovi bolesnika u odnosu na klinički stadij karcinoma pluća ne-malih stanica i karcinoma pluća malih stanica. Utvrđeno je da je genotip TNF- $\alpha$ -238 GG statistički značajno češći

( $p=0,02$ ) u bolesnika s karcinomom pluća malih stanica u trećem i četvrtom stadiju tumora.

**Tablica 16. Genotipovi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u karcinoma pluća ne-malih stanica i klinički stadij tumora**

Genotipovi	TNF- $\alpha$ -308		TNF- $\alpha$ -238	
	Stadij		Stadij	
	I + II	III + IV	I + II	III + IV
GG (%)	31 (78,0)	134 (72,0)	38 (95,0)	151 (94,0)
GA (%)	7 (17,0)	44 (24,0)	2 (5,0)	10 (6,0)
AA (%)	2 (5,0)	7 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ukupno (%)	40 (17,8)	185 (82,2)	40 (19,9)	161 (80,1)
p	0,11		0,56	

**Tablica 17. Genotipovi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u karcinoma pluća malih stanica i klinički stadij tumora**

Genotipovi	TNF- $\alpha$ -308		TNF- $\alpha$ -238	
	Stadij		Stadij	
	I + II	III + IV	I + II	III + IV
GG (%)	4 (80,0)	19 (80,0)	3 (40,0)	24 (100,0)
GA (%)	1 (20,0)	4 (16,0)	2 (60,0)	0 (0,0)
AA (%)	0 (0,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ukupno (%)	5 (17,2)	24 (82,8)	5 (17,2)	24 (82,8)
p	0,73		0,02*	

\*  $p < 0,05$ ; genotip GG je statistički značajno češći u bolesnika s karcinomom pluća malih stanica u trećem i četvrtom stadiju tumora.

U Tablici 18 prikazana je frekvencija genotipova TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama u odnosu na spol ispitanika. Rezultati ne pokazuju značajnih razlika između spolova.

**Tablica 18. Frekvencija genotipova u odnosu na spol ispitanika**

Karakteristike	Genotipovi			Ukupno (%)	p
	GG (%)	GA (%)	AA (%)		
<u>TNF-<math>\alpha</math>-308</u>					
Muškarci	121 (74,2)	38 (23,3)	4 (2,5)	163 (70,9)	0,68
Žene	48 (71,6)	14 (20,9)	5 (7,5)	67 (29,1)	
<u>TNF-<math>\alpha</math>-238</u>					
Muškarci	152 (93,3)	11 (6,7)	/	163 (70,9)	0,38
Žene	64 (95,5)	3 (4,5)	/	67 (29,1)	

U Tablici 19. prikazane su vrijednosti indeksa tjelesne mase u odnosu na pojedine genotipove. Statistički značajna razlika među genotipovima nije nađena.

**Tablica 19. BMI i pojedini genotipovi**

Genotipovi	Broj	X $\pm$ SD	Min	Max	p
<u>TNF-<math>\alpha</math>-308</u>					
GG	169	24,7 $\pm$ 4,4	14,4	46,3	0,87
GA+AA	61	24,6 $\pm$ 3,8	16,9	37,3	
<u>TNF-<math>\alpha</math>-238</u>					
GG	216	24,6 $\pm$ 4,2	14,4	46,3	0,34
GA	14	25,7 $\pm$ 4,1	18,9	35,5	

X  $\pm$  SD =srednja vrijednost i standardna devijacija.

Min = minimalne vrijednosti BMI.

Max = maksimalne vrijednosti BMI.

U Tablici 20 prikazani su genotipovi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u bolesnika s jednim i više primarnih tumora. Dva bolesnika imala su tri primarna tumora, ali oni nisu prikazani kao zasebna skupina zbog malog broja uzorka, već su stavljeni zajedno s onim bolesnicima kojima je karcinom pluća bio drugi primarni tumor. Utvrđeno je da su svi ispitanici koji su imali više primarnih malignih tumora imali genotip GG TNF- $\alpha$ -238 ( $p=0,000$ ).

**Tablica 20. Genotipovi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u bolesnika s jednim i više primarnih tumora**

<u>TNF-<math>\alpha</math>-308</u>			
Genotipovi	Jedan tumor (%)	Više tumora (%)	p
GG (%)	151 (74,6)	18 (64,3)	0,24
GA (%)	42 (20,9)	10 (35,7)	
AA (%)	9 (4,5)	0 (0,0)	
<b>Ukupno (%)</b>	<b>202 (87,8)</b>	<b>28 (12,2)</b>	
<u>TNF-<math>\alpha</math>-238</u>			
Genotipovi	Jedan tumor (%)	Više tumora (%)	p
GG (%)	188 (93,0)	28 (100,0)	0,000
GA (%)	14 (7,0)	0 (0,0)	
<b>Ukupno (%)</b>	<b>202 (87,8)</b>	<b>28 (12,2)</b>	



Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji alela TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u skupinama bolesnika i kontrolnih ispitanika (Tablica 21).

**Tablica 21. Frekvencija alela TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama**

	TNF- $\alpha$ (308 GA) polimorfizam			TNF- $\alpha$ (238 GA) polimorfizam		
	Alel G (%)	Alel A (%)	p	Alel G (%)	Alel A (%)	p
<b>Kontrola (N=230)</b>	<b>85,9</b>	<b>14,1</b>		<b>96,5</b>	<b>3,5</b>	
<b>Ukupno (N=230)</b>	<b>84,8</b>	<b>15,2</b>	<b>0,64</b>	<b>97,0</b>	<b>3,0</b>	<b>0,71</b>
<b>NSCLC (N=201)</b>	<b>84,3</b>	<b>15,7</b>	<b>0,59</b>	<b>97,0</b>	<b>3,0</b>	<b>0,83</b>
<b>SCLC (N=29)</b>	<b>87,9</b>	<b>12,1</b>	<b>0,82</b>	<b>96,5</b>	<b>3,5</b>	<b>0,99</b>

NSCLC: karcinom ne-malih stanica.

SCLC: karcinom malih stanica.

#### **4.4. KORELACIJA IZMEĐU OSNOVNIH LABORATORIJSKIH NALAZA I GENOTIPOVA TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238**

U Tablici 22. prikazane su laboratorijske vrijednosti u 169 bolesnika koji imaju TNF- $\alpha$ -308 GG genotip.

**Tablica 22. Laboratorijski nalazi u 169 bolesnika  
s TNF- $\alpha$ -308 GG genotipom**

<b>Parametri</b>	<b>X <math>\pm</math> SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
SE (mm/3,6 ks)	55,6 $\pm$ 31,7	2,0	150,0
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	9,4 $\pm$ 3,7	1,7	23,9
Neutrofili ( $\times 10^9/L$ )	6,7 $\pm$ 3,3	0,3	21,6
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	1,8 $\pm$ 0,8	0,1	102,0
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	4,3 $\pm$ 0,7	0,1	4,6
Hemoglobin (g/L)	125,3 $\pm$ 20,5	66,0	168,0
Trombociti( $\times 10^9/L$ )	317,4 $\pm$ 128,1	23,0	747,0
CRP (mg/L)	43,8 $\pm$ 57,7	0,3	390,2
AF (U/L)	113,7 $\pm$ 93,9	20,0	796,0
CEA ( $\mu g/L$ )	21,3 $\pm$ 57,7	1,0	478,2
LDH (U/L)	266,9 $\pm$ 308,4	89,0	3662,0
$\gamma$ -GT (U/L)	69,5 $\pm$ 110,2	9,0	1035,0
ALT (U/L)	26,3 $\pm$ 22,9	7,0	139,0
AST (U/L)	27,4 $\pm$ 28,8	9,0	316,0
Glukoza (mmol/L)	6,3 $\pm$ 2,4	3,7	25,4
Proteini (g/L)	70,7 $\pm$ 5,5	51,0	86,0
Kalcij (mmol/L)	2,4 $\pm$ 0,2	1,8	3,6

X  $\pm$  SD = srednja vrijednost i standardna devijacija.

Min = minimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Max = maksimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

U Tablici 23. prikazane su laboratorijske vrijednosti u 61 bolesnika koji imaju TNF- $\alpha$ -308 GA i AA genotip. Utvrđeno je da su vrijednosti neutrofilnih granulocita statistički značajno više ( $p=0,049$ ) u bolesnika s genotipovima TNF- $\alpha$ -308 GA i AA u odnosu na GG genotip, dok su ukupni proteini bili značajno niži ( $p=0,003$ ).

**Tablica 23. Laboratorijski nalazi u 61 bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 GA i AA genotipom**

Parametri	X $\pm$ SD	Min	Max	p
SE (mm/3,6 ks)	55,1 $\pm$ 32,7	4,0	135,0	0,916
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	10,4 $\pm$ 6,2	1,8	34,0	0,123
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	7,9 $\pm$ 5,9	1,0	31,9	0,049*
Limfociti (x10 <sup>9</sup> /L)	1,5 $\pm$ 0,9	0,0	4,9	0,115
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	4,2 $\pm$ 0,7	2,1	5,7	0,545
Hemoglobin (g/L)	124,8 $\pm$ 22,4	65,0	164,0	0,893
Trombociti(x10 <sup>9</sup> /L)	293,1 $\pm$ 145,3	5,0	935,0	0,224
CRP (mg/L)	50,4 $\pm$ 62,4	0,8	273,7	0,454
AF (U/L)	113,7 $\pm$ 69,9	49,0	428,0	1,0
CEA ( $\mu$ g/L)	40,0 $\pm$ 170,3	1,0	1270,0	0,215
LDH (U/L)	279,3 $\pm$ 268,1	72,0	2088,0	0,781
$\gamma$ -GT (U/L)	75,1 $\pm$ 105,9	10,0	587,0	0,730
ALT (U/L)	29,2 $\pm$ 36,4	4,0	218,0	0,482
AST (U/L)	29,2 $\pm$ 33,7	9,0	239,0	0,707
Glukoza (mmol/L)	7,0 $\pm$ 3,3	3,6	21,9	0,064
Proteini (g/L)	67,0 $\pm$ 7,1	49,0	81,0	0,003*
Kalcij (mmol/L)	2,4 $\pm$ 0,3	2,0	3,8	0,921

X  $\pm$  SD = srednja vrijednost i standardna devijacija.

Min = minimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Max = maksimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

\* p < 0,05; označene vrijednosti su statistički značajno različite u bolesnika s genotipovima TNF- $\alpha$ -308 GA + AA u odnosu na GG genotip.

U Tablici 24. prikazane su laboratorijske vrijednosti u 216 bolesnika koji imaju TNF- $\alpha$ -238 GG genotip.

**Tablica 24. Laboratorijski nalazi u 216 bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 GG genotipom**

<b>Parametri</b>	<b>X <math>\pm</math> SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
SE (mm/3,6 ks)	56,1 $\pm$ 32,2	2,0	150,0
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	9,8 $\pm$ 4,5	1,7	34,0
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	7,1 $\pm$ 4,2	0,3	31,9
Limfociti (x10 <sup>9</sup> /L)	1,7 $\pm$ 0,9	0,0	4,9
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	4,3 $\pm$ 0,7	2,1	5,7
Hemoglobin (g/L)	124,6 $\pm$ 21,2	65,0	168,0
Trombociti(x10 <sup>9</sup> /L)	312,0 $\pm$ 136,1	5,0	935,0
CRP (mg/L)	46,4 $\pm$ 60,0	0,3	390,2
AF (U/L)	114,5 $\pm$ 90,3	20,0	796,0
CEA ( $\mu$ g/L)	27,4 $\pm$ 103,7	1,0	1270,0
LDH (U/L)	274,0 $\pm$ 306,4	72,0	3662,0
$\gamma$ -GT (U/L)	71,8 $\pm$ 110,8	9,0	1035,0
ALT (U/L)	27,3 $\pm$ 27,2	4,0	218,0
AST (U/L)	28,4 $\pm$ 30,9	9,0	316,0
Glukoza (mmol/L)	6,5 $\pm$ 2,8	3,6	25,4
Proteini (g/L)	67,0 $\pm$ 6,2	49,0	86,0
Kalcij (mmol/L)	2,4 $\pm$ 0,2	1,8	3,8

X  $\pm$  SD = srednja vrijednost i standardna devijacija.

Min = minimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Max = maksimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

U Tablici 25. prikazane su laboratorijske vrijednosti u 14 bolesnika koji imaju TNF- $\alpha$ -238 GA genotip. Utvrđeno je da, osim u slučaju leukocita kod kojih postoji trend prema nižim vrijednostima u osoba s GA genotipom ( $p=0,053$ ), nijedan drugi parametar se nije razlikovao u odnosu na bolesnike s GG genotipom.

**Tablica 25. Laboratorijski nalazi u 14 bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 GA genotipom**

Parametri	X $\pm$ SD	Min	Max	p
SE (mm/3,6 ks)	46,6 $\pm$ 26,7	10,0	94,0	0,285
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	7,4 $\pm$ 2,6	3,2	11,8	0,053
Neutrofili ( $\times 10^9/L$ )	5,2 $\pm$ 2,4	1,1	10,1,0	0,097
Limfociti ( $\times 10^9/L$ )	1,5 $\pm$ 0,5	0,7	2,4	0,311
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	4,5 $\pm$ 0,6	3,2	5,4	0,252
Hemoglobin (g/L)	132,8 $\pm$ 16,8	103,0	161,0	0,160
Trombociti( $\times 10^9/L$ )	294,9 $\pm$ 69,8	202,0	467,0	0,642
CRP (mg/L)	32,4 $\pm$ 36,9	1,2	137,1	0,391
AF (U/L)	101,2 $\pm$ 36,0	63,0	208,0	0,585
CEA ( $\mu g/L$ )	8,5 $\pm$ 9,0	1,0	31,9	0,495
LDH (U/L)	211,6 $\pm$ 70,0	102,0	340,0	0,448
$\gamma$ -GT (U/L)	58,0 $\pm$ 76,0	20,0	287,0	0,647
ALT (U/L)	23,0 $\pm$ 26,4	9,0	113,0	0,564
AST (U/L)	21,2 $\pm$ 13,3	10,0	64,0	0,392
Glukoza (mmol/L)	6,2 $\pm$ 1,3	4,5	9,6	0,746
Proteini (g/L)	69,4 $\pm$ 3,9	58,0	74,0	0,705
Kalcij (mmol/L)	2,3 $\pm$ 0,2	2,1	2,6	0,362

X  $\pm$  SD = srednja vrijednost i standardna devijacija.

Min = minimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

Max = maksimalne vrijednosti pojedinih parametara u krvi.

## 5. RASPRAVA

Karcinom pluća najčešći je oblik karcinoma u svijetu. Osim što je najčešći, rak pluća je i vodeći uzrok smrti među malignomima. Svake godine se u svijetu otkrije više od 1,2 milijuna novih slučajeva raka pluća, a približno toliko ih godišnje i umre. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije rak pluća uzrokuje 19,7% smrti uzrokovanih malignim bolestima. U Europi je 2006. godine od raka pluća umrlo 334 800 bolesnika, a u Hrvatskoj 2717 osoba. Unatoč tome što terapije za karcinom pluća postaju sve djelotvornije, 60% oboljelih od ove bolesti umre u roku od godinu dana nakon dijagnoze.

Rak pluća se značajno češće javlja nakon 65 godina života. Samo 3% slučajeva raka pluća je zabilježeno u osoba mlađih od 45 godina. Prosječna dob bolesnika u ovom istraživanju prilikom utvrđivanja raka pluća bila je 65,3 godine (65,1 godinu za muškarce i 65,4 godine za žene). U zapadnom svijetu zabilježen je pad broja karcinoma pluća u muškaraca, što je rezultat sustavnih programa protiv pušenja, no zabilježen je porast karcinoma pluća u žena (238). U našoj ispitivanoj skupini bilo je 70,9% muškaraca i 29,1% žena (omjer 2,4 : 1). Prije 20 godina je na našoj Klinici za pulmologiju omjer muškaraca i žena oboljelih od karcinoma pluća bio 6,6 : 1. Ovi omjeri pokazuju značajan porast raka pluća u žena što je u skladu s rezultatima u Hrvatskoj i Europi. U Hrvatskoj je 2004. godine omjer muškaraca i žena za rak pluća bio 3,6 : 1 (26). U ovom istraživanju uključeni su svi bolesnici koji su bolovali od karcinoma pluća, u promatranom vremenskom razdoblju, na Zavodu za pulmologiju, u Kliničkom bolničkom centru Rijeka. Korišten je, znači, slučajan odabir ispitanika, pa se dobiveni odnos između muškaraca i žena od 2,4 može smatrati vjerodostojnim. Taj je odnos sličan s

rezultatima iz zemalja Zapadne Europe, s najnižim odnosom između spolova (Danska), kao i SAD-a i Hrvatske (21, 25, 26). Jedan od razloga za takve rezultate jeste da su žene u odnosu na muškarce više predisponirane za karcinogeno djelovanje pušenja tj. u žena dolazi do značajno više mutacija u vezi s pušenjem nego u muškaraca (114).

Izloženost industrijskim kancerogenima je također važan čimbenik u nastajanju raka pluća. U naših ispitanika 11,3% je bilo izloženo dugi niz godina poznatim kancerogenima i to najčešće azbestu.

Pleuralni izljev nađen je u 23,0% bolesnika što govori da je bolest najčešće utvrđena u poodmakloj fazi (T<sub>4</sub>).

Prosječni indeks tjelesne mase bio je u granicama normale (24,7). Budući da je većina ispitanika (80,4%) bila u uznapređevaloj fazi maligne bolesti za očekivati je bilo da će bolesnici u prosjeku biti pothranjeni tj. da će imati nizak BMI. Tumorska kaheksija se javlja u polovice bolesnika s karcinomom, a klinički se manifestira s anoreksijom, gubitkom mišićne mase, gubitkom tjelesne težine, brzim osjećajem sitosti, umorom i oslabljenim imunološkim odgovorom (163). Patofiziologija kaheksije je povezana s kompleksnim mehanizmima i ne uključuje samo nedostatak kalorija. Tu sudjeluju cirkulirajući katabolički čimbenici, koji potječu iz tumora ili ih stvara sam domaćin, a najčešći su TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  i inhibitorški čimbenik leukemije (engl. leukemia inhibitory factor, LIF). Vidljivo je da su tu uključeni brojni mehanizmi o kojima ovisi da li će se razviti tumorska kaheksija. U naših ispitanika ona nije bila prisutna u onoj fazi kada su oni uključeni u istraživanje.

Rak pluća u više od 80% slučajeva uzrokuje duhanski dim, no u 20% oboljelih žena se javlja unatoč tome što nisu nikada pušile (1). U našem



istraživanju od svih oboljelih, 9,1% žena su bile nepušači, a samo 3,9% muškaraca su bili nepušači. Među pušačima bilo je 23,0% žena i 77,0% muškaraca.

Od 230 ispitanika 87% su bili pušači, što je u skladu s podacima iz literature (3). Brinkmanov indeks bio je 884,4, dok je i istraživanju Shiha i suradnika bio 605,2. Ovaj podatak može ići u prilog objašnjenju što je u našoj skupini bilo više skvamoznog karcinoma nego adenokarcinoma, suprotno nego u istraživanju kineske populacije. Uspoređujući naše rezultate s onim od Seifarta i suradnika vidi se da je u našem istraživanju bio prisutan karcinom malih stanica u 12,6% bolesnika, a u njemačkoj populaciji u 16,5% ispitanika, što ne predstavlja statistički značajnu razliku. Bolesnici sa skvamoznim karcinomom pluća i karcinomom malih stanica imaju veći Brinkmanov indeks nego bolesnici s adenokarcinomom, tj. ta dva tipa karcinoma pluća su više povezani s pušenjem i njihovo javljanje korelira s brojem dnevno popušanih cigareta i godinama pušenja (114).

Poznato je da žene pušači ranije oboljevaju od raka pluća nego muškarci koji su pušači. U žena pušača, koje su oboljele od raka pluća, ustanovljena je viša razina DNA *adduct-a* (engl. DNA adducts) (239). To govori da su žene pušači ugroženije jer imaju višu razinu DNA *adduct-a*. To su najviše proučavani biomarkeri u tumorima, a nastaju vezanjem nekog ksenobiotika za molekulu DNA, a koji u sljedećem koraku mogu dovesti do nastanka mutacije. Njihovim mjerenjem u ciljnom organu (plućno tkivo ili stanice BAL-a u karcinomu pluća) možemo izravno mjeriti biološki efektivnu dozu. DNA *adduct* je povišen jer je u žena CYP1A1 ekspresija gena značajno viša. Citokrom P4501A1 (CYP1A1) gen kodira najvažniji enzim u metabolizmu policikličkih aromatskih hidrokarbonata (engl.

polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH), čija aktivacija dovodi do stvaranja veće količine reaktivnog DNA *adduct-a*.

Oštećenja respiratornog epitela zbog pušenja igraju vrlo važnu ulogu u postepenom procesu karcinogeneze. Genetički čimbenici također sudjeluju u tom procesu, što može objasniti zašto u istraživanju Miller-a i suradnika čak oko 18% pušača oboli od raka pluća (38). Neoplastička transformacija, tumorska progresija i metastaze su često povezane sa nizom stečenih ili konstitutivnih genetskih promjena u stanicama tumorskog tkiva. Važni aspekti ispitivanja tih promjena su rana dijagnoza, bolje praćenje bolesnika i uspješnije liječenje određenih tumora.

Svoje mjesto ovdje ima i molekularna epidemiologija, naročito u ranom otkrivanju i preživljavanju bolesnika s rakom pluća, obzirom na male pomake u probiru i liječenju te bolesti (240). Prednost molekularne epidemiologije pred „tradicionalnom“ epidemiologijom je slijedeća: pri proučavanju povezanosti pušenja i karcinoma pluća, tradicionalna epidemiologija je ograničena na nepouzdanu procjenu broja popušanih cigareta i dužine pušenja. Takav pristup ima brojne nedostatke, posebno u slučaju pasivnog pušenja. Međutim, ako molekularnim tehnikama izmjerimo serumsku razinu biomarkera kotinina, dobivamo precizne podatke jer zapravo mjerimo razinu biomarkera čija se koncentracija izravno mijenja (raste) s brojem popušanih cigareta (241). Tako možemo utvrditi koji pušači imaju najveći rizik za rak pluća. Od važnosti su ovdje i mehanizmi popravka DNA. Genetske promjene koje su povezane s popravkom DNA ili apoptozom mogu utjecati na efekt kemoterapije ili radioterapije u NSCLC (203).

Svi karcinomi pluća su subtipovi bronhogennog karcinoma tj. tumora koji se razvio iz epitelnog tkiva. Četiri najčešća subtipa karcinoma pluća jesu skvamozni

karcinom, adenokarcinom, karcinom pluća malih stanica i nediferencirani karcinomi pluća ne-malih stanica (114). Oni čine oko 90% svih histoloških vrsta karcinoma pluća. U našim rezultatima bilo je 67 (29,1%) adenokarcinoma, 113 (49,1%) skvamoznih karcinoma, 29 (12,6%) karcinoma malih stanica i 21 (9,2%) ostalih karcinoma. Slična zastupljenost pojedinih histoloških tipova karcinoma pluća bila je u našoj ustanovi i prije 8 godina (36). U SAD zadnjih dvadesetak godina incidencija karcinoma pluća ima tendenciju pada u odnosu na druge maligne tumore, raste učestalost adenokarcinoma, a pada broj skvamoznih karcinoma pluća, što se razlikuje u odnosu na naše rezultate (110). Uspoređujući rezultate istraživanja Wahbah-a i suradnika i našeg istraživanja ustanovili smo da kod nas ima više skvamoznih karcinoma u muškaraca (55,8%) i žena (32,8%) nego adenokarcinoma u muškaraca (23,9%) i žena (41,8%). U američkoj populaciji bilo je 31,6% skvamoznih karcinoma u muškaraca i 25,4% u žena, dok je adenokarcinoma bilo 36,8% u muškaraca i 46,5% u žena. Incidencija karcinoma pluća malih stanica u našem istraživanju bila je 11,7% u muškaraca i 14,9% u žena, dok je u podacima iz SAD bilo 13,7% muškaraca i 18,3% žena s karcinomom malih stanica. Veća incidencija skvamoznog karcinoma pluća u našem istraživanju može se protumačiti rezultatima poduzetih mjera protiv pušenja u SAD, budući da je skvamozni karcinom pluća značajno povezan s pušenjem (114). Istu tezu ne možemo primijeniti na karcinom pluća malih stanica, koji je u američkoj populaciji češći nego u našoj ispitivanoj skupini, a također je značajno češći u pušača. Adenokarcinomi u žena pokazuju slične rezultate u našoj i u američkoj skupini što potvrđuje spoznaju da adenokarcinomi pluća u žena su u porastu u cijelom svijetu.

Rana dijagnostika karcinoma pluća je veliki problem zbog kasnog javljanja simptoma (91). To je potvrđeno i u našem istraživanju gdje je prvi i drugi stadij bolesti imalo 45 bolesnika, a treći i četvrti 185 bolesnika. Samo 19,6% bolesnika otkriveno je u ranim stupnjevima karcinoma pluća, u kojih je liječenje učinkovitije i prognoza bolesti bolja.

Od 230 ispitanika u njih 28 (12,2%) je ranije ustanovljen primarni maligni tumor druge lokalizacije. Rak grkljana bio je prisutan u 8 bolesnika, rak mokraćnog mjehura u dva bolesnika, rak vrata maternice u 5 bolesnica, rak ždrijela u jednog bolesnika. Svi navedeni karcinomi češće se javljaju u pušača (219, 242, 243). Promjene na DNA specifične za djelovanje duhanskog dima (DNA *adduct*) pronađene su i u stanicama cervikalnog epitela. Na taj način se potvrdila sumnja da pušenje igra ulogu u razvoju karcinoma vrata maternice (243). Osim pušenja, kao zajedničkog čimbenika rizika za navedene tumore i rak pluća, drugi karcinom u istog bolesnika može biti posljedica radioterapije i kemoterapije, koja se provodila u liječenju prvog malignog tumora (244). Dolazi do imunodeficientnog stanja organizma što pogoduje nastanku drugog tumora. Ostali naši ispitanici imali su ranije karcinom debelog crijeva, dojke, kože, prostate, bubrega, glave i maligni tumor mozga, koji su liječeni radioterapijom i/ili kemoterapijom. U dva bolesnika karcinom pluća je bio treći maligni tumor. Jedan ispitanik bolovao je ranije od tumora mozga i karcinoma grkljana, a drugi od karcinoma grkljana i prostate. U oba bolesnika bio je prisutan karcinom grkljana, koji je najčešći karcinom koji se pojavljuje zajedno s primarnim karcinomom pluća. U ispitivanju multiplih primarnih karcinoma u poljskoj populaciji utvrđeno je da se u 12,5 % karcinom pluća pojavljuje kao konkomitantni karcinom, dok je u našem istraživanju taj postotak bio 12,2% (245). U istom ispitivanju karcinom grkljana bio je u 35,5% zastupljen kao

drugi primarni karcinom, a kombinacija karcinoma pluća i grkljana bila je prisutna u 21,1% ispitanika. Prilikom otkrivanja drugog primarnog karcinoma u 80,3% radilo se o pušačima. Ovi rezultati govore o pušenju kao glavnom razlogu za javljanje drugog ili trećeg primarnog tumora, koji se češće javljaju nekoliko godina od utvrđivanja prvog tumora, a znatno rjeđe istovremeno (245). Osim pušenja smatra se da ovdje svoju ulogu ima i genetska predispozicija za malignu bolest.

Chaturvedi i suradnici su utvrdili na uzorku od preko 100 000 bolesnica s rakom vrata maternice da je kumulativni rizik od drugog primarnog tumora 22,2% u žena u kojih je rak vrata maternice ustanovljen u dobi prije 50 godina, a 16,4% u žena koje su imale više od 50 godina kada je utvrđen rak vrata maternice (244). Naši rezultati su u skladu s navedenima, iako točnija evaluacija nije moguća zbog nedostatka podataka potrebnih za ocjenu rizika od razvoja drugog tumora.

Obzirom na familijarnu pojavnost bolesti 12,2% bolesnika imalo je srodnika s rakom pluća, a 21,3% srodnika s karcinomom drugog sijela. U američkoj populaciji familijarna pojavnost bolesti u istraživanju s više tisuća ispitanika bila je 7,1% za karcinom pluća (246). U tom istraživanju utvrđeno je da je familijarna prisutnost karcinoma izraženija u starijih bolesnika. Prisutnost maligne bolesti u familiji je poticaj za raniji i ustrajni probir bolesnika.

Preživljavanje bolesnika s rakom pluća ovisi o stadiju bolesti kod utvrđivanja dijagnoze, dobi, spolu i histološkom nalazu. Jednogodišnje preživljavanje u Europi za muškarce je 31%, dok je za žene 29%. Petogodišnje preživljavanje u Europi za muškarce je 10%, a za žene 11%. Mlađi bolesnici imaju bolju prognozu u odnosu na starije. Oni u kojih je rak pluća ustanovljen prije 50-te godine života imaju 5-godišnje preživljavanje 12%, a oni između 60 i 69 godina

6%. Srednje vrijeme preživljavanja u našoj istraživanoj skupini bilo je 9,8 mjeseci. Ono se značajno ne razlikuje od vremena preživljavanja u Europi i SAD (247).

Terapijski postupci u naših ispitanika provedeni su prema uobičajenim protokolima za liječenje pojedinih stadija i tipova karcinoma pluća (142). U 142 (61,7%) bolesnika nije provedeno nikakvo liječenje zbog općeg lošeg stanja, što govori u prilog da se karcinom pluća najčešće otkriva u uznapredovalu stadiju bolesti. Rezultati kirurškog liječenja, kemoterapije, radioterapije ili kombinacije navedenih vrsta liječenja nisu statistički obrađeni, obzirom na preživljavanje i kvalitetu života, zbog malog broja ispitanika u pojedinim skupinama. Od provedenih vrsta liječenja najčešće je korištena kombinacija radioterapije i kemoterapije, u 29 (12,6%) bolesnika, i radioterapija (radikalna ili palijativna) u 23 (10,0%) bolesnika. U samo 9 (3,9%) bolesnika provedeno je kirurško liječenje, a u 5 (2,2%) bolesnika kirurško liječenje zajedno s kemoterapijom i radioterapijom. Ti podaci govore da se karcinom pluća u operabilnoj fazi otkriva rijetko što potvrđuju i podaci o stadiju karcinoma u vrijeme otkrivanja bolesti (19,6% u prvom i drugom stadiju) u naših ispitanika.

Agresivnost karcinoma pluća uzrokovana je u prvom redu razvojem metastaza. Karcinom pluća metastazira u regionalne limfne čvorove, jetru, nadbubrežne žlijezde, kontralateralno pluće, mozak, kosti. Lokalizacija metastaza ovisi o karakteristikama stanica karcinoma i o mikrouvjetima pojedinog organa. Iako se pušenje smatra najvažnijim uzrokom raka pluća, jer 80-90% bolesnika su pušači, biologija karcinoma pluća je kompleksna i još slabo poznata, a različiti biomarkeri su uključeni u progresiju ovog malignog tumora. Kemokini su važna familija proteina, koja je uključena u tumorigenezu i razvoj metastaza karcinoma pluća u određeni organ (248).

Ispitani su uobičajeni laboratorijski nalazi koji se koriste u kliničkom radu u dijagnostici i liječenju karcinoma pluća. Utvrđeno je da su povišene vrijednosti SE, leukocita, neutrofilnih granulocita i CRP, što su nespecifični znakovi prisustva tumora, ali mogu biti i pokazatelji sekundarne upale, koja je često prisutna u karcinomima pluća. Povišena je vrijednost CEA, koji je nespecifičan tumorski marker, često prisutan u karcinomu pluća, a vrijednosti mu rastu sa stupnjem uznapređovalosti tumora. Povišena je i vrijednost LDH, koja je nespecifični znak prisutnosti malignih tumora uopće, a izrazito raste kod razvoja metastaza (249). Ovi i drugi tumorski markeri, osim u otkrivanju tumora pluća, imaju svoju važnost u praćenju odgovora na terapiju, u ranom otkrivanju reaktivacije tumora, u novim terapijskim shemama, kao i u sekundarnoj prevenciji.

Glukoza u krvi bila je tek nešto iznad gornje granice referentnih vrijednosti (6,5 mmol/L), što nije u skladu s literaturnim podacima, gdje je vrijednost glukoze u krvi u uznapređovalih tumora pluća s metastazama često snižena (250). To se dešava zbog povećanog stvaranja i lučenja od strane tumora inzulinu sličnog čimbenika rasta I i II (251). Ektopično lučenje hormona koje dovodi do hipoglikemije u sklopu je paraneoplastičkog sindroma.

Srednja vrijednost eritrocita je na donjoj granici referentnih vrijednosti, a snižena je srednja vrijednost hemoglobina, što govori u prilog prisutne anemije u ispitivanoj skupini. Anemija se češće javlja u uznapređovalim stadijima maligne bolesti. Mehanizmi odgovorni za anemiju su, u gotovo svim slučajevima, izvan tumora i mogu imati nekoliko uzroka. Povećana destrukcija eritrocita može biti posljedica hipersplenizma, mikroangiopatičke hemolize i autoprotutijela, koja se posebice nalaze u slučajevima limfoproliferacijskih malignoma. Smanjeno stvaranje eritrocita može biti posljedica nedostatka željeza, povezanog s

krvarenjem, nedostatka vitamina B<sub>12</sub> ili folata, ispražnjenja eritrona zbog nakupljanja tumora u koštanoj moždini, sekundarne toksičnosti zbog kemoterapije ili radioterapije, te u kroničnoj anemiji upalne bolesti. Anemija kronične bolesti nastaje zbog poremećaja distribucije željeza koje je nisko u serumu, a povećano u depoima (feritin). Željezo se vezuje u monocite i makrofage. IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  oslobođeni u upalnom odgovoru potiskuju stvaranje eritropoetina što doprinosi nastanku anemije (252).

Različite promjene DNA mogu nastati zbog utjecaja okolišnih ili endogenih karcinogena. Mnoge od ovih promjena, ako se ne isprave, mogu dovesti do genetske nestabilnosti, mutageneze i stanične smrti. DNA popravci su važni za održavanje integriteta DNA i prevenciju karcinogeneze. Ispitivanja karcinoma pluća su usmjerena na otkrivanje utjecaja SNP-a u pojedinim genima, a od posebne je važnosti DNA popravak gena. Genetske promjene mijenjaju mogućnost DNA popravka i pretpostavlja se da je to povezano s rizikom nastanka karcinoma pluća. To potvrđuju mnoga istraživanja koja ukazuju da je povezanost između rizika od karcinoma pluća i SNP-a vrlo jako izražena (199). Otkrivanje novih polimorfizama i usavršavanje genotipizacije omogućiti će bolju analizu različitih gena kroz mnoge DNA popravke.

TNF-  $\alpha$  je proinflamatorni citokin koji ima važnu ulogu u patogenezi upalnih, autoimunih i malignih bolesti (229). Iako je njegovo osnovno djelovanje protutumorsko, zapaženo je da on djeluje i tumorigenično *in vitro* i *in vivo* (223). TNF sudjeluje u karcinogenezi potičući proliferaciju, invaziju i metastaziranje tumorskih stanica (232). Ispitivani su polimorfizmi u TNF- $\alpha$  promotorskoj regiji da bi se utvrdili imunološki odgovori u više vrsta karcinoma. Do sada su često ispitivani polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u mnogo vrsta karcinoma, različitih



sijela. Rezultati su sasvim kontradiktorni. Razlozi za to su što su ispitivane populacijske skupine iz raznih dijelova svijeta, ekspresija TNF- $\alpha$  je regulirana na razini transkripcije, a različiti polimorfizmi unutar TNF- $\alpha$  promotorske regije su povezani s razinom stvorenog TNF- $\alpha$ , što doprinosi različitom tijeku bolesti (232). Koristeći PCR-RFLP tehniku ispitali smo polimorfizme TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u bolesnika s primarnim karcinomom pluća i u kontrolnoj skupini zdravih, nesrodnih ispitanika, uparenih po dobi i spolu. Namjera nam je bila utvrditi da li polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 utječu na podložnost razvoja karcinoma pluća ili imaju protektivnu ulogu. Utvrdili smo i kakav je odnos navedenih polimorfizama TNF- $\alpha$  i stupnja težine bolesti. Posebno su ispitani ovi polimorfizmi za svaki tip NSCLC (adenokarcinom, skvamozni karcinom, ostali karcinomi), kao i za karcinom pluća malih stanica. Ovakvo istraživanje je po prvi put provedeno u našoj populaciji i po prvi put u kavkaskoj populaciji. Također, to je prvo istraživanje polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 koje uključuje sve tipove karcinoma pluća, uključujući i mikrocelularni karcinom. Rezultati Shih-a i suradnika, dobiveni u kineskoj populaciji, su prvi i jedini do sada objavljeni o polimorfizmima TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u NSCLC, te je bilo od znanstvenog interesa utvrditi kakve će se genetske promjene naći u našoj populaciji ispitivanoj pod istim uvjetima (19). U ispitivanoj kineskoj skupini utvrđeno je da polimorfizmi TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 su značajno povezani s pojavnošću i težinom karcinoma pluća u odnosu na kontrolnu skupinu. Također je utvrđeno da -308 A alel ima promotivni utjecaj za nastanak i progresiju raka pluća, a da -238 A alel ima protektivnu funkciju prema karcinomu pluća u ispitanoj populaciji Kineza. Prethodno je provedeno ispitivanje u njemačkoj populaciji s primarnim karcinomom pluća, ali samo za polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 u

odnosu na podložnost za karcinom pluća, ali ne i za težinu tj. stadij bolesti kada se karcinom pluća ustanovio (18).

Naši rezultati ne pokazuju statistički značajne razlike između kontrolne skupine i ispitanika s karcinomom pluća u odnosu na genotipove AA, GA i GG TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238. Također, nismo potvrdili povezanost između polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 i svih histoloških tipova i stadija karcinoma pluća, pa zbog toga ne možemo reći da ovi polimorfizmi utječu na podložnost i težinu maligne bolesti obzirom na sve ispitanike. Međutim, kada smo bolesnike podijelili na NSCLC i SCLC i uzeli u obzir stadije karcinoma pluća, prilikom uključivanja ispitanika u ovo istraživanje, utvrdili smo da je TNF- $\alpha$ -238 G alel statistički značajno češći ( $p=0,02$ ) u težim oblicima bolesti tj. u uznapredovalim stadijima (treći i četvrti) SCLC, kada već postoje metastatske promjene u udaljenim organima. Napominjemo da je ova statistička analiza rađena na 29 ispitanika koji su bolovali od karcinoma pluća malih stanica, što predstavlja mali uzorak. Isto tako je važno istaknuti da se u kliničkom radu karcinom pluća malih stanica dijeli na skupinu gdje je tumor prisutan kao ograničena ili lokalna bolest (tumor je prisutan u jednom hemitoraksu, uključujući i supraklavikularne limfne čvorove iste strane) i skupinu gdje postoji proširena bolest (bilo koji stadij bolesti koji je uznapredovao u odnosu na lokalnu bolest). Ova je podjela nezavisni prognostički pokazatelj i više se koristi u kliničkom radu nego TNM stupnjevanje. TNM klasifikacija ima prednost u kliničkom praćenju bolesti, u praćenju rezultata liječenja, te je u tom smislu od koristi za karcinom pluća malih stanica isto kao za NSCLC. Uzimajući u obzir ova ograničenja (mali broj ispitanika i uobičajenost kliničke podjele karcinoma pluća malih stanica na ograničenu i proširenu malignu bolest), možemo zaključiti da je G alel TNF- $\alpha$ -238 češći u uznapredovalim

stadijima karcinoma pluća malih stanica i da doprinosi lošijoj kliničkoj slici bolesti. To je sukladno rezultatima istraživanja karcinoma dojke, gdje je utvrđeno da je -238 G alel povezan s većom produkcijom TNF- $\alpha$  (220). Iz ovih rezultata možemo zaključiti da TNF- $\alpha$  utječe na karcinogenezu time što ju ubrzava i dovodi do težih oblika malignih tumora, kako primarnih, tako i metastaza. Istraživanja u bolesnika s multiplom sklerozom pokazuju da je -238 G alel češći kod težih neuroloških oštećenja, a također je isti alel učestaliji u agresivnijem obliku reumatoidnog artritisa (220). Ove razlike u rezultatima o ulozi TNF- $\alpha$  polimorfizama mogu biti zbog nejednakosti u etiologiji karcinoma pluća u bolesnika različitog etničkog podrijetla.

Naši rezultati su jednaki onima u njemačkoj populaciji, koji ne pokazuju statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i bolesnika s karcinomom pluća (NSCLC i SCLC) u odnosu na različite genotipove TNF- $\alpha$ -308 (18). Seifert i suradnici su u svom istraživanju ukazivali na povezanost između IL-10-1082-G alela i SCLC. Iako mehanizmi ove korelacije nisu još posve određeni, zna se da upalni procesi mogu dovesti do lokalnih respiratornih promjena, koje mogu rezultirati povećanim rizikom za rak pluća. Najviše rezultata u tom smislu je dobiveno ispitivanjem kronične opstruktivne plućne bolesti. Nije utvrđena genska podudarnost KOPB-a i karcinoma pluća (38). Osim nedostatka alfa-1 antiproteaze, drugi genetski uzroci KOPB-a nisu poznati.

Ispitivana je i povezanost polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 s pojavnošću bronhopulmonalne displazije (engl. bronchopulmonary dysplasia, BPD). BPD je najčešća kronična bolest pluća u novorođenčadi (253). Obično se javlja u nedonoščadi, počinje još intrauterino, a onda progredira poslije poroda i rezultira zaostajanjem u razvoju pluća i alveolarnoj hipoplaziji. Zapaženo je da se

češće javlja u nedonoščadi koja su bila na strojnoj ventilaciji ili su liječena prolongiranom terapijom kisika (232). Radi se o bolesti u kojoj interferiraju genetički i vanjski čimbenici. Genetske promjene uključene u patogenezu BPD su u fazi istraživanja. Razvila se hipoteza da polimorfizam TNF- $\alpha$  povećava rizik nastanka BPD. To nije dokazano u istraživanju polimorfizama TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u nedonoščadi s BPD-om, niti je utvrđena povezanost tih polimorfizama s težinom bolesti (254). Kazzi i suradnici su utvrdili da A alel TNF- $\alpha$ -238 smanjuje pojavnost i težinu kliničke slike BPD (255).

U istraživanju polimorfizma IL-10 gena na poziciji 1082-A alela u agresivnom periodontitisu u iranskoj populaciji nije nađena razlika u frekvenciji alela u bolesnika i zdravih osoba (256). Istraživanjem polimorfizma IL-10 u karcinomu pluća u Kineza nađena je značajna povezanost tog polimorfizma i NSCLC što govori u prilog sudjelovanja citokina u karcinogenezi raka pluća (257).

Ispitivanja polimorfizma TNF- $\alpha$ -308 i/ili TNF- $\alpha$ -238 u ostalim karcinomima dala su vrlo različite rezultate (Tablica 5.). Mogući razlog za to je različita etnička pripadnost bolesnika. Genotipska i alelska frekvencija TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama u različitim populacijama izrazito varira u odnosu na etničku skupinu (221). Drugi mogući razlog za gore navedene rezultate su razlike u načinu provođenja istraživanja i analizi podataka, ili tip I tj. tip II statističke greške. Iako naše istraživanje ima 80% snagu da otkrije dvostruki porast frekvencije TNF- $\alpha$ -238 A alela, broj bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 GA genotipom je vrlo mali (N=14) da bismo mogli donositi konačne zaključke o utjecaju TNF- $\alpha$ -238 polimorfizma na analizu podgrupe raka pluća. Potrebna su daljnja istraživanja u većim skupinama bolesnika iz populacija različitih genetičkih struktura, da bi se dokazala potencijalna uloga TNF- $\alpha$  polimorfizma u odnosu na podložnost karcinoma pluća.

Ovdje ističemo da i drugi geni imaju utjecaja na razvoj karcinoma pluća, kao IL-10, IL-1, IL-6, IL-8, IL-4, TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , transformirajući čimbenik rasta-beta (engl. transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ ) i drugi (18, 19, 219, 227). Isto tako interindividualne razlike u razini TNF- $\alpha$  doprinose polimorfizmima unutar TNF- $\alpha$  promotorske regije (19).

Shih i suradnici (19) su u svom istraživanju utvrdili da postoji statistički značajna razlika za TNF- $\alpha$ -308 GA distribucije genotipa između kontrolne skupine i NSCLC ( $p < 0,0001$ ). Analizom logističke regresije utvrđen je veći OR u ispitanika s TNF- $\alpha$ -308 AA i GA genotipovima u odnosu na genotip GG za sve NSCLC (OR 3,75, 95% CI 2,38-5,92,  $p < 0,0001$ ), adenokarcinom (OR 4,38, 95% CI 2,62-7,32,  $p < 0,0001$ ) i skvamozni karcinom pluća (OR 6,50, 95% CI 2,89-14,7,  $p < 0,0001$ ). Bolesnici s jednim ili dva TNF-308 A alela imali su karcinom pluća u uznapredovaloj fazi ( $p = 0,017$ ). Za TNF- $\alpha$ -238 GA polimorfizam postoji statistički značajna razlika TNF- $\alpha$ -u distribuciji genotipa između zdrave populacije i bolesnika s NSCLC ( $p < 0,0001$ ). Analizom logističke regresije utvrđeno je da niži OR imaju ispitanici s NSCLC (OR 0,26, 95% CI 0,13-0,50,  $p < 0,0001$ ), adenokarcinomom (OR 0,20, 95% CI 0,08-0,49,  $p < 0,0001$ ) i skvamoznim karcinomom pluća (OR 0,35, 95% CI 0,15-0,82,  $p < 0,0001$ ), koji imaju TNF- $\alpha$ -238 AA i GA genotipove, u odnosu na one s GG genotipom, koji je označen s 1,00. Bolesnici s jednim ili dva TNF- $\alpha$ -238 A alela imali su karcinom pluća u ranijem stadiju ( $p = 0,001$ ).

U našem istraživanju nismo utvrdili da postoji statistički značajna razlika u distribuciji TNF- $\alpha$ -308 genotipova između kontrolne skupine i svih tipova karcinoma pluća ( $p = 0,83$ ). Analizom logističke regresije nije utvrđen veći OR u ispitanicima s TNF- $\alpha$ -308 AA i GA genotipovima u odnosu na genotip GG za sve tipove karcinoma pluća (OR 0,96, 95% CI 0,62-1,48), adenokarcinom (OR 1,20,

95% CI 0,60-2,41), skvamozni karcinom pluća (OR 0,80, 95% CI 0,47-1,36), ostale karcinome (OR 0,86, 95% CI 0,30-2,62), NSCLC (OR 1,09, 95% CI 0,71-1,68) i SCLC (OR 1,32, 96% CI 0,48-3,83). Bolesnici s jednim ili dva TNF-308 A alela nisu imali karcinom pluća u uznapređenoj fazi ( $p=0,47$ ). Za TNF- $\alpha$ -238 GA polimorfizam ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između zdrave populacije i bolesnika s karcinomom pluća ( $p=0,71$ ). Analizom logističke regresije nije utvrđeno da niži OR imaju ispitanici sa svim tipovima karcinoma pluća (OR 1,15, 95% CI 0,52-2,57), adenokarcinomom (OR 0,93, 95% CI 0,30-3,0), skvamoznim karcinomom pluća (OR 1,61, 95% CI 0,54-5,19), ostalim karcinomima (OR 0,71, 95% CI 0,14-4,83), NSCLC (OR 0,97, 95% CI 0,44-2,15) i SCLC (OR 1,01, 95% CI 0,20-6,73), koji imaju TNF- $\alpha$ -238 AA i GA genotipove, u odnosu na one s GG genotipom, koji je označen s 1,00. Bolesnici s jednim ili dva TNF- $\alpha$ -238 A alela nisu imali karcinom pluća u ranijem stadiju ( $p=0,28$ ).

Analizirali smo i genotipove bolesnika kojima je primarni karcinom pluća bio već drugi ili treći primarni maligni tumor. Treći maligni tumor imali su samo dva bolesnika te od toga nismo mogli sačiniti posebnu skupinu, već su obrađeni zajedno s onima kojima je ispitivani karcinom pluća bio drugi maligni tumor. Tom analizom je ustanovljeno da je homozigotni genotip GG TNF- $\alpha$ -238 bio prisutan u svih 28 bolesnika u kojima karcinom pluća nije bio prvi primarni maligni tumor. To je statistički značajno ( $p=0,000$ ) u odnosu na skupinu od 202 bolesnika s prvim primarnim karcinomom pluća gdje je 188 (93,0%) imalo GG genotip TNF- $\alpha$ -238, a 14 (7,0%) bolesnika imalo je GA genotip TNF- $\alpha$ -238. Za polimorfizam TNF- $\alpha$ -308 nije utvrđena statistički značajna razlika u genotipovima između bolesnika s prvim i drugim ili trećim primarnim malignim tumorom ( $p=0,24$ ). Uzimajući u obzir da je samo 28 (12,2%) bolesnika imalo ranije jedan ili dva primarna maligna tumora,

smatramo ipak važnim istaknuti statističku značajnost GG TNF- $\alpha$ -238, koja govori da je G alel TNF- $\alpha$ -238 predisponirajući za malignu bolest, a da A alel TNF- $\alpha$ -238 ima protektivnu ulogu u nastanku i razvoju malignog tumora pluća. Ovi rezultati podupiru pretpostavku da osim vanjskih čimbenika (pušenje u karcinomu pluća, grkljana, mokraćnog mjehura, vrata maternice, glave i vrata) postoji i genetska predispozicija za malignu bolest.

Ispitana je frekvencija genotipova u odnosu na spol ispitanika. Nije nađena statistički značajna razlika između muškaraca i žena za TNF- $\alpha$ -308 ( $p=0,67$ ) niti za TNF- $\alpha$ -238 ( $p=0,38$ ).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji genotipova obzirom na BMI. Za TNF- $\alpha$ -308  $p=0,87$ , a za TNF- $\alpha$ -238  $p=0,34$ . Ovo ispitivanje je rađeno da bi se utvrdilo da li određeni genotip ima veću predispoziciju prema gubitku tjelesne mase u bolesnika s rakom pluća.

Frekvencija alela (G i A) TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama u svih bolesnika i kontrolne skupine nije pokazivala statistički značajne razlike, ( $p=0,64$  za TNF- $\alpha$ -308 i  $p=0,71$  za TNF- $\alpha$ -238). Statistički značajna razlika nije nađena niti kada su se ispitivali posebno karcinomi pluća ne-malih stanica ( $p=0,59$  za TNF- $\alpha$ -308 i  $p=0,83$  za TNF- $\alpha$ -238) i karcinom pluća malih stanica ( $p=0,82$  za TNF- $\alpha$ -308 i  $p=0,99$  za TNF- $\alpha$ -238).

Ispitali smo neke laboratorijske nalaze, koji se mogu dovesti u vezu s nastankom, progresijom i prognozom karcinoma pluća, u odnosu na pojedine genotipove TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizama (251, 258, 259). Utvrđeno je da je su neutrofilni granulociti u bolesnika s TNF- $\alpha$ -308 GA i AA genotipovima u odnosu na GG genotip statistički značajno viši ( $p=0,049$ ). To je u skladu s podatkom da su neutrofilni granulociti u karcinomu pluća u prosjeku povišeni, što

je slučaj i u našem istraživanju. Nasuprot tome su vrijednosti ukupnih proteina u krvi kod osoba s TNF- $\alpha$ -308 GA i AA genotipovima u odnosu na GG genotip bili statistički značajno niži ( $p=0,003$ ). U karcinomu pluća često se nalazi hipoproteinemija, naročito u uznapredovalim stadijima bolesti, što nije bio slučaj u našem istraživanju. Međutim, ispitujući frekvenciju genotipova nalaz je u skladu s očekivanom hipoproteinemijom. U ova dva parametra (neutrofilni granulociti i ukupni proteini u krvi) -308 G alel je protektivan, a -308 A alel predisponira razvoj karcinoma pluća. Ispitane su laboratorijske vrijednosti u 14 bolesnika koji imaju TNF- $\alpha$ -238 GA genotip. Ispitujući izabrane laboratorijske nalaze u krvi utvrđeno je da nijedan parametar nije statistički značajno promijenjen u bolesnika s TNF- $\alpha$ -238 GA u odnosu na GG genotip (216 bolesnika). Jedino u nižim vrijednostima leukocita kod TNF- $\alpha$ -238 GA genotipa postoji povećani trend prema statističkoj značajnosti ( $p=0,053$ ), čime se može pretpostaviti protektivna uloga -238 A alela u karcinomu pluća za leukocite. Ovi izolirani nalazi funkcije A i G alela u neutrofilnih granulocita, ukupnih proteina u krvi i leukocita su u skladu s ukupnim nalazima za podložnost i progresiju karcinoma pluća i ispitivanju Shih-a i suradnika (19).

Karcinom pluća ima više čimbenika u etiologiji bolesti te je potrebno, istraživajući pojedine polimorfizme, koristiti kontrolirana ispitivanja. Zbog toga što su u karcinomu pluća uključeni različiti polimorfizmi treba biti oprezan s kriterijima koje postavljamo, kao i s interpretacijom pojedinih nalaza. Važno je i praćenje svakog bolesnika ponaosob, obzirom na klinički tijek i prognozu bolesti, uključujući i rezultate liječenja.



## 6. ZAKLJUČCI

- frekvencije TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 alela i genotipova u bolesnika i u zdravih ispitanika nije pokazala statistički značajne razlike, što ukazuje da navedeni polimorfizmi ne utječu na podložnost za primarni karcinom pluća u hrvatskoj populaciji.
- ne postoji razlika u frekvenciji genotipova TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 u pojedinih histoloških tipova karcinoma pluća.
- TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238 polimorfizmi u NSCLC ne utječu na stadij bolesti, dok -238 G alel ima predisponirajuću ulogu za nastanak proširene faze karcinoma u SCLC (stadiji III i IV) ( $p=0,020$ ).
- -238 G alel ima predisponirajuću ulogu u nastanku primarnog karcinoma pluća u bolesnika u kojih je ranije ustanovljen neki drugi primarni maligni tumor ( $p=0,000$ ).
- usporedbom genotipova i laboratorijskih nalaza krvi nađen je statistički značajan međusoban odnos između -308 A alela i povišenih vrijednosti neutrofilnih granulocita ( $p=0,049$ ), te sniženih vrijednosti ukupnih proteina periferne krvi ( $p=0,003$ ).
- svi ostali ispitivani laboratorijski parametri: SE, leukociti, limfociti, eritrociti, hemoglobin, trombociti, CRP, AF, CEA, LDH,  $\gamma$ -GT, ALT, AST, glukoza, kalcij, nemaju statistički značajnu povezanost s frekvencijom ili određenim genotipom TNF- $\alpha$ -308 i TNF- $\alpha$ -238.

## 7. LITERATURA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74 – 108.
2. Lan Q, Shen M, Berndt SI i sur. Smoky coal exposure, NBS1 polymorphism, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer* 2005; 49: 317 – 23.
3. Le Faou AL, Scemama O. Epidemiology of tobacco smoking. *Rev Mal Respir* 2005; 22: 27 – 32.
4. Shin JH, Kang SM, Kim YS i sur. Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 5 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Chest* 2005; 128: 2999 – 3003.
5. Yanada M, Yaoi T, Shimada J i sur. Frequent hemizygous deletion at 1p36 and hypermethylation downregulate RUNX3 expression in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 2005; 14: 817 – 22.
6. Okano T, Gemma A, Hosoya Y i sur. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 545 – 9.
7. Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y. EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer: a HuGE review. *Epidemiology* 2006; 17: 89 – 99.
8. Zeerleder S, Hack CE, Caliezi C i sur. Activated cytotoxic T cells and NK cells in severe sepsis and septic shock and their role in multiple organ dysfunction. *Clin Immunol* 2005; 116: 158 – 65.

9. Surovtseva EV, Anikeeva NV, Sikulev IuK, Shevelev AB. Production of soluble form of human TNF-alpha ligand-binding domain type 1 receptor by expression in Drosophila cells. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 2005; 3: 34 – 8.
10. Drulović J, Popadić D, Mesaroš Š i sur. Decreased frequency of the tumor necrosis factor  $\alpha$ -308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2003; 50: 25 – 9.
11. Caras I, Grigorescu A, Stavaru C i sur. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 1146 – 52.
12. Pawlik A, Florczak M, Ostanek L, Brzosko I, Gawronska Szklarz B. TNF- $\alpha$ -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 22 – 6.
13. Ateş A, Kinikli G, Düzgün N, Duman M. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with disease susceptibility and severity in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 2006; 26: 348 – 53.
14. Vendrell J, Fernandez-Real JM, Gutierrez C i sur. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene (-308 ) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2003; 167: 257 – 64.
15. Chierakul N, Wongwisutikul P, Vejbaesya S, Chotvilaiwan K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter polymorphism is not associated with smoking-related COPD in Thailand. *Respirology* 2005; 10: 36 – 9.
16. Jiang L, He B, Zhao MW, Ning LD, Li XY, Yao WZ. Association of gene polymorphism of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-13 with chronic

- obstructive pulmonary disease in Han nationality in Beijing. *Chin Med J* 2005; 118: 541 – 7.
17. Solari V, Ennis S, Cascio S, Puri P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism in reflux nephropathy. *J Urol* 2004; 172: 1604 – 6.
  18. Seifart C, Plagens A, Dempfle A i sur. TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, and IL-10 polymorphisms in patients with lung cancer. *Dis Markers* 2005; 21: 157 – 65.
  19. Shih CM, Lee YL, Chiou HL i sur. Association of TNF- $\alpha$  polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 52: 15 – 20.
  20. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM i sur. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003; 51: 3 – 30.
  21. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153 – 6.
  22. Borrás JM, Fernández E, Gonzales JR i sur. Lung cancer mortality in European regions (1955-1997). *Ann Oncol* 2003; 14: 159 – 61.
  23. Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol* 2002; 13: 1087 – 93.
  24. Mennezier B, Lebitasy MP, Moreau L i sur. Women and small cell lung cancer: social characteristics, medical history, management and survival: a retrospective study of all the male and female cases diagnosed in Bas-Rhin (Eastern France) between 1981 and 1994. *Lung Cancer* 2003; 42: 141 – 52.

25. Visbal AL, Williams BA, Nichols FC, 3rd i sur. Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 209 – 15.
26. Incidencija raka u Hrvatskoj 2004. Bilten broj 29. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak, 2006.
27. Richter ON, Dorn C, Rosing B, Flaskamp C, Ulrich. Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 271: 143 – 7.
28. Foegle J, Hedelin G, Lebitasy MP, Purohit A, Velten M, Quoix E. Non-small-cell lung cancer in a French department, (1982-1997): management and outcome. *Br J Cancer* 2005; 92: 459 – 66.
29. Baldini EH, Strauss GM. Women and lung cancer: waiting exhale. *Chest (Suppl. 2)* 1997; 112: 229 – 34.
30. Patel JD, Bach PB, Kris MG. Lung cancer in US women: a contemporary epidemic. *Jama* 2004; 291: 1763 – 8.
31. Sonnweber B, Dlaska M, Skvortsov S, Dirnhofer S, Schmid T, Hilbe W. High predictive value of epidermal growth factor receptor phosphorylation but not of EGFRvIII mutation in resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Pathol* 2006; 59: 255 – 9.
32. Schollnberger H, Manuguerra M, Bijwaard H i sur. Analysis of epidemiological cohort on smoking effects and lung cancer with a multistage cancer model. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1432 – 44.
33. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H i sur. Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer Res* 2006; 66: 1371 – 5.

35. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *JAMA* 2005; 294: 1505 – 10.
36. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Smoking reduction is associated with a reduced the risk of lung cancer-a secondary publication. *Ugeskr Laeger* 2006; 168: 695 – 7.
37. Reid A, de Klerk N, Ambrosini GL i sur. The effect of asbestosis on lung cancer risk beyond the dose related effect of asbestos alone. *Occup Environ Med* 2005; 62: 885 – 9.
38. Gottschall EB. Occupational and environmental thoracic malignancies. *J Thorac Imaging* 2002; 17: 189 – 97.
39. Miller YE, Fain P. Genetic Susceptibility to Lung Cancer. *Semin Resp Crit Care Med* 2003; 24: 197 – 204.
40. Pastorino U. Early detection of lung cancer. *Respiration* 2006; 73: 5 – 13.
41. Clark J, You M. Chemoprevention of lung cancer by tea. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 144 – 51.
42. Kim Y, Chongviriyaphan N, Liu C, Russell RM, Wang XD. Combined antioxidant ( $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) supplementation increases the levels of lung retinoic acid and inhibits the activation of mitogen-activated protein kinase in the ferret lung cancer model. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1410 – 9.
43. Berghmans T, Mascaux C, Martin B, Ninane V, Sculier JP. Prognostic role of p53 in stage III non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2005; 25: 2385 – 9.
44. Ponticiello A, Barra E, Giani U, Bocchino M, Sanduzzi A. P53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions

- proceeding to lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J* 2000; 15: 547 – 52.
45. Rohr UP, Rehfeld N, Geddert H i sur. Prognostic relevance of fragile histidine triad protein expression in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 180 – 5.
  46. Martin B, Paesmans M, Berghmans T i sur. Role of Bcl-2 as prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 55 – 64.
  47. Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J i sur. Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Supp. 6)* 2006; 51: 61 – 9.
  48. Cappuzzo F, Toschi L, Domenichini I i sur. HER3 genomic gain and sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2005; 93: 1334 – 40.
  49. Ulger AF, Keklik T, Kumbasar OO i sur. Prognostic significance of blood group antigen expression of tumor tissue in lung cancer patients. *Tumori* 2002; 88: 395 – 9.
  50. Oh Y, Mohiuddin I, Sun Y i sur. Phenotypic diversity of the lung vasculature in experimental models of metastases. *Chest* 2005; 128: 596 – 600.
  51. Rao JS, Gondi C, Chetty C, Chittivelu S, Joseph PA, Lakka SS. Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1399 – 408.

52. Breuer RH, Snijders PJ, Sutedja TG i sur. Suprabasal p53 immunostaining in premalignant endobronchial lesions in combination with histology is associated with bronchial cancer. *Lung Cancer* 2003; 40: 165 – 72.
53. Buccheri G., Ferrigno D. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J* 2004; 24: 898 – 904.
54. Shriver SP, Bourdeau HA, Gubish CT i sur. Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 24 – 33.
55. Tricker AR. Re: environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 760 – 1.
56. Pan H, Califano J, Ponte JF i sur. Loss of heterozygosity patterns provide fingerprints for genetic heterogeneity in multistep cancer progression of tobacco smoke-induced non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 1664 – 9.
57. Berlin I, Covey LS, Jiang H, Hamer D. Lack of effect of D2 dopamine receptor TaqI A polymorphism on smoking cessation. *Nicotine Tob Res* 2005; 7: 725 – 8.
58. Wei Q, Cheng L, Amos C i sur. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1764 – 72.
59. Neri M, Ugolini D, Bonassi S i sur. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Result of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res* 2006; 612: 14 – 39.



60. Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27: 75 – 93.
61. Young GD, Winokur TS, Cerfolio RJ i sur. Differential expression and biodistribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes. *Lung Cancer* 2002; 36: 133 – 41.
62. Sueoka E, Sueoka n, Goto Y i sur. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein B1 as Early Cancer Biomarker for Occult Cancer of Human Lungs and Bronchial Dysplasia. *Cancer Res* 2001; 61: 1896 – 902.
63. Garayoa MM, Man YG, Martinez A, Cuttitta F, Mulshine JL. Downregulation of hnRNP A2/B1 expression in tumor cells under prolonged hypoxia. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2003; 28: 80 – 5.
64. Matsuyama S, Goto Y, Sueoka N i sur. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 expressed in esophageal squamous cell carcinomas as a new biomarker for diagnosis. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 658 – 63.
65. Zhou J, Nong L, Wloch M, Cantor A, Mulshine JL, Tockman MS. Expression of early lung cancer detection marker: hnRNP-A2/B1 and its relation to microsatellite alteration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 34: 341 – 50.
66. Okano T, Gemma A, Hosoya Y i sur. Alterations in novel candidate tumor supressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 545 – 9.
67. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S i sur. Polymorphism in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1534 – 8.

68. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H i sur. Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer Res* 2006; 66: 1371 – 5.
69. Siegfried JM. Women and lung cancer: does oestrogen play a role? *Lancet Oncol* 2001; 2: 506 – 13.
70. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M i sur. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005; 65: 1642 – 6.
71. Mascaux C, Iannino N, Martin B i sur. The role of Ras expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta analysis. *Br J Cancer* 2005; 92: 131 – 9.
72. Steels E, Paesmans M, Berghmans T i sur. Role of p53 as prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Eur Resp J* 2001; 18: 705 – 19.
73. Ghazizadeh M, Jin E, Shimizu H i sur. Role of cdk4, p16INK4, and Rb expression in the prognosis of bronchioloalveolar carcinomas. *Respiration* 2005; 72: 68 – 73.
74. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M i sur. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5129 – 33.
75. Shih JY, Yang SC, Hong TM i sur. Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1392 – 400.

76. Martin B, Paesmans M, Mascaux C i sur. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2004; 91: 2018 – 25.
77. Hoshino H, Shibuya K, Chiyo M i sur. Biological features of bronchial squamous dysplasia followed up by autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer* 2004; 46: 187 – 96.
78. Breuer RH, Pasic A, Smit EF i sur. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 537 – 43.
79. Swinson DE, O'Byrne KJ. Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006; 7: 250 – 6.
80. Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H i sur. Role of protein kinase C in expression of granulocyte-colony stimulating factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor in lung cancer cells. *Int J Mol Med* 2005; 16: 873 – 81.
81. Meert AP, Martin B, Delmotte P i sur. The role of EGF-R expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Eur Resp J* 2002; 20: 975 – 81.
82. Meert AP, Martin B, Paesmans M i sur. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89: 959 – 65.
83. Johnson DH. Targeted therapy in non-small cell lung cancer: myth or reality. *Lung Cancer (Supp. 1)* 2003; 41: 3 – 8.

84. Meert AP, Paesmans M, Martin B i sur. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2002; 87: 694 – 701.
85. Shimanuki Y, Takahashi K, Cui R i sur. Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005; 183: 29 – 42.
86. Delmotte P, Martin B, Paesmans M i sur. VEGF et survie des patients atteints d'un cancer pulmonaire Revue systématique avec méta-analyse. *Rev Mal Respir* 2002; 19: 577 – 84.
87. Ciombor KK, Rocha Lima CM. Management of small cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2006; 7: 59 – 68.
88. Neithammer AG, Wodrich H, Loeffler M i sur. Multidrug resistance-1 (MDR-1): a new target for T cell-based immunotherapy. *FASEB J* 2005; 19: 158 – 9.
89. Krug LM. Vaccine therapy for small cell lung cancer. *Semin Oncol (Suppl. 1)* 2004; 31: 112 – 6.
90. O'Brien ME, Anderson H, Kaukel E i sur. SRL172 (killed *Mycobacterium vaccae*) in addition to standard chemotherapy improves quality of life without affecting survival, in patients with advanced non-small-cell lung cancer: phase III results. *Ann Oncol* 2004; 15: 906 – 14.
91. Ludwig MS, Goodman M, Miller DL, Johnstone PA. Postoperative survival and the number of lymph nodes sampled during resection of node-negative non-small cell lung cancer. *Chest* 2005; 128: 1545 – 50.

92. Montes U, Seijo LM, Campo A, Alcaide AB, Bastarrika G, Zulueta JJ. Factors determining early adherence to a lung cancer screening protocol. *Eur Respir J* 2007; 30: 532 – 7.
93. Moro-Sibilot D, Fievet F, Jeanmart M i sur. Clinical prognostic indicators of high-grade preinvasive bronchial lesions. *Eur Respir J* 2004; 24: 24 – 9.
94. Kazerooni EA. Lung cancer screening. *Eur Radiol (Suppl. 4)* 2005; 15: 48 – 51.
95. Stephenson SM, Mech KF, Sardi A. Lung cancer screening with low-dose spiral computed tomography. *Am Surg* 2005; 71: 1015 – 7.
96. Qiang JW, Zhou KR, Lu G i sur. The relationship between solitary pulmonary nodules and bronchi: multi-slice CT-pathological correlation. *Clin Radiol* 2004; 59: 1121 – 7.
97. Pasic A, Comans EF, Paul MA, Postmus PE, Sutedia TG. Borderline early squamous cell lung cancer. *Breathe* 2004; 1: 157 – 9.
98. Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K i sur. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer* 2005; 48: 77 – 83.
99. Steven FS, Katsumi T, Payne PW, Denton J. Evidence for the Induction of a Tumour Associated Cell Surface Protease on Cytologically Normal Epithelial Cells Present in the Sputum of Patients Possessing Lung Tumours. *Anticancer Res* 1999; 19: 3491 – 3.
100. Valle RP, Chavany C, Zhukov TA, Jendoubi M. New approaches for biomarker discovery in lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3: 55 – 67.

101. Grepmeier U, Dietmaier W, Merk J i sur. Deletions at chromosome 2q and 12p are early and frequent molecular alterations in bronchial epithelium and NSCLC of long-term smokers. *Int J Oncol* 2005; 27: 481 – 8.
102. Romeo MS, Sokolova IA, Morrison LE i sur. Chromosomal abnormalities in non-small cell lung carcinomas and in bronchial epithelia of high-risk smokers detected by multi-target interphase fluorescence in situ hybridization. *J Mol Diagn* 2003; 5: 103 – 12.
103. Bota S, Auliac JB, Paris C i sur. Follow-up of Bronchial Precancerous Lesions and Carcinoma in Situ Using Fluorescence Endoscopy. *Am J Crit Care Med* 2001; 164: 1688 – 93.
104. Sutedja G. New techniques for early detection of lung cancer. *Eur Respir J (Suppl. 39)* 2003; 21: 57 – 66.
105. Ikeda N, Hiyoshi T, Kakihana M i sur. Histopathological evaluation of fluorescence bronchoscopy using resected lungs in cases of lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41: 303 – 9.
106. Chhajed PN, Shibuya K, Hoshino H i sur. A comparison of video and autofluorescence bronchoscopy in patients at high risk of lung cancer. *Eur Respir J* 2005; 25: 951 – 5.
107. Lam B, Wong MP, Fung SL i sur. The clinical value of autofluorescence bronchoscopy for the diagnosis of lung cancer. *Eur Respir J* 2006; 28: 915 – 9.
108. Pasic A, Vonk-Noordegraaf A, Risse EK, Postmus PE, Sutedja TG. Multiple suspicious lesions detected by autofluorescence bronchoscopy predict malignant development in the bronchial mucosa in high risk patient. *Lung Cancer* 2003; 41: 295 – 301.

109. Moro-Sibilot D, Fievet F, Jeanmart M i sur. Clinical prognostic indicators of high-grade pre-invasive bronchial lesions. *Eur Respir J* 2004; 24: 24 – 9.
110. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumors. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059 – 68.
111. Wahbah M, Boroumand N, Castro C, El-Zeky F, Eltorkey M. Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Ann Diagn Pathol* 2007; 11: 89 – 96.
112. Blanchon F, Grivaux M, Collon T i sur. Epidemiologic of primary bronchial carcinoma management in the general French hospital centers. *Rev Mal Respir* 2002; 19: 727 – 34.
113. De Leyn P, Lardinois D, Van Schil P i sur. European trends in preoperative and intraoperative nodal staging: ESTS guidelines. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 357 – 61.
114. Weydert JA, Cohen MB. Small peripheral pulmonary adenocarcinoma: morphologic and molecular update. *Adv Anat Pathol* 2007; 14: 120 – 8.
115. Toh CK, Gao F, Lim WT i sur. Differences between small-cell lung cancer and non-small-cell lung cancer among tobacco smokers. *Lung Cancer* 2007; 56: 161 – 6.
116. Stern P, Bartos V, Uhrova J i sur. Performance characteristics of seven neuron-specific enolase assays. *Tumour Biol* 2007; 28: 84 – 92.
117. Tai P, Chapman JA, Yu E i sur. Disease-specific survival for limited-stage small-cell lung cancer affected by statistical method of assessment. *BMC Cancer* 2007; 7: 31.

118. Hasegawa S, Suda T, Negi K, Hattori Y. Lung large cell carcinoma producing granulocyte-colony-stimulating factor. *Ann Thorac Surg* 2007; 83: 308 – 10.
119. Maruyama R, Yokoyama H, Seto T i sur. Catheter drainage followed by the instillation of bleomycin to manage malignant pericardial effusion in non-small cell lung cancer: a multiinstitutional phase II trial. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 65 – 8.
120. Martin MG, Ardati AK, Dunlay SM, Abernethy AP, Blazing MA. Small cell lung cancer presenting as a paraneoplastic syndrome characterized by recurrent episodic hypotension and bradycardia: case report. *Chest* 2007; 131: 290 – 3.
121. Pandit R, Scholnik A, Wulfekuhler L, Dimitrov N. Non-small-cell lung cancer associated with excessive eosinophilia and secretion of interleukin-5 as a paraneoplastic syndrome. *Am J Mematol* 2007; 82: 234 – 7.
122. Kono R, Fujimoto K, Terasaki H i sur. Dynamic MRI of solitary pulmonary nodules: comparison of enhancement patterns of malignant and benign small peripheral lung lesions. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 26 – 36.
123. Garg S, Handa U, Mohan H, Janmeja AK. Comparative analysis of various cytohistological techniques in diagnosis of lung diseases. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 26 – 31.
124. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007; 75: 56 – 63.
125. Lee HS, Kwon SY, Kim DK i sur. Bronchial washing yield before and after forceps biopsy in patients with endoscopically visible lung cancers. *Respirology* 2007; 12: 277 – 82.



126. Yasufuku K, Fujisawa. Staging and diagnosis of non-small cell lung cancer: invasive modalities. *Respirology* 2007; 12; 173 – 83.
127. Kinoshita F, Kato T, Sugiura K i sur. CT-guided transthoracic needle biopsy using a puncture site-down positioning technique. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 926 – 32.
128. Mayo PH, Doelken P. Pleural Ultrasonography. *Clin Chest Med* 2006; 27: 215 – 7.
129. Platt G, Pierard P, Haller A i sur. Endobronchial ultrasound and positron emission tomography positive mediastinal lymph nodes. *Eur Respir J* 2006; 27: 276 – 81.
130. Bernasconi M, Chhajed PN, Gambazzi F i sur. Combined transbronchial needle aspiration and positron emission tomography for mediastinal staging of NSCLC. *Eur Resp J* 2006; 27: 889 – 94.
131. Herth FJF, Ernst A, Eberhardt R, Vilmann P, Dienemann H, Krasnik M. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of lymph nodes in the radiologically normal mediastinum. *Eur Respir J* 2006; 28: 910 – 4.
132. De Wever W, Vankan Y, Stroobants S, Verschakelen J. Detection of extrapulmonary lesions with integrated PET/CT in the staging of lung cancer. *Eur Respir J* 2007; 29: 995 – 1002.
133. Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Ponticello A, Marchetiello I, Salvatore F. Carcinoembryonic antigen mRNA analysis detects micrometastatic cells in blood from lung cancer patients. *Eur Respir J* 2003; 22: 418 – 21.

134. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111: 1710 – 17.
135. Koutsami MK, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Asimacopoulos PJ, Kittas C. Prognostic factors in non-small cell lung carcinom. *Anticancer Res* 2002; 22: 347 – 74.
136. Choma D, Daures JP, Quantin X, Pujol JL. Aneuploidy and prognosis of non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of published data. *Br J Cancer* 2001; 85: 14 – 22.
137. Subotic D, Mandaric D. Palliative operations for lung cancer. *Acta Chir Iugosl* 2006; 53: 59 – 65.
138. Chee R, Bydder S, Cameron F. Prolonged survival after resection and radiotherapy for solitary brain metastases from non-small cell lung cancer. *Australas Radiol* 2007; 51: 186 – 9.
139. Rossi S, Dore R, Cascina A i sur. Percutaneous computed tomography-guided radiofrequency thermal ablation of small unresectable lung tumours. *Eur Respir J* 2006; 27: 556 – 63.
140. Venuta F, Anile M, Diso D i sur. Operative complications and early mortality after induction therapy for lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 31: 714 – 7.
141. Toh CK, Hee SW, Lim WT i sur. Survival of small-cell lung cancer and its determinants of outcome in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 181 – 8.
142. Shi A, An T, Zhu G i sur. Phase I study to determine the MTD of paclitaxel given three times per week during concurrent radiation therapy for stage III non-small cell lung cancer. *Curr Med Res Opin* 2007; 23: 1161 – 7.

143. Yokomise H, Gotoh M, Okamoto T i sur. Induction chemoradiotherapy (carboplatin-taxane and concurrent 50-Gy radiation) for bulky cN2, N3 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 1179 – 85.
144. Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M i sur. Inhibitory Role of CD19 in the Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Cytokine Response. *Am J Pathol* 2006; 168: 812 – 21.
145. Gagro A. Characteristics of Immune Reactions in Respiratory Infections. *Medicus* 2005; 14: 27 – 31.
146. Nita I, Hollander C, Westin U, Janciauskiene SM. Prolastin, a pharmaceutical preparation of purified human  $\alpha$ 1-antitrypsin, block endoxin-mediated cytokine release. *Respir Res* 2005; 6: 12.
147. Pease JE, Williams TJ. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol* 2006 (Suppl. 1); 147: 212 – 21.
148. Sharma S, Zhu L, Yang SC i sur. Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN-gamma-dependent enhancement of antitumor responses. *J Immunol* 2005; 175: 813 – 9.
149. Lee CH, Kakinuma T, Wang J i sur. Sensitization of B16 tumor cells with a CXCR4 antagonist increases the efficacy of immunotherapy for established lung metastases. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2592 – 9.
150. Bonsignore MR, Morici G, Santoro A i sur. Circulating hematopoietic progenitor cell in runners. *J Appl Physiol* 2002; 93: 1691 – 7.
151. Hanington PC, Belosevic M. Interleukin-6 family cytokine M17 induces differentiation and nitric oxide response of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Dev Comp Immunol* 2007; 31: 817 – 29.

152. Boldrini L, Calcinai A, Samaritani E i sur. Tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta are significantly associated with better prognosis in non-small cell lung carcinoma: putative relation with bcl-2 mediated neovascularisation. *Br J Cancer* 2000; 83: 480 – 6.
153. Benlloch M, Mena S, Ferrer P i sur. Bcl-2 and Mn-SOD antisense oligodeoxynucleotides and a glutamine-enriched diet facilitate elimination of highly resistant B16 melanoma cells by tumor necrosis factor-alpha and chemotherapy. *J Biol Chem* 2006; 281: 69 – 79.
154. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF alpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006; 7: 125.
155. Watkins SK, Egilmez NK, Suttles J, Stout RD. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol* 2007; 178: 1357 – 62.
156. Lo JC, Wang Y, Tumanov AV i sur. Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis. *Science* 2007; 316: 206 – 7.
157. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wouters EF. Systemic inflammation in COPD: is genetic susceptibility a key factor? *COPD* 2006; 3: 51 – 61.
158. Wagley Y, Yoo YC, Seo HG i sur. The IL-6/sIL-6R treatment of a malignant melanoma cell line enhances susceptibility to TNF-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 985 – 91.
159. Matanić D, Beg-Zec Z, Stojanović D, Mataković-Mileusnić N, Flego V, Milevoj-Ribić F. Cytokines in Patients with Lung Cancer. *Scand J Immunol* 2003; 57: 173 – 8.

160. Bianchi M, Martucci C, Ferrario P, Franchi S, Sacerdote P. Increased tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2 concentrations in the cerebrospinal fluid of rats with inflammatory hyperalgesia: the effects of analgesic drugs. *Anesth Analg* 2007; 104: 949 – 54.
161. Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeong KI, Gonzalez AM, Saif LJ. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: In vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 117: 236 – 48.
162. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res* 2007; 86: 347 – 51.
163. Choi C, Benveniste EN. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 44: 65 – 81.
164. Esper DH, Harb WA. The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *Nutr Clin Pract* 2005; 20: 369 – 76.
165. Kharfi A, Labelle Y, Mailloux J, Akoum A. Deficient expression of tumor necrosis factor receptor type 2 in the endometrium of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 33 – 40.
166. Habu Y, Shinomiya N, Kinoshita M, Matsumoto A, Kawabata T, Seki S. Mice deficient in Vbeta8+NKT cells are resistant to experimental hepatitis but are partially susceptible to generalised Shwartzman reaction. *Clin Exp Med* 2007; 7: 30 – 8.

167. Cha HS, Bae EK, Koh JH i sur. Tumor necrosis factor-alpha induces vascular endothelial growth factor-C expression in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol* 2007; 34: 16 – 9.
168. Brocq O, Roux CH, Albert C i sur. TNFalpha antagonist continuation rates in 442 patients with inflammatory joint disease. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 148 – 54.
169. Qin W, Feng J, Li Y, Lin Z, Shen B. A novel domain antibody rationally designed against TNF-alpha using variable region of human heavy chain antibody as scaffolds to display antagonistic peptides. *Mol Immunol* 2007; 44: 2355 – 61.
170. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ i sur. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 295: 2275 – 85.
171. Fulchiero GJ Jr, Salvaggio H, Drabick JJ i sur. Eruptive latent metastatic melanomas after initiation of antitumor necrosis factor therapies. *J Am Acad Dermatol (Suppl. 5)* 2007; 56: 65 – 7.
172. Wolfe F, Michaud K. The effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy on the risk of lymphoma in rheumatoid arthritis in 19,562 patients during 89,710 persons-years of observation. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1433 – 9.
173. Masuda K, Mochida Y, Fujii J i sur. Primary cervical epidural malignant lymphoma with rheumatoid arthritis: a case report. *Mod Rheumatol* 2007; 17: 239 – 42.

174. Imrich A, Ning Y, Lawrence J i sur. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218: 256 – 64.
175. Huang Y, Li J, Wang R i sur. Effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf on inflammatory cytokine and mediator induction from alveolar macrophages of chronic bronchitic rats. *Inflamm Res* 2007; 56: 76 – 82.
176. Ratcliffe MJ, Walding A, Shelton PA, Flaherty A, Dougall IG. Activation of E-prostanoid<sub>4</sub> and E-prostanoid<sub>2</sub> receptors inhibits TNF- $\alpha$  release from human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2007; 29: 986 – 94.
177. Suzuki T, Shimizu T, Szalay L i sur. Androstenediol ameliorates alterations in immune cells cytokine production capacity in a two-hit model of trauma-hemorrhage and sepsis. *Cytokine* 2006; 34: 76 – 84.
178. Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N i sur. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: 130 – 9.
179. Vudattu NK, Holler E, Ewing P i sur. Reverse signalling of membrane-integrated tumour necrosis factor differentially regulates alloresponses of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells against human microvascular endothelial cells. *Immunology* 2005; 115: 536 – 43.
180. Schnyder-Candrian S, Quesniaux VF, Di Padova F i sur. Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 2005; 175: 262 – 9.

181. Gao J, Zeng BX, Zhou LJ, Yuan SY. Protective effects of early treatment with propofol on endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Br J Anaesth* 2004; 92: 277 – 9.
182. Sheng WH, Chiang BL, Chang SC i sur. Clinical manifestations and inflammatory cytokine responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Formos Med Assoc* 2005; 104: 715 – 23.
183. Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Hemoadsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor-kappaB DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia. *Crit Care Med* 2004; 32: 896 – 7.
184. Frankel SK, Cosgrove GP, Cha SI i sur. TNF-alpha Sensitizes Normal and Fibrotic Human Lung Fibroblasts to Fas-Induced Apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 293 – 304.
185. Munoz M, Cobos A, Campos A, Ariza D, Munoz E, Gomez A. Impact of postoperative shed blood transfusion, with or without leucocyte reduction, on acute-phase response to surgery for total knee replacement. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 1182 – 90.
186. LaBue M, Colburn KK, Green LM. Thyrocytes isolated from autoimmune-diseased thyroids secrete soluble tumor necrosis factor-R1 that is related to their elevated protein kinase C activity. *Thyroid* 2004; 14: 249 – 62.
187. DeBusk LM, Chen Y, Nishishita T, Chen J, Thomas JW, Lin Pc. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2461 – 71.



188. Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 321 – 6.
189. Taylor PC. Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy. *Rheumatology* 2005; 44: 721 – 8.
190. Nunes H, Soler P, Valeyre D. Pulmonary sarcoidosis. *Allergy* 2005; 60: 565 – 82.
191. Ziegenhagen MW, Muller-Quernheim J. The cytokine network in sarcoidosis and its clinical relevance. *J Intern Med* 2003; 253: 18 – 30.
192. Baughman RP, Iannuzzi M. Tumour necrosis factor in sarcoidosis and its potential for targeted therapy. *BioDrugs* 2003; 17: 425 – 31.
193. Dai H, Guzman J, Chen B, Costabel U. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor-alpha by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest* 2005; 127: 251 – 6.
194. Tahanovich AD, Katovich IL, Baradzina HL. Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid phospholipids and cytokine release by alveolar macrophages as prognostic markers in sarcoidosis. *Respiration* 2003; 70: 376 – 81.
195. Miyara M, Amoura Z, Parizot C i sur. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 359 – 70.
196. Berry MA, Hargadon B, Shelley M i sur. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 2006; 354: 697 – 708.
197. Chomej P, Bauer K, Bitterlich N i sur. Differential diagnosis of pleural effusions by fuzzy-logic-based analysis of cytokines. *Respir Med* 2004; 98: 308 – 17.

198. Booth AD, Jayne DR, Kharbanda RK i sur. Infliximab improves endothelial dysfunction in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation. *Circulation* 2004; 109: 1718 – 23.
199. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- $\alpha$ ) and essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2005; 2: 149 – 54.
200. Kiyohara C, Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci* 2007; 4: 59 – 71.
201. Sasaki H, Endo K, Konishi A i sur. EGFR Mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2924 – 9.
202. Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; 5: 315 – 29.
203. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Loidi L, Barros-Dios JM. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, tobacco and risk of lung cancer: a case-control study from Galicia, Spain. *Anticancer Res* 2003; 23: 4333 – 7.
204. Su D, Ma S, Liu P i sur. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2007; 56: 281 – 8.
205. Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 353 – 62.
206. Steiner SJ, Gupta SK, Croffie JM i sur. Serum levels of alpha-1-antitrypsin predict phenotypic expression of the alpha-1-antitrypsin gene. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1793 – 6.

207. Brogger J, Steen VM, Eiken HG, Gulsvik A, Bakke P. Genetic association between COPD and polymorphisms in TNF, ADRB2 and EPHX1. *Eur Resp J* 2006; 27: 682 – 8.
208. Tanaka G, Sandford AJ, Kurkett K i sur. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers. *Eur Respir J* 2007; 29: 34 – 41.
209. Boezen HM, Postma DS. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms: a relationship with COPD and its progression? *Eur Respir J* 2007; 29: 8 – 10.
210. Riha RL, Brander P, Vennelle M i sur. Tumour necrosis factor- $\alpha$  (-308) gene polymorphism in obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. *Eur Respir J* 2005; 26: 673 – 8.
211. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P. Association of TNF- $\alpha$  polymorphisms in Crohn disease. *Hum Immunol* 2005; 66: 56 – 9.
212. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J i sur. TNF-alpha-308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101 – 6.
213. Gong MN, Zhou W, Williams PL i sur. -308GA and TNFB polymorphisms in acute respiratory distress-syndrome. *Eur Respir J* 2005; 26: 382 – 9.
214. Lee YH, Harley JB, Nath SK. Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 364 – 71.

215. Tulusso B, Fabris M, Caporali R i sur. -238 and +489 TNF-alpha along with TNF-RII gene polymorphisms associate with the diffuse phenotype in patients with Systemic Sclerosis. *Immunol Lett* 2005; 96: 103 – 8.
216. Jang WH, Yang YI, Yea SS i sur. The -238 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett* 2001; 66: 41 – 6.
217. Nikolova P, Pawelec G, Mihailova S i sur. Association of cytokine gene polymorphism with malignant melanoma in Caucasian population. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 371 – 9.
218. Liu CJ, Wong YK, Chang KW, Chang HC, Liu HF, Lee YJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 608 – 12.
219. Jeong P, Kim EJ, Kim EG, Byun SS, Kim CS, Kim WJ. Association of bladder tumors and GA genotype of -308 nucleotide in tumor necrosis factor-alpha promoter with greater tumor necrosis factor-alpha expression. *Urology* 2004; 64: 1052 – 6.
220. Leibovici D, Grossman HB, Dinney CP i sur. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5746 – 56.
221. Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG i sur. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 395 – 400.
222. DeMichele A, Martin AM, Mick R i sur. Interleukin-6 -174G-->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 8051 – 6.

223. Smith KC, Baternan AC, Fussell HM, Howell WM. Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility and prognosis. *Eur J Immunogenet* 2004; 31: 167 – 73.
224. Gonzalez EG, Padilla FJB, El-Omar E i sur. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer* 2005; 114: 237 – 41.
225. Wu MS, Chen LT, Shun CT i sur. Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Int J Cancer* 2004; 110: 695 – 700.
226. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P i sur. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 364 – 71.
227. Lee JY, Kim HY, Kim KH i sur. Association of polymorphism of IL-10 and TNF-A genes with gastric cancer in Korea. *Cancer Lett* 2005; 225: 207 – 14.
228. Perri F, Piepoli A, Bonvicini C i sur. Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two Italian areas at high and low cancer prevalence. *Cytokine* 2005; 30: 293 – 302.
229. Li C, Xia B, Yang Y, Li J, Xia HH. TNF gene polymorphisms and Helicobacter Pylori infection in gastric carcinogenesis in Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 290 – 4.
230. Gough MD, Ackroyd R, Majeed AW, Bird NC. Prediction of Malignant Potential in Reflux Disease: Are Cytokine Polymorphisms Important? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1012 – 8.

231. Basturk B, Yavascaoglu I, Vuruskan H, Goral G, Oktay B, Oral HB. Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine* 2005; 30: 41 – 5.
232. Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Pawade J, Glew S. TNF $\alpha$  polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 675 – 9.
233. Govan VA, Constant D, Hoffman M, Williamson AL. The allelic distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer* 2006; 6: 24.
234. Skov L, Allen MH, Bang B, Francis D, Barker JNWN, Baadsgaard O. Basal cell carcinoma is associated with high TNF- $\alpha$  release but not with TNF- $\alpha$  polymorphism at position -308. *Exp Dermatol* 2003; 12: 772 – 6.
235. Ho SY, Wang YJ, Chen HL i sur. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promotor gene. *Cancer Causes Control* 2004; 15: 657 – 63.
236. Morgan GJ, Adamson PJ, Mensah FK i sur. Haplotypes in the tumour necrosis factor region and myeloma. *Haematol* 2005; 129: 358 – 65.
237. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Folsch UR, Hampe J, Schreiber S. A functional promotor polymorphism of TNF-alpha is associated with primary gastric B-Cell lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2644 – 9.
238. Seidemann K, Zimmermann M, Book M i sur. Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients

- with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Munster Trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8414 – 21.
239. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of Smoking Reduction on Lung Cancer Risk. *JAMA* 2005; 294: 1505 – 10.
240. Mollerup S, Berge G, Baera R i sur. Sex differences in risk of lung cancer: expression of genes in the PAH bioactivation pathway in relation to smoking and bulky DNA adducts. *Int J Cancer* 2006; 119: 741 – 4.
241. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28: 507 – 18.
242. Cooley ME, Sarna L, Brown JK i sur. Tobacco use in women with lung cancer. *Ann Behav Med* 2007; 33: 242 – 50.
243. Uliana M, Della Seta R, Penucci MC, Marini P. Three different kinds of tumor in the same patient. Correlation with the lifestyle. *Recenti Prog Med* 2007; 98: 443 – 4.
244. McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM. Smoking is risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1165 – 70.
245. Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES i sur. Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1634 – 43.
246. Chodorowski Z, Stankiewicz C, Sein Anand J, Wisniewski M, Sierszen W. Tobacco smoking and multiple primary cancers. *Przegl Lek* 2007; 64: 374 – 5.

247. Ramsey SD, Yoon P, Moonesinghe R, Khoury MJ. Population-based study of the prevalence of family history of cancer: implications for cancer screening and prevention. *Genet Med* 2006; 8: 571 – 5.
248. Butler CA, Darragh KM, Currie GP, Anderson WJ. Variation in lung cancer survival rates between countries: do differences in data reporting contribute? *Respir Med* 2006; 100: 1642 – 6.
249. Coelho A, Calcada C, Catarino R, Pinto D, Fonseca G, Medeiros R. CXCL12-3' A Polymorphism and lung cancer metastases protection: new perspectives in immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 639 – 43.
250. Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Adv Clin Chem* 2006; 42: 1 – 41.
251. Yokosuka K, Kawashima T, Okada N i sur. Impaired consciousness caused by a metastatic adrenal tumor of pulmonary adenocarcinoma. *Intern Med* 2008; 47: 109 – 12.
252. Nauck MA, Reinecke M, Perren A i sur. Hypoglycemia due to paraneoplastic secretion of insulin-like growth factor-I in a patient with metastasizing large-cell carcinoma of the lung. *J Clin Endocrinol Metabol* 2007; 92: 1600 – 5.
253. Glaspy J, Henry D, Patel R i sur. Effects of chemotherapy on endogenous erythropoetin levels and the pharmacokinetics and erythropoietic response of darbepoetin alfa: a randomised clinical trial of synchronous versus asynchronous dosing of darbepoetin alfa. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1140 – 9.



254. Strassberg SS, Cristea IA, Qian D, Parton LA. Single nucleotide polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and the susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 29 – 36.
255. Lin HC, Tsai CH, Tsai FJ. Association Study of Gene Polymorphism and Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatrics* 2005; 115: 198 – 9.
256. Kazzi SN, Kim UO, Quasney MW, Buhimschi I. Polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and risk and severity of bronchopulmonary dysplasia among very low birth weight infants. *Pediatrics* 2004; 114: 243 – 8.
257. Mellati E, Arab H, Afshari JT, Ebadian A, Radvar M. Analysis of -1082 IL-10 gene polymorphism in Iranian patients with generalized aggressive periodontitis. *Med Sci Monit* 2007; 13: 510 – 4.
258. Shih CM, Lee YL, Chiou HL i sur. The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 50: 291 – 7.
259. Paesmans M. Prognostic factors in lung cancer. *Rev Mal Respir* 2005; 22: 76 – 80.
260. Hauser CA, Stockler MR, Tattersall MH. Prognostic factors in patients with recently diagnosed incurable cancer: a systematic review. *Support Care Cancer* 2006; 14: 999 – 1011.

## **ŽIVOTOPIS**

### **Osobni podaci:**

Ime i prezime: Veljko Flego

Adresa: Srdoči 59, 51000 Rijeka, Hrvatska

Telefon: 051/625-153

Telefaks: /

Elektronička pošta: [veljko.flego2@ri.t-com.hr](mailto:veljko.flego2@ri.t-com.hr)

Državljanstvo: hrvatsko

Datum rođenja: 03. svibnja 1959.

Oženjen, otac jednog sina.

Matični broj iz Upisnika znanstvenika: 242203

### **Radno iskustvo:**

1983. i 1985. Klinički bolnički centar Rijeka i Dom zdravlja Rijeka; liječnik pripravnik.

1985. Dom zdravlja Poreč; liječnik opće medicine u turističkoj ambulanti.

1985. – 1987. Lječilište "Istarske toplice"; liječnik opće medicine.

1987. – 1993. Odjel pulmologije, Klinički bolnički centar u Rijeci; specijalizant iz pneumoftizilogije.

Od 1993. Odjel pulmologije, Klinički bolnički centar u Rijeci; specijalista pneumoftizilog; odjelni liječnik.

Od 2001. Katedra za internu medicinu, Medicinski fakultet u Rijeci; asistent iz interne medicine.

### **Školovanje – dodiplomsko:**

1973. – 1977. Gimnazija "Mirko Lenac" u Rijeci.

1977. – 1983. Medicinski fakultet u Rijeci, smjer Opća medicina; doktor medicine.

Diplomirao sam 04. travnja 1983.

### **Školovanje – poslijediplomsko:**

29. svibnja 1985. položio sam državni stručni ispit o osposobljenosti za samostalni rad na poslovima liječnika.

1989. – 1993. Specijalizacija iz pneumoftziologije. Specijalistički ispit iz pneumoftziologije položio sam 28. lipnja 1993; Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske u Zagrebu.

1992. – 1993. Prva godina poslijediplomskog studija iz Pulmologije; Medicinski fakultet u Zagrebu.

1993. – 1995. Poslijediplomski studij iz Opće kliničke patofiziologije; Medicinski fakultet u Rijeci. 12. srpnja 2001. obranio sam Magistarski rad na Medicinskom fakultetu u Rijeci pod naslovom: “Citogenetičke promjene malignih stanica pleuralnih izljeva i prognoza bolesti.”

#### **Usavršavanje:**

1999. Klinički bolnički centar u Rijeci; interni tečaj iz osnova ultrazvučne dijagnostike.

#### **Osobne vještine i kompetencije:**

Materinji jezik: hrvatski.

Strani jezici: engleski (govori, piše i čita),  
talijanski (govori, piše i čita).

Vozačka dozvola: B kategorije.

#### **Članstva u znanstvenim i strukovnim udruženjima:**

Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pulmološkog društva, Europskog respiratornog društva, Hrvatskog društva sudskih vještaka.

**Nagrade i priznanja:** 1981. Sveučilište u Rijeci; druga nagrada za stručni rad: “Komparativno proučavanje građe dentina zuba čovjeka, kopitara i svinja.”

#### **Stručno-znanstveni rad:**

Kvalifikacijski radovi:

1. „Komparativno proučavanje građe dentina zuba čovjeka i nekih domaćih životinja.“ Medicinski fakultet u Rijeci, 1983. (Diplomski rad).

2. “Citogenetičke promjene malignih stanica pleuralnih izljeva i prognoza bolesti.” Medicinski fakultet u Rijeci, 2001. (Magistarski rad).

Tri izvorna znanstvena rada od kojih su dva u Current Contents-u.

Šest stručnih radova u časopisima s recenzijom, od toga jedan u Current Contents-u.

Znanstvenih kongresnih priopćenja (sažetci) bilo je 17.