

# Uloga GLUT1 i HIF-1 $\alpha$ u metabolizmu karcinoma pluća

---

**Kokeza, Josipa**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:942949>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Josipa Kokeza**

**ULOGA GLUT1 I HIF-1 $\alpha$  U METABOLIZMU KARCINOMA PLUĆA**

**Doktorska disertacija**

**Split**

**2024. godina**

Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i etiologiju KBC Split.

Voditeljica rada je doc. dr. sc. Sandra Zekić Tomaš, dr. med.

## **ZAHVALA**

Od sveg srca zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Zekić Tomaš na potpori, razumijevanju te, prije svega, prijateljskom odnosu i strpljenju.

Veliko hvala pokojnom prof. dr. sc. Anti Rozgi na inicijalnoj potpori pri statističkoj obradi podataka. Neizmjereno hvala dugujem dr. sc. Marinu Ogorevcu na nastavku započete statističke obrade, a prije svega na nesebičnoj suradnji i ogromnoj pomoći.

Veliku zahvalnost dugujem gopodi Juliji Pušić zbog njene ljudskosti.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj obitelji, a osobito mojim najvećim ljubavima Sini i Niki jer su mi najveći oslonac i vjetar u leđa.

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

ADH- antidiuretski hormon

ALK- engl. anaplastic lymphoma kinase

Ast- engl. average survival time

ATP- engl. adenosine triphosphate

BAL- bronhoalveolarna lavaža

BRAF- engl. v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

cDNA- engl. complementary deoxyribonucleic acid

CK5- citokeratin 5

CT- kompjutorizirana tomografija

DAPI- 4,6-diamidino-2-fenilindol

DFS- engl. disease free survival

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

EBUS- endobronhalni ultrazvuk

ECOG- engl. Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR- engl. epidermal growth factor receptor

EUS- endoskopski ultrazvuk

FDG- fluorodeoksiglukoza

GLUT- engl. glucose transporter

HIF- 1- hipoksija inducibilni faktor 1, eng. hipoxya inducible factor 1

Ki-67- antigen Kiel 67

LDCT- engl. low dose computed tomography

mRNA- engl. messenger ribonucleic acid

NOS- engl. not otherwise specified

NSCLC- engl. non-small cell lung cancer

OS- engl. overall survival

PBS- engl. phosphate-buffered saline

PCR- engl. polymerase chain reaction

PD-L1- engl. programmed death-ligand 1

PET-CT- pozitronska emisijska tomografija s kompjutoriziranom tomografijom

p63- tumor protein 63

qPCR- engl. quantitative polymerase chain reaction

RET- engl. rearranged during transfection

RNA- engl. ribonucleic acid

ROS1- engl. repressor of silencing 1

SCLC- engl. small cell lung cancer

SD- standardna devijacija

SLC2A1- engl. solute carrier family 2 member 1

SUVmax- engl. maximum standardized uptake value

TGF- $\beta$ - engl. transforming growth factor  $\beta$

TNM- engl. tumour, node, metastasis

TTF-1- engl. Thyroid transcription factor 1

UNG- Uracil N-glikozilaza

VEGF- engl. vascular endothelial growth factor

VEGFR2- engl. vascular endothelial growth factor receptor 2

VPVP- vidno polje velikog povećanja

## SADRŽAJ PREMA POGLAVLJIMA

1.	UVOD .....	1
1.1.	Karcinom pluća .....	2
1.1.2.	Klinička slika i specifična obrada .....	5
1.1.3.	PET/CT s uporabom FDG .....	5
1.1.4.	TNM, stadiji bolesti o odluka o terapiji .....	7
1.2.	Prijenosnici glukoze i metabolizam glukoze u NSCLC .....	10
1.3.	Čimbenik induciran hipoksijom- 1 .....	13
1.4.	GLUT1, HIF-1 i PET/CT u najčešćim tipovima NSCLC-a .....	15
2.	CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	16
2.1.	Ciljevi istraživanja .....	17
2.1.	Hipoteze istraživanja .....	17
3.	METODE .....	18
3.1.	Organizacija istraživanja .....	19
3.2.	Ispitanici i uzorci .....	20
3.3.	Postupci .....	20
3.3.1.	Imunohistokemijski protokol .....	20
3.3.2.	Imunofluorescencija .....	21
3.3.3.	RNA izolacija i reverzna transkripcija .....	21
3.3.4.	qPCR .....	22
3.4.	Statistička analiza .....	23
4.	REZULTATI .....	24
4.1.	Kliničko-patološki parametri prema tipu NSCLC-a.....	25
4.2.	Usporedba kliničko-patoloških parametara sa SUVmax .....	25

4.3.	Izražaj GLUT1 proteina u NSCLC-u .....	27
4.4.	Izražaj HIF-1 $\alpha$ proteina u NSCLC-u.....	30
4.5.	<i>HIF-1A mRNA</i> u NSCLC-u.....	33
4.6.	Osjetljivost i specifičnost CT-a i PET/CT nalaza .....	34
5.	RASPRAVA .....	35
6.	ZAKLJUČCI .....	42
7.	SAŽETAK .....	44
8.	SUMMARY .....	46
9.	POPIS LITERATURE .....	48
10.	ŽIVOTOPIS .....	65



## **1. UVOD**

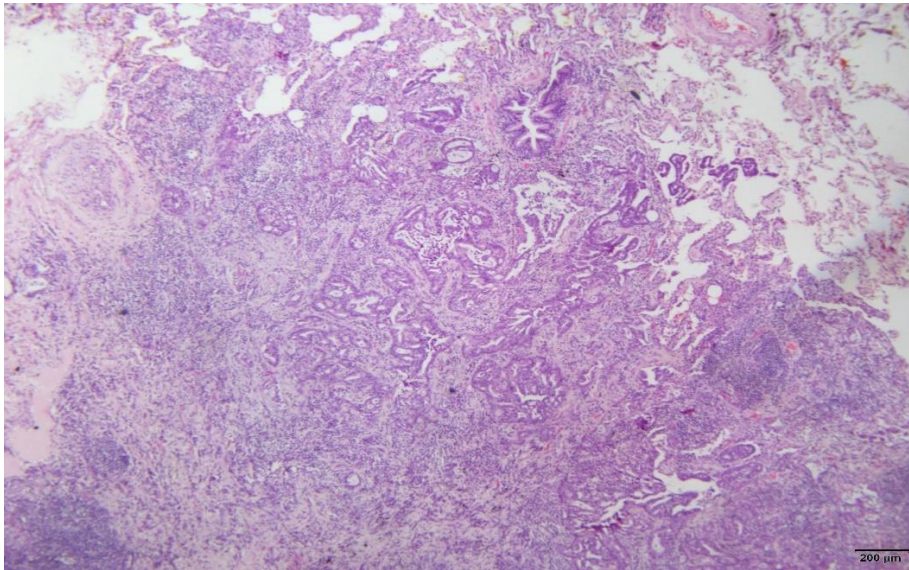
## 1.1. Karcinom pluća

Karcinom pluća jedna je od najčešćih zloćudnih bolesti s visokom smrtnošću. Tako je u 2022. godini bio prvi po učestalosti i vodeći uzrok smrti od zloćudnih tumora, a jednaka je procjena smrtnosti i za 2023. godinu [1, 2]. Glavni rizični čimbenici za razvoj karcinoma pluća su nasljedni čimbenici, izloženost ionizirajućem i ultraljubičastom zračenju, toksičnim tvarima kao što su duhanski dim (u 80 - 90% karcinoma pluća!), azbest, arsen i infekcije nekim mikroorganizmima [3-6]. U nastanku karcinoma pluća sudjeluju procesi genske i epigenetske alteracije koji dovode do oštećenja DNK. Posljedica je promjena normalnih stanica u transformirane i konačno zloćudne epitelne stanice koje proliferacijom mogu stvoriti preneoplastične lezije i konačno invazivni karcinom [7, 8].

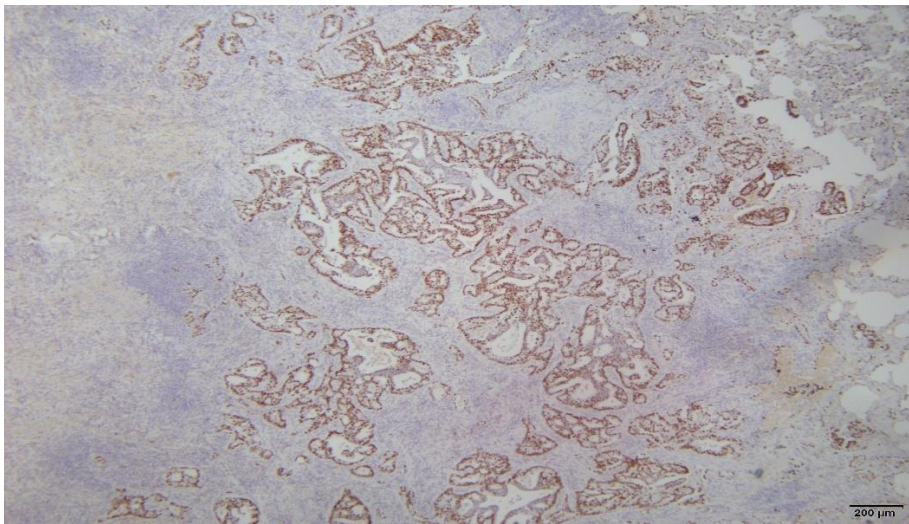
Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), u preneoplastične lezije bronhalnog epitela spadaju skvamozna displazija i karcinom in situ, atipična adenomatozna hiperplazija i difuzna idiopatska hiperplazija plućnih neuroendokrinih stanica. U dodatne moguće preneoplastične lezije ubrajaju se hiperplazija bazalnih stanica, skvamozna metaplazija, adenomatozna hiperplazija, angiogena skvamozna displazija i plućna fibroza [9, 10].

Tumori pluća se po podrijetlu dijele na epitelne tumore, neuroendokrine tumore, tumore ektopičnog tkiva u plućima, mezenhimalne tumore specifične za pluća i hematolimfoidne tumore. Po ponašanju, dijele se na dobroćudne i zloćudne tumore [11]. Najčešći od svih tumora pluća su karcinomi, koji se tradicionalno dijele na karcinom malih stanica (*engl. small cell lung cancer, SCLC*) (15%) i karcinom ne-malih stanica (*engl. non-small cell lung cancer, NSCLC*) (85%) [3, 12, 13]. U NSCLC spadaju: adenokarcinom, karcinom pločastih stanica, adenoskvamozni karcinom, karcinom velikih stanica i sarkomatoidni karcinom [14, 15]. Od svih tipova je najčešći adenokarcinom na kojeg otpada 50%, drugi je karcinom pločastih stanica s oko 40%, a na sve ostale tipove otpada 10% [16].

Adenokarcinom je obično smješten u perifernim dijelovima pluća, češći je u žena, bolesnika mlađih od 45 godina i nepušača. S druge strane, karcinom pločastih stanica je češći u starijih bolesnika i pušača, obično je smješten centralno, u glavnom ili lobarnom bronhu, a nastaje nakon metaplazije respiratornog u metaplastični i displastični pločasti epitel te neoplastične transformacije u atipične pločaste epitelne stanice [17, 18]. Histološki kriteriji za dijagnozu adenokarcinoma su nepravilne žljezdane formacije obložene atipičnim epitelom, pozitivni izražaj biljega TTF-1 i/ili Napsina A ili intracitoplazmatska sluz (Slika 1 i Slika 2) [19]. Dijagnoza adenokarcinoma u kliničkoj praksi uključuje imunohistokemijsku analizu PD-L1 statusa i molekularnu analizu vodećih mutacija gena *EGFR*, *ALK* i *ROS1*.

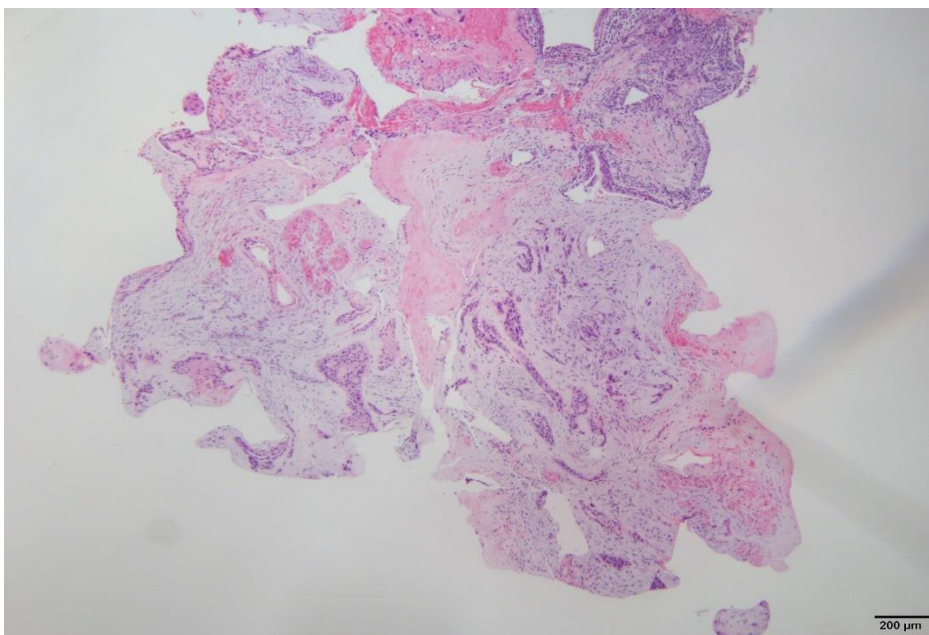


**Slika 1.** Adenokarcinom pluća u operativnom materijalu. (HE, povećanje 40x). Slika iz provedene studije.

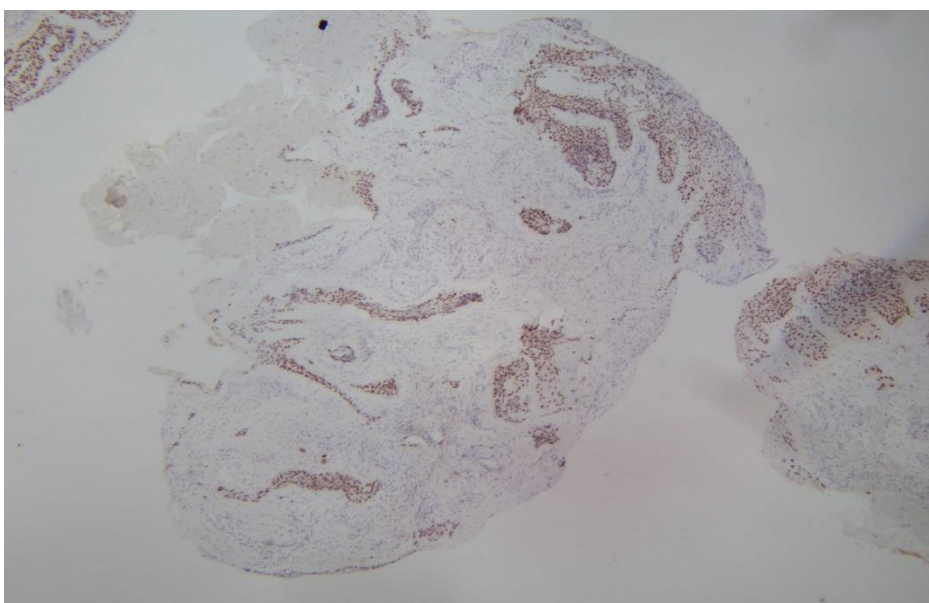


**Slika 2.** Imunohistokemijsko bojanje s TTF-1 u adenokarcinomu pluća pokazuje pozitivni nuklearni izražaj TTF-1 u zloćudnim stanicama (TTF-1/HRP, povećanje 40x). Slika iz provedene studije.

Histološka dijagnoza karcinoma pločastih stanica temelji se na prisutnosti dezmosoma i keratina u atipičnim epitelnim stanicama. Imunohistokemijski zloćudne stanice izražavaju p40, p63, CK5 ili desmoglein (Slika 3 i Slika 4) [20]. U kliničkoj praksi radi se imunohistokemijska analiza PD-L1 statusa kao prediktivnog čimbenika za imunoterapiju.



**Slika 3.** Karcinom pločastih stanica u bronhoskopskoj biopsiji. Nakupine atipičnih pločastih epitelnih stanica u dezmodoplastičnoj stromi (HE, povećanje 40x). Slika iz provedene studije.



**Slika 4.** Imunohistokemijsko bojanje s p40 u karcinomu pločastih stanica pokazuje pozitivni nuklearni izražaj p40 u zloćudnim stanicama (p40/HRP, povećanje 40x). Slika iz provedene studije.

Ako se na osnovu navedenih histoloških kriterija i karakterističnih imunobiljega NSCLC ne može specificirati, dijagnoza je NSCLC- NOS (*engl. not otherwise specified*).

### 1.1.2 Klinička slika i specifična obrada

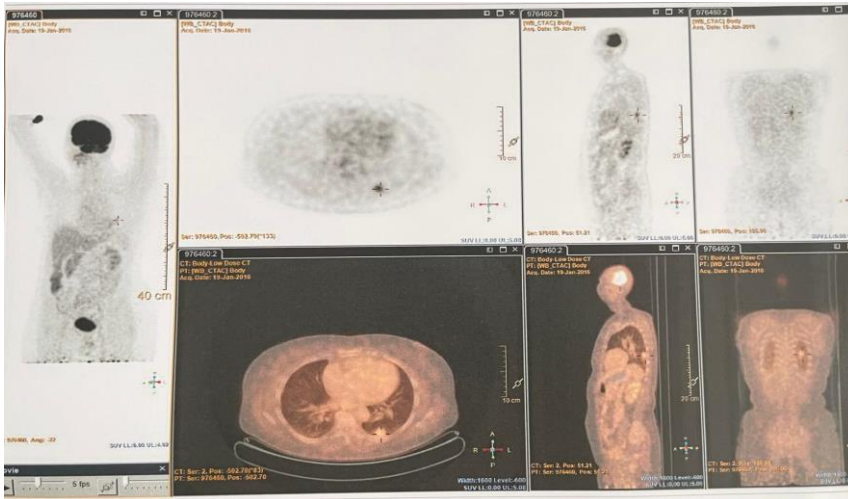
Najčešći simptomi karcinoma pluća su kašalj, dispneja, hemoptize te opći simptomi poput gubitka tjelesne mase [21]. Kašalj, hemoptiza, bol u prsima i dispneja ubrajaju se u intratorakalne kliničke manifestacije karcinoma pluća. Karcinom pločastih stanica može infiltracijom brahijalnog plexusa izazvati Pancoastov sindrom kojeg karakterizira bol u ramenu i lopatici ili nadlaktici, Hornerov sindrom (ptoza, mioza, enoftalmus), atrofija mišića ruke i razaranje kosti. Ekstratorakalne kliničke manifestacije karcinoma pluća često su posljedica koštanih metastaza koje imaju 20% bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze [22]. Ekstratorakalna, koji put prva, manifestacija karcinoma pluća su moždane metastaze, osobito u adenokarcinomu pluća, karakterizirane glavoboljom, povraćanjem, ispadima u vidnom polju, fokalnim neurološkim deficitom ili epileptičkim napadima [23]. Oboljeli od karcinoma pluća mogu imati simptome i znakove paraneoplastičnog sindroma. Štoviše, karcinom pluća je glavni uzrok više vrsta paraneoplastičnog sindroma, najčešće endokrinog tipa poput sindroma neprikladnog lučenja ADH, ACTH i humoralne hiperkalcemije [24]. Budući da su simptomi bolesti nespecifični, karcinom pluća se često dijagnosticira u uznapredovaloj fazi, čak u 50% bolesnika u IV stadiju bolesti [25, 26].

Kod kliničke sumnje na rak pluća, bolesniku treba uzeti detaljnu anamnezu i status, uraditi laboratorijske nalaze i sumacijsku rentgensku snimku torakalnih organa [27]. Ako su rezultati inicijalne obrade visoko suspektni, indicirana je kompjutorizirana tomografija (CT) prsišta i gornjeg dijela abdomena. Mala (trans) bronhalna ili transtorakalna biospija, a koji put biospija dostupnog metastatskog limfnog čvora ili drugog metastatskog sjajela, omogućuju patohistološku dijagnozu karcinoma pluća s prediktivnim biljezima. Ako na temelju slikovnih pretraga postoji sumnja na metastaze u mediastinalne limfne čvorove, bioptički uzorci mogu se dobiti pomoću endoskopskog ultrazvuka (engl. *endoscopic ultrasound, EUS*) ili endobronhalnog ultrazvuka (engl. *endobronchial ultrasound, EBUS*). U slučaju negativnog nalaza, može se uraditi videomedijastinoskopija [28, 29]. Za određivanje proširenosti bolesti koristan je pregled PET/CT-om s uporabom fluoro-2-deoksi-D-glukoze (FDG) [19, 30, 31].

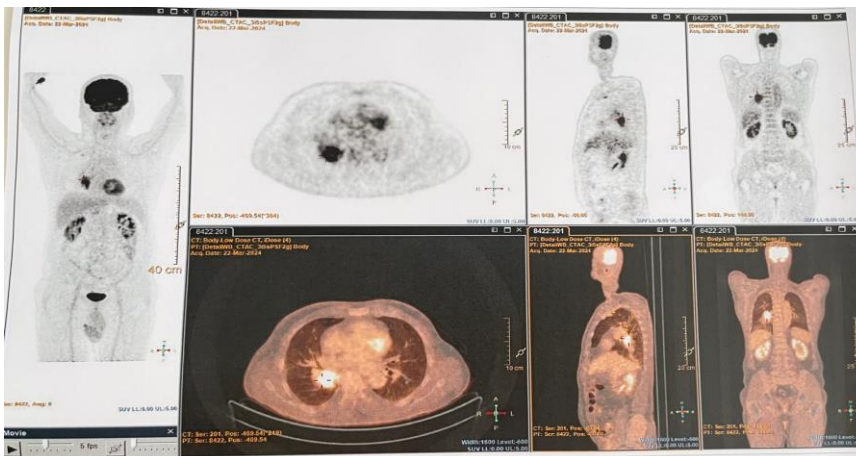
### 1.1.3 PET/CT s uporabom FDG-a

PET/CT (pozitronska emisijska tomografija) je suvremena metoda za otkrivanje metaboličke aktivnosti tkiva koje absorbira radioaktivnu glukozu. Sinhronom uporabom uređaja koji mjeri intenzitet resporpcije FDG i tomografije koja slojevitim rentgenskim simanjem i njihovom računalnom sintezom daje sliku cijelog tijela i organa, mogu se točno

locirati metabolički aktivna žarišta u anatomski prikazanom ljudskom tijelu i organima. Osim toga koristi se za procjenu proširenosti bolesti u zloćudnim tumorima te u srčanim i neurološkim bolestima. U dijagnostici raka pluća važna je kod procjene operabilnosti karcinoma, statusa lokalnih limfnih čvorova i stadija bolesti, ali se nažalost u nas neredovno koristi jer je skupa i nije lako dostupna (Slika 5 i Slika 6).



**Slika 5.** Nalaz PET/CT-a kod ispitanice s histološki dokazanim adenokarcinomom donjeg lijevog plućnog režnja: patološki metabolizam FDG-a (SUVmax = 4.5) u nodnoj promjeni posterobazalno u donjem lijevom plućnom režnju. Slika iz provedene studije.



**Slika 6.** Nalaz PET/CT-a kod ispitanika s histološki dokazanim planocelularnim karcinomom donjeg desnog plućnog režnja i metastazom u limfni čvor uz bronh: patološki metabolizam FDG-a (SUVmax = 14.1) u spikuliranom procesu apikalnog segmenta donjeg desnog plućnog režnja uz fokalno nakupljanje FDG-a (SUVmax = 5) u limfnom čvoru desnog hilusa. Slika iz provedene studije.

### 1.1.4 TNM, stadij bolesti i odluka o terapiji

Na temelju navedenih pretraga dijagnosticirani karcinom pluća treba klasicifirati po TNM-u (Tablica 1) i utvrditi stadij bolesti jer je važan za odabir liječenja i utječe na prognozu (Tablica 2) [30, 31]. Tri su simultana koraka u dijagnostičkoj evaluaciji uzimanje bioptičkog uzorka, utvrđivanje stadija i funkcionalna evaluacija. Za dijagnostičku evaluaciju i odluku o terapiji odgovoran je multidisciplinarni tim za rak pluća [21].

**Tablica 1.** TNM klasifikacija karcinoma pluća (8. izdanje)

T <sub>x</sub>	Tumor dokazan citološkim pregledom sputuma ili BAL-om, ali se ne može utvrditi radiološkom obradom ili bronhoskopijom.
T <sub>0</sub>	Nema dokaza o tumoru.
T <sub>is</sub>	Karcinom in situ.
T1	Tumor ≤3 cm koji je okružen parenhimom pluća/visceralnom pleurom, ne zahvaća glavni bronh.
T1 <sub>a(mi)</sub>	Minimalno invazivni karcinom.
T1 <sub>a</sub>	≤1 cm.
T1 <sub>b</sub>	>1 do ≤2 cm.
T1 <sub>c</sub>	>2 do ≤3 cm.
T2	Tumor >3 cm- ≤5 cm; ili tumor s nekom od sljedećih karakteristika: zahvaća glavni bronh bez obzira na udaljenost od karine, ali ne zahvaća karinu; zahvaća visceralnu pleuru; uzrokuje atelektazu ili postopstruktivni pneumonitis koji se širi do hilarne regije.
T2 <sub>a</sub>	>3 do ≤4 cm.
T2 <sub>b</sub>	>4 do ≤5 cm.
T3	Tumor veličine: >5 cm - ≤7 cm ili tumor bilo koje veličine, ali koji zahvaća neku od sljedećih struktura: prsnu stijenku, perikard, frenički živac ili postoje pojedinačni tumorski čvor(ovi) u istom režnju kao i primarni.
T4	Tumor veći od 7 cm ili tumor bilo koje veličine, ali koji zahvaća neku od sljedećih struktura: medijastinum, ošit, srce, velike krvne žile, rekurentni laringealni živac, karinu, traheju, jednjak, kralježnicu ili postoje pojedinačni tumorski čvor(ovi) u drugom istostranom režnju u odnosu na primarni.
N <sub>1</sub>	Metastaze u istostranim peribronhalnim i/ili istostranim hilarnim limfnim čvorovima i intrapulmonalnim čvorovima.
N <sub>2</sub>	Metastaze u istostranim medijastinalnim i/ili subkarinalnim limfnim čvorovima.
N <sub>3</sub>	Metastaze u kontralateralnim medijastinalnim ili hilarnim limfnim čvorovima; istostranim/kontralateralnim skalenskim/ supraklavikularnim čvorovima.

M1	Prisutne udaljene metastaze.
M <sub>1a</sub>	Pojedinačni tumorski čvor(ovi) u kontralateralnom režnju; tumor s pleuralnim ili perikardnim čvorićima; maligni pleuralni ili perikardni izljev.
M <sub>1b</sub>	Jedna ekstratorakalna metastaza uključujući i neregionalni limfni čvor.
M <sub>1c</sub>	Multiple ekstratorakalne metastaze u jednom ili više organa.

**Tablica 2.** Stadiji karcinoma pluća

Okultni karcinom	( T <sub>x</sub> N0M0 )
Stadij 0	( T <sub>is</sub> N0M0 )
Stadij IA1	( T <sub>1a</sub> N0M0 ) ( T <sub>1(mi)</sub> N0M0 )
Stadij IA2	( T <sub>1b</sub> N0M0 )
Stadij IA3	( T <sub>1c</sub> N0M0 )
Stadij IB	( T <sub>2a</sub> N0M0 )
Stadij IIA	( T <sub>2b</sub> N0M0 )
Stadij IIB	( T (1-2) N1M0 ) ( T <sub>3</sub> N0M0 )
Stadij IIIA	( T (1-2) N2M0 ) ( T <sub>3</sub> N1M0 ) ( T <sub>4</sub> N (0-1) M0 )
Stadij IIIB	( T (1-2) N3M0 ) ( T (3-4) N2M0 )
Stadij IIIC	( T (3-4) N3M0 )
Stadij IVA	( bilo koji T i bilo koji N, M <sub>1a, b</sub> )
Stadij IVB	( bilo koji T i bilo koji N, M <sub>1c</sub> )

Liječenje bolesnika ovisi o tipu karcinoma pluća, općem stanju bolesnika, stadiju bolesti i prediktivnim biljezima. Modaliteti liječenja su: operacija, radioterapija, kemoterapija, imunoterapija ili ciljana terapija (Tablica 3) [34, 35].

**Tablica 3.** Liječenje NSCLC-a prema stadiju bolesti

STADIJ	MODALITET LIJEČENJA
Okultni NSCLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kirurško liječenje</li> </ul>
Stadij 0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kirurško liječenje</li> <li>• endobronhalna terapija: elektrokauter, terapija laserom, krioterapija</li> </ul>
Stadij IA, IB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kirurško liječenje</li> <li>• radioterapija (ako je operacija kontraindicirana)</li> <li>• 4 ciklusa adjuvantne kemoterapije temeljene na platini</li> <li>• adjuvantna ciljana terapija (osimertinibom) adenocarcinoma s mutacijom EGFR (egzon 19 delecija ili mutacija egzona 21 L858R)</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• adjuvantna imunoterapija pembrolizumabom u bolesnika u stadiju IB s tumorom &gt;4 cm</li> </ul>
Stadij IIA, IIB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kirurško liječenje</li> <li>• kirurško liječenje uz neoadjuvantnu kemoterapiju ili neoadjuvantnu imunoterapiju (nivolumab, pembrolizumab, durvalumab) uz kemoterapiju temeljenu na platini</li> <li>• radioterapija (ako je operacija kontraindicirana)</li> <li>• adjuvantna radioterapija</li> <li>• adjuvantna kemoterapija</li> <li>• adjuvantna ciljana terapija osimertinibom adenocarcinoma s mutacijom EGFR (egzon 19 delecija ili mutacija egzona 21 L858R)</li> <li>• adjuvantna imunoterapija pembrolizumabom ili atezolizumabom u bolesnika s tumorom &gt; 4 cm</li> </ul>
Stadij IIIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• operabilna bolest: kirurško liječenje uz neoadjuvantnu (kemoterapija, kemoradioterapija, imunoterapija uz kemoterapiju) ili adjuvantnu terapiju (kemoterapija, kemoradioterapija, radioterapija, ciljana terapija u carcinoma s EGFR mutacijom, imunoterapija)</li> <li>• neoperabilna bolest: kemoradioterapija, radioterapija, konsolidacijska terapija durvalumabom nakon kemoradioterapije)</li> <li>• tumor gornjeg sulkusa: kirurško liječenje, radioterapija, neoadjuvantna kemoradioterapija</li> <li>• tumor koji invadira stijenku prsišta: kirurško liječenje, radioterapija, kirurško liječenje uz radioterapiju, kombinacije kirurškog liječenja, kemoterapije i radioterapije</li> </ul>
Stadij IIIB, IIIC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sekvencijska ili istovremena kemoterapija i radioterapija</li> <li>• radioterapija</li> <li>• sistemska konsolidacijska terapija durvalumabom prije ili nakon istovremene kemoterapije i radioterapije</li> </ul>
Stadij IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• liječenje ovisi o histološkom podtipu, molekularnom profilu karcinoma i biljezima</li> <li>• kemoterapija</li> <li>• kemoterapija u kombinaciji s imunoterapijom (pembrolizumab, cemiplimab-rwlc, durvalumab+tremelimumab, atezolizumab)</li> <li>• kemoterapija u kombinaciji s monoklonskim protutijelom (bevacizumab, cetuximab, necitumumab)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• imunoterapija u monoterapiji (pembrolizumab, cemiplimab-rwlc, atezolizumab, nivolumab+ipilimumab)</li> <li>• atezolizumab+bevacizumab+kemoterapija</li> <li>• terapija održavanja</li> <li>• ciljana terapija karcinoma s pozitivnim vodećim mutacijama (npr. <i>EGFR, ALK, ROS1, RET, BRAF</i>)</li> </ul>
--	--

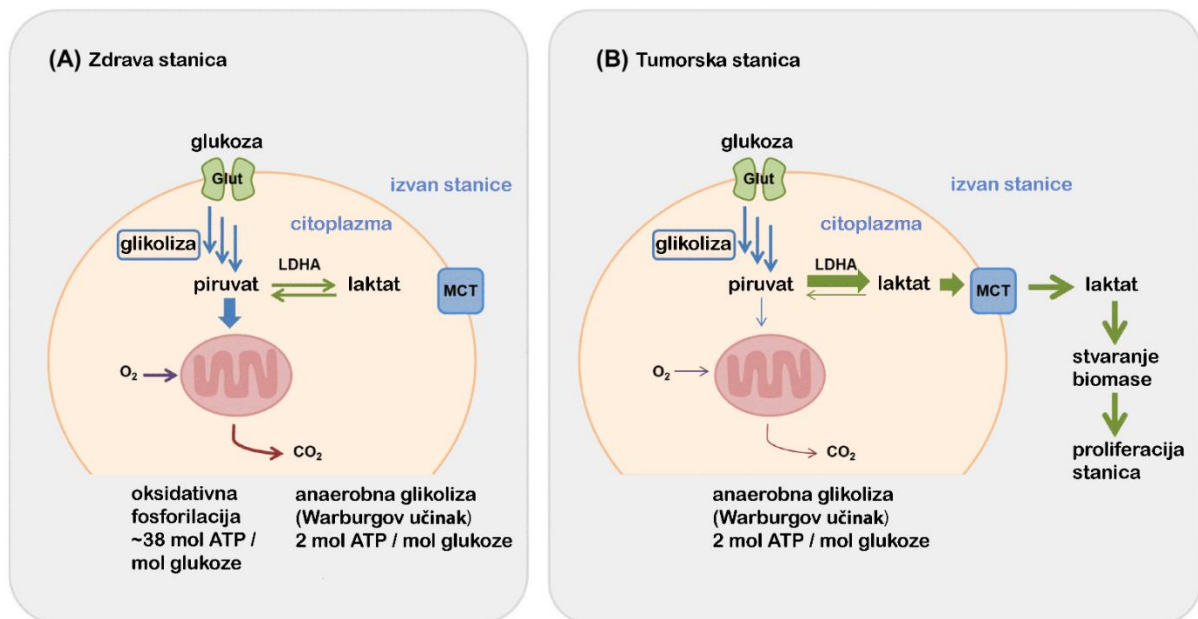
Iako liječenje često uključuje kombinaciju raznih terapijskih modaliteta, opće preživljenje većine bolesnika s karcinomom pluća i dalje je poražavajuće kratko. U Republici Hrvatskoj se radi poboljšanja preživljenja od raka pluća od 2020. godine provodi Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća [36]. Prema važećim preporukama, u aktivni program probira uključene su osobe od 50 do 75 godina, koje su aktivni pušači ili su prestali pušiti unutar 15 godina prije probira uz pušački staž od minimalno 30 godina, a bez obzira na komorbiditete i druge demografske ili anamnestičke osobitosti. Osobe, za koje liječnik obiteljske medicine utvrdi da ispunjavaju navedene kriterije, upućuju se na pretragu CT-om niske doze zračenja (*engl. low dose computed tomography, LDCT*) u cilju ranog otkrivanja raka pluća dok je još operabilan

## 1.2. Prijenosnici glukoze i metabolizam glukoze u NSCLC-u

Početkom 20. stoljeća je Otto Warburg opisao fenomen prema kojem zloćudne stanice pri dovoljnoj koncentraciji kisika preferiraju glikolizu kao glavni put stvaranja ATP-a [37, 38]. Iako tzv. Warburgov efekt, odnosno aerobna glikoliza, nije ni izdaleka učinkovita kao oksidativna fosforilacija u stvaranju ATP-a, zloćudne stanice ipak zbog velike proliferacije preusmjeravaju metabolizam na glikolizu. Promjene u metabolizmu zloćudnih stanica (tzv. metaboličko reprogramiranje) su bitne za njihovo preživljenje, rast i umnažanje. Dakle, aerobna glikoliza nije pasivni odgovor na oštećenje mitohondrija već temeljni poremećaj metabolizma tumorske stanice koji joj olakšava preživljenje i zakiseljuje tumorski mikrookoliš, čime doprinosi rezistenciji na lijekove [39- 42]. Normalne stanice za proizvodnju energije metaboliziraju glukozu preko oksidativne fosforilacije, a samo u anaerobnim uvjetima pomoću glikolize [37, 38].

Glavna uloga prijenosnika glukoze (*enlg. glucose transporter, GLUT*) je omogućiti stalnu dostupnost glukoze stanicama kontroliranjem prijenosa glukoze između intracelularnog

i ekstracelularnog odjeljka. Jasno je da GLUT posreduje u Warburgovom fenomenu (Slika 7) [43].



**Slika 7.** Warburgov fenomen u zdravoj stanici (A) i tumorskoj stanici (B) (preuzeto iz Kim SH, Baek KH. Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. Int J Mol Sci. 2021 Jun 8;22(12):6173).

GLUT ima 14 izoformi svrstanih u tri skupine [44]. U prvoj skupini su GLUT 1 do 4 i GLUT 14, u drugoj GLUT 5, 7, 9 i 11, a u trećoj GLUT 6, 8 10, 12 i 13 [45]. Navedene izoforme su različito raspoređene u tkivima i uglavnom stanično specifične. Osim toga, imaju različit afinitet prema glukozi i prema drugim heksozama, fruktozi i galaktozi [44].

GLUT1 je transmembranski protein kojeg kodira gen *SCL2A1*. Izražen je u eritrocitima, posteljici i endotelu te regulira prijenos glukoze preko krvno-moždane barijere. U usporedbi s drugim prijenosnicima glukoze, GLUT1 ima veliki afinitet za glukozu i bitan je tkivima kojima je glukoza glavni izvor energije [46, 47, 48]. Osim glukoze, GLUT1 prenosi FDG koja se rabi u dijagnostičkoj pretrazi PET/CT-u za otkrivanje metabolički aktivnih lezija [49, 50, 51]. Imunohistokemijski je utvrđeno da je GLUT1 pojačano izražen u tumorskim stanicama zloćudnih tumora kao što su difuzni B-velikostanični limfom, kolorektalni karcinom, karcinomi glave i vrata, sarkomi, karcinom gušterače i karcinom pluća [47, 52-58]. Međutim, rezultati objavljenih studija o povezanosti izražaja GLUT1 sa stupnjem diferencijacije tumora, stadijem bolesti i ishodom nisu jednoznačni [47, 59, 60].

Najčešći tipovi NSCLC-a, adenokarcinom i karcinom pločastih stanica, razlikuju se po histološkim obilježjima, genskim promjenama i tipičnoj kliničkoj prezentaciji. Međutim, njihove metaboličke karakteristike nisu sasvim jasne. Rezultati objavljenih studija govore u prilog tome da se i metabolički razlikuju, što možda doprinosi njihovoj prognozi [61, 62, 63]. Karcinom pločastih stanica ima manji broj krvnih žila i slabiju prokrvljenost, što uzrokuje hipoksiju i povećanu metaboličku potrebu za glukozom. Prema objavljenim radovima, njegov se metabolizam temelji na glikolizi, a kod adenokarcinoma na oksidativnoj fosforilaciji [60, 64]. Dakle, karcinom pločastih stanica je karakteriziran anaerobnim, hipoksičnim metabolizmom čije su karakteristike slaba vaskularizacija, ekstenzivna nekroza, visoka koncentracija laktata i povećani izražaj GLUT1. Adenokarcinom pluća je karakteriziran dobrom vaskularizacijom i aerobnim metabolizmom [65]. Schuurbijs i suradnici smatraju da je veći izražaj GLUT1 u karcinomu pluća pločastih stanica posljedica ishemijske i hipoksijske tumorskog tkiva [60]. Izražaj GLUT1 u adenokarcinomu pluća je slabiji jer je metabolizam tumorskog tkiva neovisan o metabolizmu glukoze [63]. Kritično oslanjanje na glikolizu čini stanice karcinoma pluća pločastih stanica osjetljivijima od stanica adenokarcinoma na inhibiciju glikolize [63]. Osim razlike u izražaju, utvrđena je razlika u lokalizaciji GLUT1 u dva najčešća tipa NSCLC-a. Tako je u adenokarcinomu GLUT1 izražen u citoplazmi i na membrani tumorskih stanica, a u karcinomu pluća pločastih stanica samo na membrani, čime je unos glukoze u stanice olakšan [63].

PET/CT s FDG-om je funkcionalna slikovna pretraga kojom dobivamo informacije o tkivnom metabolizmu glukoze. Mjera nakupljanja FDG-a je tzv. maksimalna standardizirana vrijednost nakupljanja (*engl. maximum standardized uptake value, SUVmax*) [66, 67]. Unutarstanična koncentracija FDG-a je izravno povezana s ulaskom glukoze u stanicu preko prijenosnika glukoze. Unos glukoze je u tumorskim stanicama obično povećan pa se navedenom pretragom može vizualizirati i mjeriti pojačano nakupljanje FDG-a u tumorskom tkivu [49, 50, 51]. U ljudi je pojačani izražaj GLUT1 povezan s nakupljanjem FDG-a u tumorskim stanicama. Heksokinaza, enzim odgovoran za fosforilaciju glukoze, ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze u zloćudnim stanicama [68, 69].

Rezultati studija o odnosu između nakupljanja FDG-a i izražaja GLUT1 u karcinomu pluća, osobito u NSCLC-u, većinom ukazuju na pozitivnu povezanost [68]. Koh i suradnici su pozitivnu povezanost našli samo u adenokarcinomu pluća [70]. S druge strane, Goodwin i suradnici su u karcinomu pločastih stanica utvrdili da je povećani izražaj GLUT1 značajno povezan s povećanim nakupljanjem FDG-a u tumoru i lošom prognozom [63]. Većina

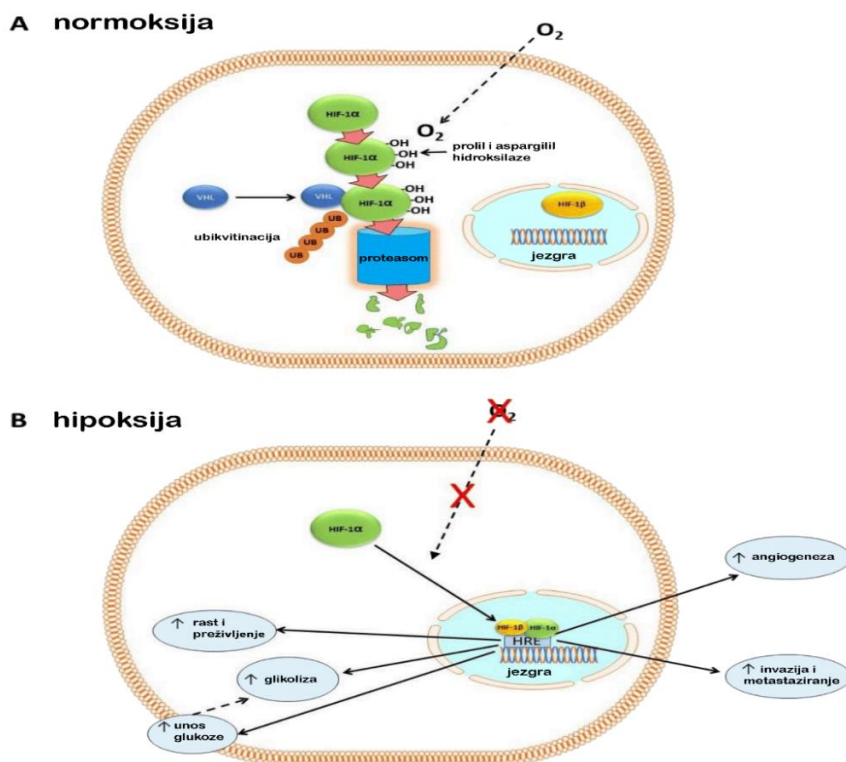
istraživača smatra da je nakupljanje FDG-a određeno prisutnošću GLUT1, hipoksijom te angiogenezom [71, 72].

Iako su objavljene brojne studije o vrijednosti SUVmax kao mogućeg prognostičkog čimbenika u karcinomu pluća, rezultati nisu jednoznačni [73, 74]. Izgleda da vrijednost SUVmax može biti prognostički čimbenik, ali ovisno o stadiju bolesti [74, 75].

Važno je istaknuti da se nakupljanje FDG-a koji put vidi u dobroćudnim tumorima. Uzrok nije jaki izražaj GLUT1 nego pojačana vaskularizacija i propusnost krvnih žila. Može se stoga reći da PET/CT s FDG-om ima relativno nisku specifičnost pa je lažno pozitivni nalaz jedan od problema pri određivanju kliničkog stadija tom metodom, posebice stadija limfnih čvorova [76, 77, 78].

### **1.3. Čimbenik induciran hipoksijom- 1**

Hipoksija je obilježje tumorskog mikrokoliša u većini solidnih tumora i povezana je s lošijom prognozom [79, 80]. Normalno se u hipoksičnim uvjetima proliferacija zdravih stanica smanjuje. Međutim, mutacijama izazvane genske promjene u kombinaciji s vrlo dinamičnim metaboličkim reprogramiranjem omogućuju zloćudnim stanicama proliferaciju i u hipoksiji [81]. Štoviše, eksperimentalne i kliničke studije pokazuju da hipoksija pozitivno utječe na tumorsku progresiju jer stimulira agresivnost, metastatski potencijal i rezistenciju na terapiju [82]. Čimbenik induciran hipoksijom 1 (*engl. hypoxia inducible factor 1, HIF-1*) regulira brojne gene za preživljenje stanica u hipoksičnim uvjetima [83]. U tumoru, zbog mutacije ili aberantnog izražaja gena u zloćudnoj stanici, HIF-1 djeluje i u uvjetima normoksije [84]. HIF-1 sudjeluje u Warburgovom fenomenu preko indukcije aerobne glikolize i supresije rada mitohodrija [85]. Prvi korak u glikolizi je unos glukoze u stanice, u čemu sudjeluje 12 glukoznih prijenosnika (GLUT 1-12), a HIF-1 potiče njihov izražaj [86]. Genske promjene u zloćudnim stanicama i hipoksični uvjeti induciraju izražaj GLUT1 ovisan o HIF-1-u, povećavaju stanični unos glukoze i podržavaju aerobnu glikolizu u zloćudnim stanicama. Osim glukoznih prijenosnika, u hipoksičnim uvjetima HIF-1 inducira izražaj glikolitičkih enzima [87]. Utvrđeno je da u tumorigenezi HIF-1 regulira angiogenezu, proliferaciju i metabolizam stanica, metastaziranje, diferencijaciju i odgovor na radioterapiju (Slika 8) [88- 90].



**Slika 8.** Djelovanje HIF-1 $\alpha$  u uvjetima normoksije i hipoksije (preuzeto iz Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*. 2021 Sep 9;10(9):2371.)

Prejaki izražaj HIF-1 je povezan sa slabijom diferencijacijom tumora, višim stadijem bolesti i nepovoljnim ishodom, odnosno kraćim vremenom do povrata bolesti (*engl. disease-free survival, DFS*) i kraćim ukupnim preživljenjem (*engl. overall survival, OS*) [91, 92].

Kao protein, HIF-1 je heterodimer sastavljen od tri  $\alpha$  podjedinice (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$ ) i jedne  $\beta$  podjedinice [93]. Od tri  $\alpha$  podjedinice, izoforma HIF-1 $\alpha$  je u sisavaca najviše istražena [94]. Za razliku od konstitutivne HIF- $\beta$  podjedinica koja ima stabilnu koncentraciju, HIF-1 $\alpha$  ovisi o koncentraciji kisika. U normoksemičnim uvjetima je u raznim ljudskim tkivima razina HIF-1 $\alpha$  niska čak i kada je HIF-1 prejako izražen. Naime, HIF-1 $\alpha$  se degradira u uvjetima normoksije i aktivira u hipoksičnim uvjetima [93, 95]. Stoga je HIF-1 $\alpha$  glavna regulatorna podjedinica aktivnosti HIF-1. Manje je važan HIF- $\beta$  čiji se mRNA i proten održavaju na stalnoj razini. Mehanizmi koji reguliraju stabilnost i transaktivirajuću aktivnost HIF-1 $\alpha$  imaju najveći utjecaj na aktivnost HIF-1 [96].

Pojačani izražaj HIF-1 $\alpha$  nađen je u tumorskim stanicama karcinoma debelog crijeva, bubrega, gušterače, jednjaka, endometrija, prostate, dojke, želuca i pluća [97- 100]. Izražaj HIF-

1 $\alpha$  se razlikuje između tipova NSCLC-a što je moguće važno u daljnjem upoznavanju njihove biologije i stvaranju novih terapijskih mogućnosti [101]. Prema nekim autorima, HIF-1 $\alpha$  je prognostički čimbenik u karcinomu pluća, povezan s agresivnošću tumora i rezistencijom na kemoterapiju [102- 104]. Povećani izražaj HIF-1 $\alpha$  u karcinomu pluća povezan je s lošijim stanjem bolesnika prema ECOG ljestvici (*engl. Eastern Cooperative Oncology Group*), s većim metastatskim potencijalom tumora i kraćim ukupnim preživljenjem [105].

Dosad objavljene studije o povezanosti izražaja HIF-1 $\alpha$  s nakupljanjem FDG-a u tumoru nisu dale jednoznačne rezultate [106].

#### **1.4. GLUT1, HIF-1 i PET/CT u najčešćim tipovima NSCLC**

Procjena za 2023. godinu po kojoj je karcinom pluća vodeći uzrok smrti od zloćudnih tumora ukazuje na trajni značaj tog globalnog zdravstvenog problema. U NSCLC-u na prognozu bolesti uz ostale čimbenike utječu tip karcinoma i hipoksija kao značajno obilježje tumorskog mikrokoliša. U dostupnoj literaturi nismo našli istraživanje u kojem bi se u adenokarcinomu i karcinomu pločastih stanica na operativnom materijalu istraživao metabolizam glukoze na način da se analizira izražaj GLUT1, HIF-1 $\alpha$  i *HIF1A mRNA* u primarnom tumoru i GLUT1 u lokalnom metastatskom limfnom čvoru te usporede međusobno i s preoperativnom vrijednošću SUVmax tumora, patološkim stadijem i mjerama ishoda.

## **2.CILJEVI I HIPOTEZE**



## **2.1. Ciljevi istraživanja**

1. Imunohistokemijski analizirati izražaj GLUT1 i HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru i izražaj GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru i usporediti prema ispitivanim tipovima NSCLC-a.
2. Metodom qPCR kvantificirati *HIF1A mRNA* u primarnom tumoru i utvrditi postoji li razlika između ispitivanih tipova NSCLC-a.
3. Izražaj GLUT1 i HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru usporediti s preoperativnom vrijednošću SUVmax u tumoru i svim praćenim kliničkim i patološkim pokazateljima.

## **2.2. Hipoteze istraživanja**

Adenokarcinom i karcinom pluća pločastih stanica imaju različit metabolizam glukoze, što se očituje u razlici u izražaju GLUT1, HIF-1 $\alpha$  i *HIF1A mRNA* u primarnom tumoru i izražaju GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru.

Izražaj GLUT1 i HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru povezani su s preoperativnom vrijednošću SUVmax tumora i s patološkim stadijem bolesti.

### **3. METODE**

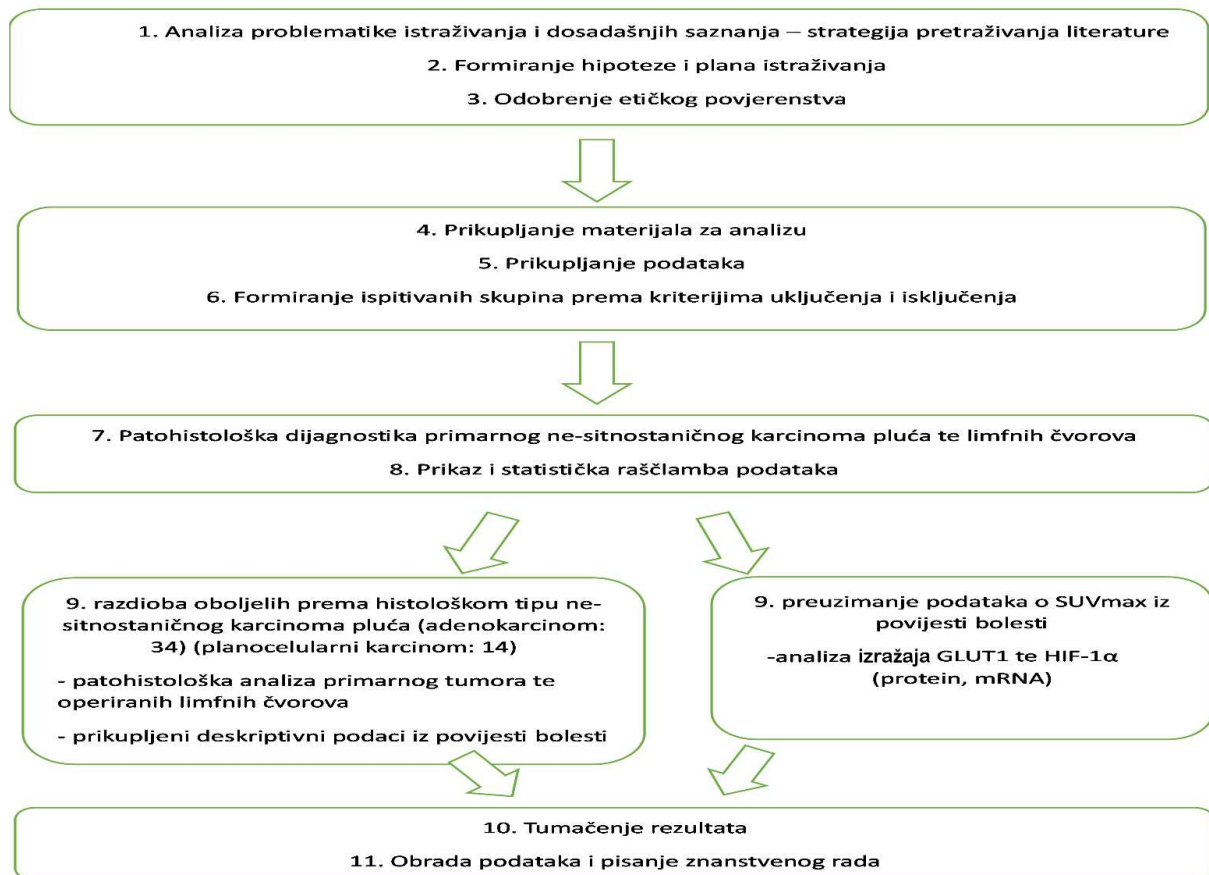
### 3.1. Organizacija istraživanja

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split, u Klinici za plućne bolesti KBC-a Split i u Laboratoriju poslijediplomskog doktorskog studija "Biologija novotvorina" pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Voditeljica istraživanja je doc. dr. sc. Sandra Zekić Tomaš, dr. med. U istraživanju sudjeluju pristupnica, Ante Strikić, dr. med., dr. sc. Marin Ogorevc, dr. med., Nela Kelam, mag. educ. biol. et chem., Martina Vukoja, dr. med. i Ivo Dilber, dr. med.

S obzirom na namjenu, istraživanje je primjenjeno, prema specifičnom ustroju presječeno, a prema načinu dobivanja podataka opservacijsko. Hodogram istraživanja je prikazan na Slici 9.

#### HODOGRAM ISTRAŽIVANJA

##### Uloga GLUT1 i HIF-1 $\alpha$ u metabolizmu karcinoma pluća.



Slika 9. Hodogram istraživanja.

Istraživanje je provedeno u skladu sa svim važećim i primjenjivim svjetskim smjernicama i preporukama. Dobiveni podaci koristili su se isključivo u istraživačke svrhe i bez navođenja osobnih podataka o bolesnicima. Podaci uneseni u računalni sustav bili su na

raspolaganju isključivo članovima istraživačkog tima i članovima Etičkog povjerenstva KBC Split koje je odobrilo istraživanje (2181-147/01/06/M.S.-22-02).

### **3.2. Ispitanici i uzorci**

U studiju je uključeno 48 ispitanika s NSCLC-om operiranih na Zavodu za torakalnu kirurgiju Klinike za kirurgiju u KBC-u Split od 1. veljače 2013. do 31. svibnja 2018. godine. Uključeni su ispitanici kojima je urađena parcijalna ili totalna lobektomija s medijastinalnom limfadenektomijom, imali su preoperacijski nalaz PET/CT-a i potpunu medicinsku dokumentaciju te dostupan parafinski blok tumorskog tkiva i metastatskog limfnog čvora. Iz studije su isključeni ispitanici s drugim rakom pluća, koji nisu imali dostupan parafinski blok tumorskog tkiva ni preoperativni PET/CT ili su primali neoadjuvantnu terapiju.

Klinički podaci su prikupljeni iz arhive Klinike za plućne bolesti KBC-a Split (dob, spol, datum operacije, veličina primarnog tumora, status limfnih čvorova i vrijednosti SUVmax). Iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split su prikupljeni patohistološki nalazi i parafinski blokovi tumorskog tkiva i lokalnog limfnog čvora. Histološki preparati su revidirani od strane dva patologa, a patološki stadij bolesti određen prema SZO klasifikaciji tumora iz 2021. godine [107].

Posljednji dan kliničkog praćenja bio je 1. siječnja 2019. godine. Praćenje je trajalo 71 mjesec, prosjek 36 mjeseci, a medijan 34 mjeseca. Opće preživljenje je izračunato od datuma dijagnoze do datuma smrti od bilo kojeg uzroka ili na posljednji dan praćenja, kad je status bolesnika cenzoriran kao "živ" ili "mrtav".

### **3.3. Postupci**

#### **3.3.1. Imunohistokemijski protokol**

Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i limfnog čvora su izrezani preparati debljine 3  $\mu\text{m}$  na mikrotomu, montirani na predmetnice (Thermoscientific, Germany) i strojno obojani u automatskom bojaču (Ventana UltraBenchmark, Ventana Roche, Tucson, Arizona, USA). Rabljeno je primarno monoklonalno mišje protutijelo GLUT1 klon SPM498, (Novus Biologicals, Abingdon, UK) i vizualizacijski kit Ultra View Universal DAB detection kit (Ventana, Tucson, Arizona, USA). Pozitivna reakcija bila je smeđe citoplazmatsko i/ili membransko obojenje, a vanjska pozitivna kontrola trofoblast posteljice.

Imunohistokemijski izražaj GLUT1 je određen HSCORE metodom prema formuli  $\text{HSCORE} = \sum P_i (i+1)$ , gdje je  $i$ =intenzitet obojenja određen kao 1 (slab), 2 (umjeren) i 3 (jak),

a Pi je postotak obojenja stanica karcinoma pluća za svaki intenzitet. Za svaki uzorak je izabrano 10 vidnih polja velikog povećanja (VPVP). HSCORE je određen u svakom analiziranom polju, a konačni HSCORE za svaki uzorak bio je aritmetička sredina njihove sume.

### **3.3.2. Imunofluorescencija**

Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i metastatskog limfnog čvora su izrezani preparati debljine 3  $\mu\text{m}$  na mikrotomu i montirani na predmetnice (Thermoscientific, Germany). Deparafinirani su u ksilenu i rehidrirani u otopinama etanola padajućih koncentracija do destilirane vode. Otvaranje antigena urađeno je kuhanjem u natrij citratnom puferu (pH 6,0) na pari 30 min. Nakon 5 minuta ispiranja u fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS), primijenjen je blokirajući serum (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) kroz 30 min. Potom je aplicirano protutijelo na HIF-1 $\alpha$  (mišje monoklonalno protutijelo, sc-13515, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, SAD) razrijeđeno 1:50 i ostavljeno preko noći poklopljeno u hladnjaku. Nakon dvostrukog ispiranja PBS-om, aplicirano je Alexa Fluor®488 AffiniPure protu-mišje protutijelo (715-545-150, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD) u razrjeđenju 1:300 jedan sat u vlažnoj komori. Nakon tri ispiranja u PBS-u, apliciran je DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) u trajanju 2 minute. Stakalca su potom isprana destiliranom vodom, osušena na zraku i prekrivena pokrovnica uz pomoć medija za uklapanje (ImmuMount, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Izostavljanje primarnog protutijela iz postupka bojenja je poslužilo kao kontrola specifičnosti bojenja.

Uzorci su pregledani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX61, Tokio, Japan) i fotografirani digitalnim fotoaparatom (Nikon Ri-D2, Nikon, Tokio, Japan) s verzijom softvera NIS-Elements F 3.0 (Nikon, Tokio, Japan). Kako bismo kvantificirali bojenje HIF-1 $\alpha$ , analizirali smo 5 tehničkih replikata po uzorku. Za svaki replikat, izbrojali smo 100 stanica karcinoma pluća i odredili postotak stanica koje su pokazale samo nuklearno HIF-1 $\alpha$  bojenje, odnosno nuklearno i/ili citoplazmatsko bojenje. Aritmetičke sredine postotka pozitivnih stanica za svaki uzorak korištene su u daljnjim statističkim analizama.

### **3.3.3. RNA izolacija i reverzna transkripcija**

U 20 ispitanika je iz parafinskih blokova tumorskog tkiva izolirana RNA tumorskih stanica na sljedeći način. U svakom parafinskom bloku je iglom okruženo i izdvojeno po 5 mm<sup>2</sup> tumorskog tkiva bez okolnog normalnog tkiva i nekroze, izrezano u rezove debljine 6  $\mu\text{m}$  i

pohranjeno u sterilne mikroeprovete. Izolacija RNA je provedena uporabom High Pure RNA Paraffin kita (Cat. No. 03270289001; Roche, Švicarska) prema uputama proizvođača. Protokol je započeo deparafinizacijom, ispiranjem u čistom etanolu i centrifugiranjem 2 minute maksimalnom brzinom. Radi homogenizacije stanica i razgradnje proteina, osušenom talogu su dodani Proteinaza K i pufer za lizu tkiva (*engl. tissue lysis buffer*). Stanični lizat inkubiran je preko noći. Sljedećeg dana, u lizat su dodati pufer za vezanje (*engl. binding buffer*) i etanol te je otopina prebačena u spin-kolonu. Vezana RNA isprana je sa spin-kolone pomoću pufera za ispiranje (*engl. elution buffer*). Nakon eluiranja iz kolone, rezidualna DNA je razgrađena inkubacijom eluata s DNazom I.

Za mjerenje ukupne koncentracije RNA u svakom uzorku rabljen je Qubit™ Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Uzorci su razrijeđeni do najniže izmjerene koncentracije RNA od 11,3 ng/μL. Reverzna transkripcija 11,3 ng/μL ukupne RNA u cDNA izvršena je pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a, u skladu s uputama proizvođača (kat. br. 4368814, Applied Biosystems, SAD). Za naknadnu kvantifikaciju izražaja gena od interesa, cDNA konačnog volumena 20 μL je pohranjena na -80°C.

#### 3.3.4. qPCR

Analiza qPCR metodom je provedena na uređaju Real-Time PCR (Applied BiosystemsFast 7500, USA) uporabom Taqman® Fast Advanced Universal Master Mix II (Applied Biosystems, USA) koji sadrži AmpErase™ Uracil N-Glikozilazu (UNG) i inertnu referentnu boju ROX. Taqman® Applied Biosystems je proizveo probe za analizu izražaja humanog *HIF1A* gena (Hs00153153\_m1). Kao endogeni kontrolni gen služio je *GAPDH* (gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, Hs99999905\_m1). Real-time PCR proveden je uporabom 2μL cDNA predloška, 1 μL Taqman® probe (Applied Biosystems, USA) i 10 μL Taqman® univerzalnog master mix-a (Applied Biosystems, USA). Svi uzorci cDNA su urađeni u duplikatu. Kontrolni uzorak (NTC) sadržavao je sve komponente mastermixa i vodu bez nukleaza umjesto cDNA uzorka. PCR protokol uključio je zagrijavanje uzorka 2 minute na 50°C za aktivaciju uracil-N-glikozilaze, potom 2 minute pri 95°C za aktivaciju polimeraze, s 40 amplifikacijskih ciklusa (3 sekunde na 95°C i 30 sekundi na 60°C). Komparativna Ct metoda (2-ΔΔCt, ΔΔCt) rabljena je u relativnoj kvantifikaciji qPCR-a kako bi izračunali relativne promjene u izražaju ciljnog gena. Kao referentni nivo postavljena je vrijednost *HIF1A* gena u adenokarcinomu.

### 3.4. Statistička analiza

Statistička analiza je provedena pomoću GraphPad Prism 9.0.0 softvera (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Za potvrdu normalne raspodjele podataka rabljen je Shapiro-Wilk test, a za određivanje povezanosti Spearmanov koeficijent korelacije. Za određivanje statistički značajne razlike u izražaju GLUT1 koji je procijenjen HSCORE metodom, izražaja HIF-1 $\alpha$  i vrijednosti SUVmax u odnosu na praćene pokazatelje korišten je Mann-Whitney U test. Kruskal-Wallis test s Dunn post-hoc je rabljen za određivanje razlike među parametrima u odnosu na stadij bolesti.

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2>. Za izračun su rabljeni podaci iz pilot pokusa na 20 uzoraka koji su dobiveni analizom mikrografa karcinoma pluća i izračunom HSCORE za GLUT1, sa sljedećim parametrima:  $\mu_1 = 2,489$ ,  $\mu_2 = 3,048$ ,  $\sigma = 0,3808$ ,  $\text{power} = 90\%$ ,  $p = 0.05$ . Za isto je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka po skupini  $n = 10$ . S obzirom da ima više od 10 uzoraka po skupini, veličina uzorka je primjerena. Statistički značajna vrijednost je postavljena na  $p < 0.05$ . Svi podaci su prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom (SD).

## **4. RESULTATI**



#### 4.1. Kliničko-patološki parametri prema tipu NSCLC-a

U istraživanje je uključeno 48 ispitanika s NSCLC-om koji su bili operativno liječeni, 32 (66,66%) muškog 16 (33,33%) ženskog spola. Prosječna dob je bila 64.7 godina, prosječna dob muškaraca 65.7 godina, a žena 62.,7 godina. 34 ispitanika su imali adenokarcinom (70.8%), a 14 (29.16%) karcinom pločastih stanica. U tablici 4 je prikazana raspodjela praćenih parametara po tipu NSCLC-a.

**Tablica 4.** Praćeni parametri ovisno o tipu NSCLC-a

PARAMETAR	NSCLC		P
	Karcinom pločastih stanica (N = 14)	Adenokarcinom (N = 34)	
Dob (godine)	66 ± 8	64±8	0.389*
Muški spol	12 (85.7)	20 (58.8)	0.072†
Promjer tumora (mm)	39.8±20.4	42,3±23.5	0.825*
Pozitivni nodalni status	3 (21.4)	13 (38.2)	0.262†
Patološki stadij I	4 (28.6)	11 (32.4)	0.532†
Patološki stadij II	5 (35.7)	6 (17.6)	
Patološki stadij III	5 (35.7)	13 (38.2)	
Patološki stadij nepoznat	0	4 (11.8)	

\*Mann-Whitney U test †Hi-kvadrat test; NSCLC karcinom pluća ne-malih stanica

Nije utvrđena razlika u dobi ( $U = 199.5$ ;  $p = 0.33$ ) i veličini promarnog tumora ( $U = 102$ ;  $p = 0.82$ ) s obzirom na tip NSCLC-a. Nije utvrđena značajna razlika u nodalnom statusu ( $\chi^2 = 1.261$ ;  $p = 0.262$ ) s obzirom na tip NSCLC. Nije utvrđena značajna razlika u raspodjeli po patološkom stadiju bolesti ( $\chi^2 = 1.262$ ;  $p = 0.532$ ), ali za četiri ispitanika s adenokarcinomom pluća nije bilo podataka.

Iako su tumori koji su metastazirali u lokalne limfne čvorove bili veći nego tumori koji nisu imali nodalnu metastazu, ( $50.4 \pm 22.8$  mm prema  $38.7 \pm 22.12$  mm), razlika nije statistički značajna ( $U = 76$ ;  $p = 0.12$ ).

#### 4.2. Usporedba kliničko-patoloških parametara sa SUVmax primarnog tumora

U Tablici 5 je prikazana raspodjela SUVmax u primarnom tumoru s obzirom na praćene parametre.

**Tablica 5.** Vrijednosti SUVmax u primarnom tumoru s obzirom na praćene parametre

Kliničke karakteristike	SUVmax-primarni tumor	P
Spol		
Muškarci (N = 32)	7.81 ± 4.36	0.4778*
Žene (N = 16)	8.86 ± 4.82	
Histološki podtip		
Adenokarcinom (N = 34)	8.20 ± 4.27	0.6906*
Karcinom pločastih stanica (N = 14)	8.05 ± 5.18	
Stadij tumora		
I (N = 15)	7.16 ± 4.18	0.2683†
II (N = 11)	8.40 ± 6.12	
III (N = 18)	9.17 ± 3.83	
Limfni čvorovi		
PET/CT+ (N = 11)	9.80 ± 5.51	0.055*
PET/CT- (N = 35)	7.33 ± 3.74	

\*Mann-Whitney U test †Kruskal-Wallis test s nekorigiranim Dunnovim posthoc testom

Nije bilo statistički značajne razlike vrijednosti SUV max po spolu (U = 223; p = 0.47) ni tipu NSCLC-a (U = 220; p = 0.69). Nije bilo značajne razlike SUV max u primarnom tumoru s obzirom na stadije bolesti I, II i III (H = 2.632; p = 0.2683). Na osnovu nalaza PET-CT-a, u 11 ispitanika su utvrđene metastaze u limfne čvorove, a kod dva ispitanika nismo imali podatak. Nakupljanje FDG-a u primarnom tumoru je bilo značajno veće u PET-CT pozitivnih nego u PET-CT negativnih limfnih čvorova (SUVmax 9.80 ± 5.51 prema SUVmax 7.33 ± 3.74) (U = 118; p = 0.055).

Analizirana je vrijednost SUVmax u PET/CT pozitivnim limfnim čvorovima s obzirom na praćene parametre (Tablica 6).

**Tablica 6.** Vrijednosti SUVmax kod PET/CT pozitivnih limfnih čvorova s obzirom na praćene parametre.

Parametar	SUVmax u PET/CT pozitivnom lokalnom limfnom čvoru (N = 11)	p
Spol		
Muškarci (N = 8)	5.41 ± 1.78	0.3455*
Žene (N = 3)	4.37 ± 1.51	
Tip		
Adenokarcinom (N = 4)	6.05 ± 1.84	0.2182*
Karcinom pločastih stanica (N = 7)	4.60 ± 1.51	
Stadij bolesti		
I (N = 2)	3.50 ± 0.28	0.1515†
II (N = 3)	4.60 ± 1.55	
III (N = 6)	5.93 ± 1.69	

\*Mann-Whitney U test †Kruskal-Wallis test s nekorirgiranim Dunnovim posthoc testom

Nešto je veća vrijednost SUVmax u adenokarcinomu nego u karcinomu pločastih stanica, bez statističke značajnosti (U = 7; p = 0.2182). Nema značajne razlike u nakupljanju FDG-a u PET/CT pozitivnim limfnim čvorovima s obzirom na spol (U = 7; p = 0.345). Iako nakupljanje FDG-a u limfnom čvoru raste s višim stadijem bolesti, razlika nije statistički značajna (H = 3.842; p = 0.15).

Vrijednost SUVmax tumora je povezana s veličinom tumora (Spearmanova korelacija, r = 0.4705; p = 0.0043). Dob pokazuje trend negativne povezanosti s vrijednošću SUVmax tumora, bez statističke značajnosti (Spearmanova korelacija, r = -0.0969; p = 0.5123). Nije utvrđena značajna razlika u nakupljanju FDG-a u primarnom tumoru s obzirom na histološki nodalni status, 7.21 ± 3.89 prema 8.63 ± 4.76 (U = 210.5; p = 0.326).

#### 4.3. Izražaj GLUT1 proteina u NSCLC-u

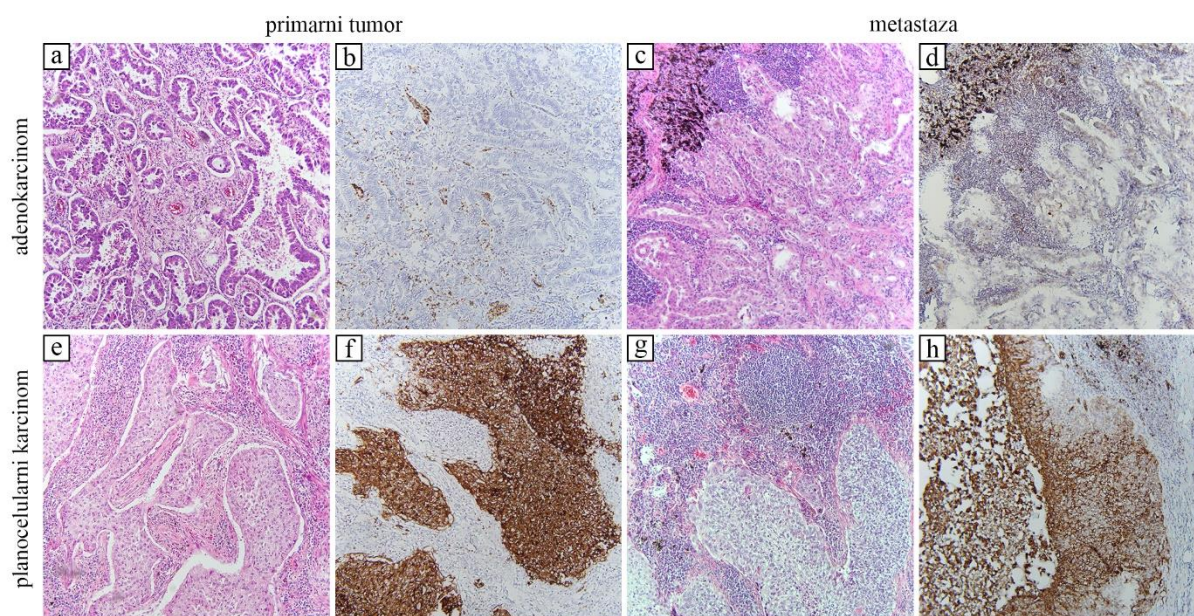
U Tablici 7 prikazana je povezanost izražaja GLUT1 u primarnom tumoru s praćenim parametrima. U karcinomu pločastih stanica je izražaj GLUT-1 značajno veći nego u adenokarcinomu, 3.05 ± 0.38 prema 2.49 ± 0.38 (U = 66.5; p < 0.0001) (Slika 8). Nije nađena statistički značajna razlika u izražaju GLUT1 s obzirom na spol (U = 207; p = 0.2896) i stadij

bolesti ( $H = 0.757$ ;  $p = 0.5928$ ). Izražaj GLUT1 u primarnom tumoru je nešto veći u karcinomu s PET-CT pozitivnim limfnim čvorom nego s PET-CT negativnim limfnim čvorom,  $2.87 \pm 0.4$  prema  $2.59 \pm 0.46$ , bez statističke značajnosti ( $U = 130$ ;  $p = 0.1096$ ).

**Tablica 7.** Vrijednost izražaja GLUT1 u primarnom tumoru s obzirom na praćene parametre.

PARAMETAR	GLUT1- primarni tumor	P
Spol		
Muškarci (N=32)	$2.71 \pm 0.48$	0.2896*
Žene (N=16)	$2.53 \pm 0.39$	
Tip		
Adenokarcinom (N=34)	$2.49 \pm 0.38$	< 0.0001*
Karcinom pločastih stanica (N=14)	$3.05 \pm 0.38$	
Stadij tumora		
I (N=15)	$2.57 \pm 0.45$	0.5928†
II (N=11)	$2.70 \pm 0.37$	
III (N=18)	$2.75 \pm 0.50$	
Limfni čvorovi		
PET/CT pozitivan (N=11)	$2.87 \pm 0.40$	0.1096*
PET/CT negativan (N=35)	$2.59 \pm 0.46$	

\*Mann-Whitney U test †Kruskal-Wallis test s nekorrigiranim Dunnovim posthoc testom



**Slika 10.** Prikaz morfologije i izražaja GLUT1 karcinoma pluća. Tipična žljezdana morfologija u primarnom tumoru (a) i metastazi u lokalni limfni čvor (c) u adenokarcinomu pluća. Slab /negativan izražaj GLUT1 u stanicama primarnog tumora i slab citoplazmatski izražaj GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru (b, d). Tipična morfologija karcinoma pločastih stanica u primarnom tumoru (e) i metastatskom limfnom čvoru (g). Stanice primarnog tumora i metastatskog limfnog čvora pokazuju jaki membranski izražaj GLUT1 (f, h). HE (a, c, e, g); GLUT1/HRP (b, d, f, h).

Povezanost izražaja GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru s praćenim pokazateljima prikazana je u Tablici 8.

**Tablica 8.** Povezanost izražaj GLUT1 u metastatskom lokalnom limfnom čvoru s praćenim parametrima.

PARAMETAR	IZRAŽAJ GLUT1 Metastatski limfni čvor	P*
Spol		
Muškarci (N = 10)	2.74 ± 0.54	0.0577*
Žene (N = 6)	2.22 ± 0.22	
Histološki tip		
Adenokarcinom (N = 13)	2.39 ± 0.37	0.0196*
Karcinom pločastih stanica (N = 3)	3.22 ± 0.51	
Stadij tumora		
II (N = 4)	2.57 ± 0.48	0.6545*
III (N = 8)	2.76 ± 0.52	
Limfni čvorovi		
PET/CT pozitivni (N = 4)	2.57 ± 0.18	0.6621*
PET/CT negativni (N = 12)	2.53 ± 0.58	

\*Mann-Whitney U test

Izražaj GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru je značajno veći u karcinomu pločastih stanica nego u adenokarcinomu (U = 3; p = 0.0196). Izražaj GLUT1 je veći u muškaraca nego u žena sa statistički graničnom razlikom (U = 12.5; p = 0.0577). Izražaj GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru nije povezan sa stadijem bolesti (U = 13; p = 0.6545). Nije utvrđena razlika u izražaju GLUT1 s obzirom PET/CT pozitivne i PET/CT negativne limfne čvorove (U = 20; p = 0.6621).

Izražaj GLUT1 u tumoru je pozitivno povezan s izražajem GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru (Spearmanova korelacija, r = 0.6504; p = 0.0078). Izražaj GLUT1 u tumoru i metastatskom limfnom čvoru pokazuje trend pozitivne povezanosti sa SUVmax u tumoru bez statističke značajnosti (Spearmanova korelacija, r = 0.2859; p = 0.0670 odnosno r = 0.341; p = 0.1947). Nije utvrđena povezanost između izražaja GLUT1 u tumoru i veličine primarnog tumora (Spearmanova korelacija, r = -0.0208; p = 0.9058). Nije utvrđena značajna razlika u izražaju GLUT1 u primarnom tumoru s obzirom na pozitivni i negativni nodalni status, 2.65 ± 0.51 prema 2.65 ± 0.44 (U = 240; p = 0.7332). Postoji trend negativne povezanosti između dobi

i izražaja GLUT1 u primarnom tumoru, bez statističke značajnosti (Spearmanova korelacija,  $r = -0.0252$ ;  $p = 0.8647$ ).

#### 4.4. Izražaj HIF-1 $\alpha$ proteina u NSCLC

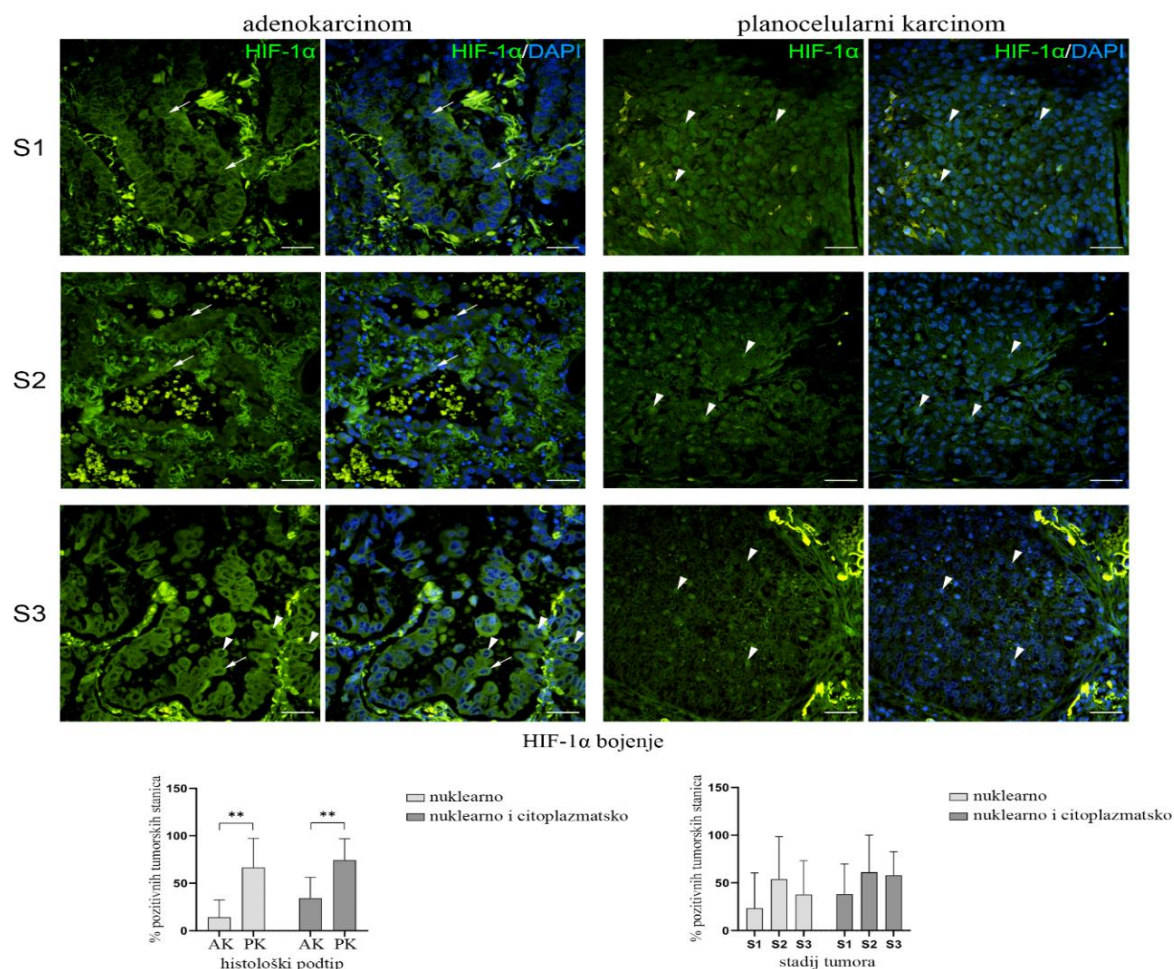
Povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s kliničkim i patološkim parametrima prikazana je u Tablici 9.

**Tablica 9.** Povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s praćenim parametrima

PARAMETAR	IZRAŽAJ HIF-1			
	nuklearni	p	nuklearni /citoplazmatski	p
Spol				
Muškarci (N = 12)	51.25 $\pm$ 38.33	0.086*	65.33 $\pm$ 26.31	0.0089*
Žene (N = 8)	11.00 $\pm$ 10.56		26.20 $\pm$ 22.85	
Tip				
Adenokarcinom (N = 10)	14.11 $\pm$ 18.16	0.0025*	34.33 $\pm$ 22.02	0.0038*
Karcinom pločastih stanica (N = 10)	66.44 $\pm$ 30.81		74.33 $\pm$ 22.66	
Stadij tumora				
I (N = 7)	23.40 $\pm$ 36.98	0.7239 <sup>†</sup>	38.20 $\pm$ 31.59	0.6892 <sup>†</sup>
II (N = 6)	53.80 $\pm$ 44.65		61.00 $\pm$ 39.17	
III (N = 7)	37.83 $\pm$ 35.32		57.83 $\pm$ 24.80	
Limfni čvorovi				
PET/CT pozitivni (N = 5)	85.50 $\pm$ 2.08	0.0121*	88.50 $\pm$ 2.38	0.0071*
PET/CT negativni (N = 15)	25.50 $\pm$ 31.89		42.92 $\pm$ 28.27	

\*Mann-Whitney U test <sup>†</sup>Kruskal-Wallis test s nekoririranim Dunnovim posthoc testom

U karcinomu pločastih stanica je postotak tumorskih stanica koje nuklearno ili nuklearno/citoplazmatski izražavaju HIF-1 $\alpha$  bio značajno veći nego u adenokarcinomu (U = 7; p = 0.002 odnosno U = 7; p = 0.0038) (Slika 11). Tumori s PET/CT pozitivnim limfnim čvorovima su imali značajno veći postotak tumorskih stanica s nuklearnim i nuklearnim/citoplazmatskim izražajem HIF-1 $\alpha$  nego tumori s PET/CT negativnim limfnim čvorovima (U = 4; p = 0.0121 odnosno U = 3; p = 0.0071).



**Slika 11.** Izražaj HIF-1 $\alpha$  u karcinoma pluća. S1-stadij I, S2-stadij II, S3-stadij III. U adenokarcinomu pojedinačne tumorske stanice pokazuju citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  (strelica), a rijetke nuklearni izražaj (vrh strelice). Većina tumorskih stanica u karcinomu pločastih stanica pokazuje intenzivni nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  (vrh stanice). Imunoflorescentno bojanje HIF-1 $\alpha$ ; slike su uvećane 400x; ljestvice predstavljaju 100  $\mu$ m. Grafovi predstavljaju srednju vrijednost HIF-1 $\alpha$  pozitivnih stanica; standardnom devijacijom je prikazana pogreška; \*\* $p < 0.01$ .

Nije utvrđena statistički značajna razlika u nuklearnom izražaju HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru u ispitanika s utvrđenim nodalnim metastazama u usporedbi s ispitanicima s negativnim nodalnim statusom,  $51 \pm 36.52$  prema  $34.58 \pm 38.18$  ( $U = 24.5$ ;  $p = 0.5923$ ). Isto tako, nuklearni/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  nije se razlikovao u ispitanika s pozitivnim i negativnim nodalnim statusom,  $63.4 \pm 32.46$  prema  $49.83 \pm 30.51$  ( $U = 26$ ;  $p = 0.7038$ ). Nije utvrđena značajna razlika u nuklearnom izražaju HIF-1 $\alpha$  s obzirom na spol ( $U = 13.5$ ;  $p = 0.0860$ ). Nuklearno/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  u tumoru je značajno veći u muškaraca nego u žena ( $U = 6$ ;  $p = 0.0089$ ). Postoji pozitivna poveznost između nuklearnog i



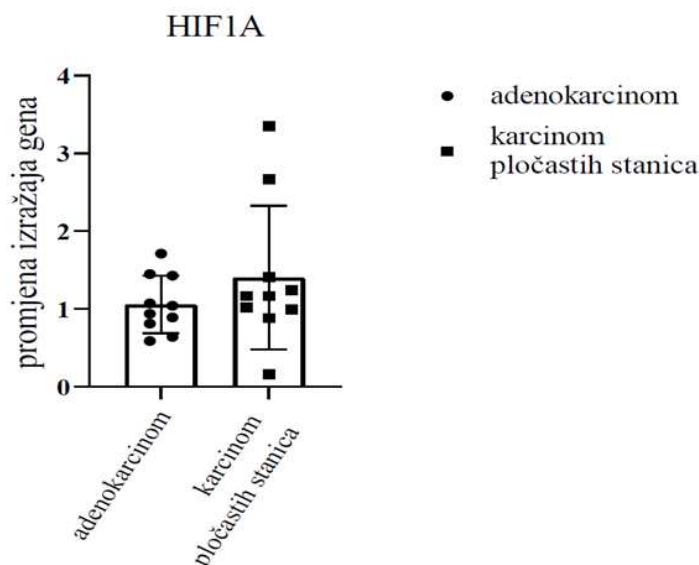
nuklearnog/citoplazmatskog izražaja HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru (Spearmanova korelacija,  $r = 0.8766$ ;  $p < 0.0001$ ). S obzirom na tip karcinoma, značajna povezanost postoji samo u karcinomu pločastih stanica (Spearmanova korelacija,  $r = 0.9222$ ;  $p = 0.0024$ ), ali ne i u adenokarcinomu (Spearmanova korelacija,  $r = 0.479$ ;  $p = 0.1939$ ).

Dokazana je pozitivna povezanost između nuklearnog i nuklearnog/citoplazmatskog izražaja HIF-1 $\alpha$  s izražajem GLUT1 (Spearmanova korelacija,  $r = 0.508$ ;  $p = 0.0392$  odnosno  $r = 0.4856$ ;  $p = 0.0498$ ). Postoji trend negativne povezanosti nuklearnog izražaja HIF-1 $\alpha$  i nuklearnog/citoplazmatskog izražaja HIF-1 sa SUVmax u primarnom tumoru (Spearmanova korelacija,  $r = -0.1301$ ;  $p = 0.6165$ , odnosno  $r = -0.0797$ ;  $p = 0.7602$ ). Nije utvrđena povezanost nuklearnog i nuklearnog/citoplazmatskog izražaja HIF-1 s dobi (Spearmanova korelacija,  $r = 0.2563$ ;  $p = 0.3176$ , odnosno  $r = 0.3294$ ;  $p = 0.1952$ ) i veličinom primarnog tumora (Spearmanova korelacija,  $r = 0.0828$ ;  $p = 0.7864$ , odnosno  $r = 0.1843$ ;  $p = 0.5442$ ). Nuklearni i nuklearni/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  nisu bili značajno različiti u stadijima bolesti ( $H = 0.694$ ;  $p = 0.7239$  odnosno  $H = 0.816$ ;  $p = 0.6892$ ).

#### **4.5. HIF-1A mRNA u NSCLC-u**

Usporedbom vrijednosti SUVmax primarnog tumora s izražajem *HIF-1A mRNA* nije utvrđena statistički značajna povezanost ( $p = 0.1642$ ).

Na slici 12 je grafički prikazana usporedba izražaja *HIF1A mRNA* u tumorskom tkivu ispitanika s adenokarcinomom i karcinomom pločastih stanica.



**Slika 12.** Izražaj *HIF1A mRNA* u tumorskom tkivu ispitanika s adenokarcinomom i karcinomom pločastih stanica.

U adenokarcinomu je promjena izražaja *HIF-1A* gena bila  $1.057 \pm 0.3674$ , a u karcinomu pločastih stanica  $1.406 \pm 0.923$  te nije utvrđena statistički značajna razlika (t-test;  $t = 1.111$ ;  $p = 0.2812$ ).

#### 4.6. Osjetljivost i specifičnost CT-a i PET/CT nalaza

Od 16 ispitanika koji su imali morfološki dokazanu metastazu u lokalne limfne čvorove, samo četvero su po PET/CT-u imali nodalni pozitivitet. Od 11 ispitanika koji su imali PET/CT-om pozitivne limfne čvorove, samo u trećine je morfološki potvrđena nodalna metastaza. S druge strane, po nalazima CT-a ispravno je utvrđeno 40% metastatskih limfnih čvorova. Naši rezultati odgovaraju praksi u kojoj je CT osjetljiviji i ima veću pozitivnu prediktivnu vrijednost od PET/CT, koji je specifičniji. Oba nalaza imaju sličnu negativnu prediktivnu vrijednost. Podudarnost između nalaza CT-a i nalaza PET/CT-a je oko 80%.

## **5. RASPRAVA**

Adenokarcinom i karcinom pluća pločastih stanica imaju različite morfološke i molekularne karakteristike i tipičnu kliničku prezentaciju, a prema novijim studijama i različit metabolizam, prvenstveno glukoze [60, 63, 64, 70]. GLUT1 i HIF-1 $\alpha$  su značajni u metabolizmu zdravih i zloćudnih stanica pa je nakupljanje FDG-a u tumoru klinička prezentacija Warburgovog fenomena. Analizom povezanosti navedenih pokazatelja pokušali smo na operativnom materijalu karcinoma pluća i metastatskog limfnog čvora ustanoviti razliku u metabolizmu glukoze dva najčešća tipa NSCLC-a. Prema Goodwinu i suradnicima, metabolizam karcinoma pluća pločastih stanica se, za razliku od adenokarcinoma, temelji na glikolizi. Povećan izražaj GLUT1 u karcinomu pluća pločastih stanica je povezan s olakšanim unosom glukoze u stanice i povećanim nakupljanjem FDG-a. Zanimljivo je da farmakološka inhibicija glikolize uzrokuje supresiju rasta karcinoma pluća pločastih stanica, ali ne i adenokarcinoma. Moguće da adenokarcinom, osim metabolizma glukoze, ima druge mehanizme za održavanje bioenergije, viabilnosti i proliferacije stanica. [63].

Analizom nakupljanja glukoze u tumoru i lokalnim limfnim čvorovima, utvrdili smo nešto veću vrijednost SUVmax kod adenokarcinoma nego karcinoma pločastih stanica, ali bez statističke značajnosti. Brojnim studijama neki autori također nisu našli razliku, a drugi su našli veću vrijednost SUVmax u karcinomu pločastih stanica [63, 108- 113]. Chiu sa suradnicima je utvrdio da solidni podtip adenokarcinoma pluća povećano nakuplja FDG-u [114]. Opisana je povezanost između nakupljanja FDG-a i proliferacije karcinoma, odnosno vremena udvostručenja volumena tumora. Stupanj diferencijacije, a ne samo histološki podtip, utječu na nakupljanje FDG-a u tumoru [115- 117]. Slabo diferencirani tumori imaju značajno veću vrijednost SUVmax, nego dobro diferencirani tumori [115, 117]. Adenokarcinom ima veći metastatski potencijal i lošiji DFS od karcinoma pločastih stanica, iako je povećano nakupljanje FDG-a, koje se smatra se prognostički nepovoljnim čimbenikom, karakterističnije za karcinom pluća pločastih stanica [60]. Ove činjenice sugeriraju da se PET/CT treba interpretirati u kontekstu histološkog tipa NSCLC-a [112]. Razlika u afinitetu prema nakupljanju FDG-a u adenokarcinomu i karcinomu pločastih stanica je dodatna prednost neinvazivne PET/CT metode jer bi mogla pružiti utemeljenu pretpostavku o kojem se tipu NSCLC radi [112, 118- 121]. Vrijednost SUVmax povezana je s proliferacijom tumorskih stanica i vremenom udvostručenja volumena tumora. Više vrijednosti SUVmax nalaze se u tumorima većeg volumena i izraženije proliferacije stanica [116]. Adenokarcinom ima značajno sporiji rast od karcinoma pluća pločastih stanica i medijan vremena udvostručenja volumena je 249-258 dana prema 81-131 dan [62, 122].

Izražaj GLUT1 utječe na nakupljanje FDG-a i moguće utječe na razlike između dva tipa NSCLC-a. Kod karcinoma pločastih stanica se GLUT1 nalazi na membrani tumorskih stanica i olakšava unos FDG-a, dok se u adenokarcinomu nalazi u citoplazmi. To upućuje da zaključak da izražaj i smještaj GLUT1 imaju utjecaj na nakupljanje FDG-a [123]. Ito sa suradnicima je utvrdio manji izražaj GLUT1 uz posljedično manju vrijednost SUVmax u adenokarcinomu nego u karcinomu pločastih stanica [110]. Studije su većinom utvrdile pozitivnu povezanost između nakupljanja FDG-a i izražaja GLUT1 u karcinoma pluća, osobito NSCLC [68, 78, 124]. Neki autori našli su da je pozitivan izražaj GLUT1 povezan s povećanim nakupljanjem FDG-a samo u adenokarcinomu [70, 124]. U našim rezultatima pokazan je trend pozitivne povezanosti između nakupljanja FDG-a i izražaja GLUT1 u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru, ali bez statističke značajnosti, moguće zbog malog uzorka. Marom i suradnici također nisu našli statistički značajnu povezanost između izražaja GLUT1 i nakupljanja FDG-a u NSCLC-u na uzorku potencijalno operabilnih bolesnika u ranim stadijima bolesti. Zsigurno postoje i drugi čimbenici koji utječu na nakupljanje FDG-a, a ne samo prijenosnici glukoze [125].

U brojnim studijama utvrđena je pozitivna a povezanost između veličine primarnog tumora i vrijednosti SUVmax [126, 111, 113, 117, 127, 128]. U našoj studiji je ta povezanost potvrđena. Xu sa suradnicima je na animalnom modelu istražio povezanost između nakupljanja FDG-a, veličine tumora pluća, izražaja GLUT i HIF-1 $\alpha$ . Utvrdio je povezanost svih navedenih parametara, a najjači korelacijski koeficijent bio je s veličinom tumora [129]. Budući su adenokarcinomi u našoj studiji bili veći nego karcinomi pluća pločastih stanica, povećano nakupljanje FDG-a moglo bi biti posljedica njihova većeg volumena. U tumorskom tkivu i periferiji, nalaze se ne-tumorske upalne i stromalne stanice. Nije poznato kolika je potrošnja glukoze tih stanica i utjecaj na nakupljanje FDG-a u tumoru. Mijeloidne stanice i T limfociti troše glukozu u većoj mjeri nego tumorske stanice [130]. Stoga su nužne studije kojima bi se utvrdilo koliki dio od ukupnog nakupljanja FDG-a otpada na nakupljanje u tumorskim stanicama, koliki na tumorski mikrokoliš [131].

U našem istraživanju nije bilo značajne razlike u nakupljanju FDG-a u primarnom tumoru ni po spolu niti po stadiju bolesti, a takvi su rezultati i nekih drugih studija [108, 132]. Međutim, Qiang i suradnici i Lee-a i suradnici su našli značajno veću vrijednost SUVmax u muškaraca, što su povezali s većim udjelom pušača cigareta među muškom populacijom [115, 126, 133].

Kako je nakupljanje FDG-a jedan od pokazatelja agresivnosti NSCLC-a, istražena je povezanost SUVmax tumora sa statusom limfnih čvorova, no bez jednoznačnih rezultata [108, 134]. U našem, relativno malom uzorku, nismo utvrdili statistički značajnu povezanost, ali je bio pozitivan trend povezanosti SUVmax primarnog tumora s pozitivnim limfnim čvorovima. Higashi i suradnici su utvrdili da je nakupljanje FDG-a značajan prediktor metastaza u limfne čvorove [135]. Nambu i suradnici su u bolesnika s vrijednošću SUVmax tumora većom od 12 utvrdili prisutnost metastaza u limfne čvorove u 70% slučajeva [136]. Qiang i suradnici su pretpostavili mogućnost metastaza u limfne čvorove u 22.5% bolesnika ako je vrijednost SUVmax tumora bila veća od 7, a u 4% bolesnika ako je SUVmax bio manji od 7. Autori zaključuju kako je vrijednost SUVmax rizičan čimbenik za metastaze u limfne čvorove [126]. Suarez-Pinere i suradnici opisali su kao iznimku bolesnika čiji je primarni tumor imao vrijednost SUVmax 0.5, a već je imao N2 status limfnih čvorova [137]. Moguće objašnjenje različitih rezultata je različita veličina uzorka i tipova NSCLC-a. Naime, oprečni su rezultati studija o učestalosti metastaza u limfne čvorove ovisno o histološkom tipu [108]. Ozgul i suradnici smatraju da je učestalost metastaza u limfne čvorove veća kod adenokarcinoma nego karcinoma pluća pločastih stanica [113]. U radu Suarez-Pinere i suradnika nije istaknuta razlika u metastaziranju u lokalne limfne čvorove ovisno o tipu NSCLC-a [137].

Utvrdili smo značajno veću vrijednost GLUT1 u karcinomu pluća pločastih stanica nego u adenokarcinomu. Taj rezultat je u skladu s brojnim studijama, no ovdje je prvi put u imunohistokemijskoj analizi GLUT1 primjenjena precizna semikvantitativna HSCORE metoda [63, 77, 138, 139]. Izražaj GLUT1 u primarnom tumoru je pozitivno značajno povezan s izražajem GLUT1 u metastatskom limfnom čvoru. Izražaj GLUT1 je u značajno veći u nodalnoj metastazi karcinoma pluća pločastih stanica nego nodalnoj metastazi adenokarcinoma. Prema literaturi, izražaj GLUT1 je povezan s metastazama u limfne čvorove u bolesnika s karcinomom pluća, ali postoji razlika ovisno o histološkom tipu [64, 140]. Ta razlika ukazuje na metaboličku heterogenost ova dva najčešća tipa NSCLC-a [141]. Ito i suradnici su utvrdili značajnu povezanost između izražaja GLUT1 i metastaza u limfne čvorove u NSCLC, ali ne u bolesnika s karcinomom pločastih stanica [141]. U našoj studiji nismo utvrdili statistički značajnu razliku u izražaju GLUT1 u primarnom tumoru s obzirom na lokalni nodalni status koji je bio pozitivan u 16 ispitanika, x s adenokarcinomom i y s karcinomom pločastih stanica.

Utvrdili smo da je izražaj GLUT1 u primarnom tumoru i u metastatskom limfnom čvoru veći u muškaraca nego u žena te kod višeg stadija nego u nižeg stadija, ali bez statistički

značajne razlike. Izražaj GLUT1 je bio veći kod PET/CT-om pozitivnih, nego kod negativnih limfnih čvorova, bez statistički značajne razlike. U velikoj meta-analizi 1665 bolesnika s NSCLC-om, Zhib Tan i suradnici su utvrdili značajno veće vrijednosti GLUT1 u muškaraca i u višim stadijima bolesti [138]. Autori su pozitivnu povezanost GLUT1 s veličinom tumora i višim stadijem bolesti objasnili povećanom energetsom potrebom i posljedično povećanim metabolizmom glukoze [138].

Positivna povezanost izražaja GLUT1 s muškim spolom nalazi se u drugim studijama [92, 139, 142]. Moguće objašnjenje je pušenje, navika čišća u muškaraca, koje je također pozitivno povezano s izražajem GLUT1 [92, 142]. Nikotinski produkti djelujući preko nikotin-acetilkolinskih receptora aktiviraju metaboličke puteve u kojima sudjeluju HIF-1 $\alpha$  i GLUT1 [143].

HIF-1 $\alpha$  se uz GLUT1 može smatrati endogenim biljekom hipoksije pa različit izražaj HIF-1 $\alpha$  u tipovima NSCLC sugerira metaboličku heterogenost između karcinoma pločastih stanica i adenokarcinoma [144]. U našoj studiji je postotak tumorskih stanica koje nuklearno i nuklearno/citoplazmatski izražavaju HIF-1 $\alpha$  bio značajno veći u karcinomu pločastih stanica nego u adenokarcinomu, što je sukladno rezultatima drugih studija [145, 146]. Razlog tome je veća hipoksija u karcinomu pločastih stanica nego u adenokarcinomu [145, 147]. U adenokarcinomu su pojedine stanice imale umjereni/ intenzivni citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$ , a poneka slabi nuklearni izražaj. U karcinomom pločastih stanica u većini zloćudnih stanica je nađen intenzivni nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$ . Yuan i suradnici su našli uglavnom nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  u tumorskim stanicama NSCLC-a [148]. Swinson i suradnici su analizirali izražaj HIF-1 $\alpha$  u tumorskom tkivu 172 bolesnika operirana zbog NSCLC-a i u 101 slučaju utvrdili nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  [145]. Nasuprot tome, Wang i suradnici te Chen i suradnici našli su veći citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  u NSCLC-u [149, 150].

Imunohistokemijski dokazanu razliku u izražaju HIF-1 $\alpha$  između karcinoma pluća pločastih stanica i adenokarcinoma nismo potvrdili na razini *HIF-1A mRNA*. Sličnu nepodudarnost opisali su Shakeri i suradnici, dok su Yohen i suradnici uspjeli potvrditi povezanost između HIF-1 $\alpha$  i *HIF-1A mRNA* [151, 152]. Moguće objašnjenje razlike u *HIF-1A mRNA* i imunohistokemijskog izražaja HIF-1 $\alpha$  je vrlo brza denaturacija proteina nakon resekcije tkiva i relativna nepreciznost imunohistokemijske metode. Drugo moguće objašnjenje je da izražaj mRNA reflektira izloženost čimbenicima rasta iz tumorskih stanica [152].

Izražaj HIF-1 $\alpha$  nije bio povezan s dobi bolesnika, veličinom primarnog tumora i stadijem bolesti. Rezultati drugih studija sukladni su našima [102, 150, 153, 154].

Nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  u tumorskim stanicama ne pokazuje razliku po spolu, ali je zato nuklearni/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  statistički značajno veći u muškaraca nego u žena. Moguće objašnjenje je, kao i s nakupljanjem FDG-a i izražajem GLUT1, pušenje cigareta u čemu prednjače muškarci. Naime, od ranije je poznata snažna poveznica između hipoksije, izražaja HIF-1 $\alpha$  i pušenja cigareta. Na mišjem modelu utvrđeno je povećano prepisivanja gena *HIF-1A* pri izloženosti lipopolisaharidima i dimu cigareta [155]. Ima, međutim, studija u kojima nije utvrđena povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s muškim spolom [145, 150, 154].

Yang i suradnici su utvrdili povećani izražaj HIF-1 $\alpha$  u bolesnika s NSCLC-om i značajnu povezanost s invazijom i stadijem tumora [156]. Povezanost s tim nepovoljnim pokazateljima ne iznenađuje jer HIF-1 $\alpha$  inhibira apoptozu zloćudnih stanica i potiče izražaj VEGF, GLUT1 i drugih antiapoptotičnih čimbenika, a HIF-1 preko VEGFR2, TGF $\beta$  i endotelina-1 inducira neovaskularizaciju i povećanje permeabilnosti krvnih žila [154, 157]. Gu i suradnici te Swinson i suradnici su utvrdili statistički značajnu pozitivnu povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s veličinom primarnog tumora, a Rene i suradnici u meta- analizi povezanost HIF-1 $\alpha$  sa stadijem bolesti [145, 153, 158]. Karetsi sa suradnicima je utvrdio statistički značajnu povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s veličinom tumora (T stadij) u adenokarcinomu, ali ne i u karcinomu pločastih stanica [102]. U našem istraživanju je nuklearni i nuklearni/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  bio veći u NSCLC s pozitivnim nodalnim statusom nego u u NSCLC s negativnim nodalnim statusom, ali bez statistički značajne razlike. Swinson sa suradnicima također nije utvrdio povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s metastazama u limfne čvorove [145]. Takasaki i suradnici su dokazali povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  s diferencijacijom tumora i pozitivnim nodalnim statusom, što sugerira povezanost HIF-1 $\alpha$  s tumorskom proliferacijom. U istoj studiji utvrđena je po povezanost HIF-1 $\alpha$  sa survivinom, c-myc i proliferacijskim biljegom Ki-67 [146]. Rezultati meta-analize Rena i suradnika i studije Qi i suradnika su u skladu s navedenim, odnosno nodalne metastaze u NSCLC-om su češće ako ako je izražaj HIF-1 $\alpha$  u primarnom tumoru veći [153, 159].

Aktivacija HIF-1 $\alpha$  potiče prepisivanje brojnih gena, uključujući gene koji sudjeluju u energetske metabolizmu, angiogenezi i apoptozi, među kojima je *GLUT1* čiji genski produkt sudjeluje u glikolizi kod NSCLC-a [160]. Naši rezultati ukazuju na pozitivnu povezanost između izražaja GLUT1 i nuklearnog i nuklearnog/citoplazmatskog izražaja HIF-1 $\alpha$ . Xu sa



suradnicima je tu povezanost dokazao na animalnom modelu [129]. U skladu s navedenim su rezultati Fana i suradnika koji su inhibicijom HIF-1 $\alpha$  postigli smanjeni izražaj GLUT1 i *GLUT1 mRNA* u stanicama karcinoma pluća [161].

Pozitivna povezanost između izražaja HIF-1 $\alpha$  i GLUT1 je očekivana jer HIF-1 $\alpha$  ima pozitivan utjecaj na izražaj GLUT1, ali i druge čimbenike tumorogeneze poput angiogeneze, proliferacije stanica, metabolizma, metastatskog potencijala, diferencijacije i odgovora na radioterapiju [59, 63]. Zloćudne stanice imaju povećane metaboličke potrebe koje se očituju i pojačanim metabolizmom glukoze, što objašnjava značaj pretrage PET/CT s FDG-om pri dijagnostičkom postupku. Međutim, svi zloćudni tumori ne pokazuju pojačano nakupljanje FDG-a, a pri nakupljanju FDG-a važnu ulogu ima i tumorski mikrookoliš [162].

Hipoksija je česta značajka solidnih tumora, povezana s rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju, s metastaziranjem i nepovoljnom prognozom [163]. Hipoksija ima važnu ulogu pri induciranju povećanog nakupljanja FDG-a, ali je način prikupljanja složen, a stanični i molekularni mehanizmi nakupljanja još nisu posve razjašnjeni [164, 165, 166, 167]. S obzirom na povezanost hipoksije i nakupljanja FDG-a, očekuje se pozitivna povezanost i s izražajem HIF-1 $\alpha$ , što neke studije potvrđuju [129, 168]. U ovom radu nismo potvrdili značajnu povezanost između nakupljanja FDG-a s HIF-1 $\alpha$  i *HIF-1A mRNA*, što je slično rezultatima meta-analize Surova i suradnika [106]. S obzirom na složen i ne sasvim razjašnjen mehanizam nakupljanja FDG-a, nejednoznačni rezultati ne iznenađuju.

Osjetljivost i specifičnost PET/CT-a nije bio primarni cilj ovog istraživanja, ali smo analizom podataka utvrdili da je dijagnostički značaj CT-a pri određivanju stadija bolesti, osobito zahvaćenosti limfnih čvorova veći nego PET/CTa. Zahvaćenost lokalnih limfnih čvorova je u 40% bila utvrđena CT-om, a u 33% PET/CT-om. Nakupljanje FDG-a se, osim kod zloćudnih tumora, može naći kod dobroćudnih tumora i reaktivnih promjena gdje nastaje zbog pojačane vaskularizacije i permeabilnosti krvnih žila, a ne zbog pojačanog izražaja GLUT1 [76, 77]. Stoga PET/CT s FDG-om ima relativno nisku specifičnost, a lažno pozitivni nalazi predstavljaju problem pri utvrđivanju stadija bolesti, osobito N statusa [76, 77]. Dugogodišnji pušači, bolesnici s kroničnim plućnim bolestima ili tuberkulozom mogu imati medijastinalnu limfoidnu folikularnu hiperplaziju i posljedično lažno pozitivan nalaz limfnih čvorova na PET/CT-u [77]. Kod centralno smještenih procesa i solidnih T2 tumora, uslučaju da nakupljanje FDG-a u na PET/CT-u ne sugerira metastatsku zahvaćenost limfnih čvorova, treba operativno uraditi temeljiti medijastinalni *staging* s limfadenektomijom zbog moguće okultne nodalne metastaze [169].

## **6.ZAKLJUČAK**

Osim po histološkim/molekularnim karakteristikama i kliničkoj prezentaciji, karcinom pluća pločastih stanica i adenokarcinom se razlikuju u metabolizmu, što možda pridonosi njihovoj različitoj prognozi.

- Uporabom semikvantitativne HSCORE metode utvrđen je značajno veći izražaj GLUT1 u karcinomu pluća pločastih stanica nego u adenokarcinomu.
- U karcinomu pluća pločastih stanica je značajno veći postotak tumorskih stanica koje su nuklearno i nuklearno/citoplazmatski izražavale HIF-1 $\alpha$  nego u adenokarcinomu.
- Nuklearno/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  u tumorskim stanicama NSCLC je značajno veći u muškaraca nego u žena, što je vjerojatno povezano s pušenjem.
- Postoji pozitivna povezanost između nuklearnog i nuklearno/citoplazmatskog izražaja HIF-1 $\alpha$  s izražajem GLUT1 u NSCLC ( $p = 0.0392$  i  $p = 0.0498$ ).
- Razliku u izražaju HIF-1 $\alpha$  između karcinoma pluća pločastih stanica i adenokarcinoma nismo potvrdili analizom *HIF-1A mRNA* qPCR metodom.
- U NSCLC-u postoji pozitivan trend povezanosti GLUT1 i HIF-1 $\alpha$  sa SUVmax.

## **7. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** U karcinomu pluća nemalih stanica (NSCLC) odrediti izražaj GLUT1 u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru, izražaj HIF-1 $\alpha$  i *HIF1A mRNA* u primarnom tumoru i usporediti ih s preoperativnom SUVmax vrijednošću u PET/CT s uporabom FDA, histološkim tipom i drugim kliničkim i patološkim parametrima.

**Materijal i metode:** U uzorku je 48 ispitanika s NSCLC-om koji su podvrgnuti lobektomiji/pulmektomiji s medijastinalnom limfadenektomijom u KBC-u Split od 2013. do 2018. Podaci o nakupljanju FDG i kliničko-patološkim parametrima prikupljeni su iz medicinske dokumentacije. Preparati su izrezani iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i metastatskog limfnog čvora. Imunohistokemijski su strojno obojeni na GLUT1 i mikroskopski analizirani metodom HSCORE. Ručno su obojeni na HIF-1 $\alpha$  metodom imunofluorescencije te je određen postotak tumorskih stanica koje su pokazale nuklearno odnosno nuklearno/citoplazmatsko bojenje na HIF-1 $\alpha$ . Metodom qPCR analizirana je razlika u *HIF-1A mRNA* adenokarcinoma i karcinoma pločastih stanica. Rezultati su statistički analizirani i značajnom je određena razlika na razini  $p = 0.05$ .

**Rezultati:** 32 ispitanika su bili muškarci i 16 žene, 34 (70.83%) s adenokarcinomom i 14 (29.16%) s karcinomom pločastih stanica. U karcinomu pločastih stanica je izražaj GLUT1 u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru bio veći nego u adenokarcinomu ( $p < 0.0001$  odnosno  $p < 0.0196$ ). U karcinomu pločastih stanica bio je veći postotak stanica s nuklearnim i nuklearno/citoplazmatskim izražajem HIF-1 $\alpha$  nego u adenokarcinomu ( $p = 0.0025$  odnosno  $p = 0.0038$ ). U karcinomu pločastih stanica utvrđena je povezanost između nuklearnog i nuklearno/citoplazmatskog izražaja HIF-1 $\alpha$  ( $p = 0.0004$ ). Nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju HIF-1 $\alpha$  ovisno o stadiju bolesti. Nuklearni/citoplazmatski izražaj HIF-1 $\alpha$  veći je u muškaraca nego u žena ( $p = 0.0089$ ). Izražaj GLUT1 je povezan s nuklearnim i nuklearnim/citoplazmatskim izražajem HIF-1 $\alpha$  ( $p = 0.0392$  odnosno  $p = 0.0498$ ). Nije utvrđena značajna razlika *HIF-1A mRNA* u odnosu na histološki tip ili SUVmax primarnog tumora.

**Zaključak:** Dokazane razlike u izražaju GLUT1, HIF-1 $\alpha$  i SUVmax u odnosu na tip NSCLC-a potvrđuju metaboličku heterogenost između adenokarcinoma i karcinoma pluća pločastih stanica.

## **8. SUMMARY**

**Aim of the study:** In non-small cell lung cancer (NSCLC) to determine the expression of GLUT1 in the primary tumor and metastatic lymph node, the expression of HIF-1 $\alpha$  and *HIF1A mRNA* in the primary tumor and compare them with the preoperative SUVmax value in PET/CT using FDA, histological type and other clinical and pathological parameters.

**Material and methods:** The sample includes 48 patients with NSCLC who underwent lobectomy/pulmectomy with mediastinal lymphadenectomy at University Hospital Split from 2013 to 2018. Data on FDG accumulation and clinicopathological parameters were collected from medical records. The histologic slides were cut from paraffin blocks of tumor tissue and metastatic lymph node. They were stained immunohistochemically for GLUT1 and microscopically analyzed using the HSCORE method. They were manually stained for HIF-1 $\alpha$  using the immunofluorescence method, and the percentage of tumor cells that showed nuclear or nuclear/cytoplasmic staining for HIF-1 $\alpha$  was determined. The difference in *HIF-1A mRNA* of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma was analyzed using the qPCR method. The results were statistically analyzed and a significant difference was determined at the  $p = 0.05$ .

**Results:** 32 patients were men and 16 women, 34 (70.83%) with adenocarcinoma and 14 (29.16%) with squamous cell carcinoma. In squamous cell carcinoma, GLUT1 expression in the primary tumor and metastatic lymph node was higher than in adenocarcinoma ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0196$ , respectively). In squamous cell carcinoma, there was a higher percentage of cells with nuclear and nuclear/cytoplasmic expression of HIF-1 $\alpha$  than in adenocarcinoma ( $p = 0.0025$  and  $p = 0.0038$ , respectively). In squamous cell carcinoma, an association between nuclear and nuclear/cytoplasmic expression of HIF-1 $\alpha$  was established ( $p = 0.0004$ ). No statistically significant difference was found in the expression of HIF-1 $\alpha$  depending on the stage of the disease. The nuclear/cytoplasmic expression of HIF-1 $\alpha$  was higher in men than in women ( $p = 0.0089$ ). GLUT1 expression was associated with nuclear and nuclear/cytoplasmic expression of HIF-1 $\alpha$  ( $p = 0.0392$  and  $p = 0.0498$ , respectively). No significant difference was found in *HIF-1A mRNA* in relation to the histological type or SUVmax of the primary tumor.

**Conclusion:** Proven differences in the expression of GLUT1, HIF-1 $\alpha$  and SUVmax in relation to the type of NSCLC confirm the metabolic heterogeneity between adenocarcinoma and squamous cell lung cancer.

## **9. POPIS LITERATURE**



1. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
2. Siegel, R L; Miller, K D; Fuchs, H E; Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians* 2022, 72, 7-33, 417.
3. Jalal AH, Sikder AK, Alam F, Samin S, Rahman SS, Khan MMA, Siddiquee MR. Early diagnosis with alternative approaches: innovation in lung cancer care. *Shanghai chest*. January 2021.
4. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. 2020 Mar;41(1):1-24.
5. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(23):1672-1694.
6. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2013;143% suppl)e1S-e29S.
7. Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:331–348.
8. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 19;1378(1):F21–F59.
9. Travis CTWD, Corrin B, in collaboration with pathologists from 14 countries: Histological typing of lung and pleural tumours. In World Health Organization International Histological Classification of Tumours. (Edited by: Sobin LH). Berlin; New York: Springer-Verlag 1999.
10. Kerr KM: Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol* 2001, 54:257–271.
11. Nicholson et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *Journal of Thoracic Oncology* Vol. 17 No. 3: 362–387.
12. Basumallik N, Agarwal M. Small cell lung cancer. 2021 Jul 17. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.
13. Takeuchi S, Khiewvan B, Fox PS, Swisher SG, Rohren EM, Bassett RL Jr, et al. Impact of initial PET/CT staging in terms of clinical stage, management plan, and prognosis in 592 patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(5):906-14.

14. Borczuk AC. Uncommon types of lung carcinoma with mixed histology sarcomatoid carcinoma, adenosquamous carcinoma, and mucoepidermoid carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142:914-21.
15. Zhang Z, Wang Y, Zhao Q, et al. Mixed adenocarcinoma, sarcomatoid carcinoma adenosquamous carcinoma of the prostate: A case report. *Oncol Lett* 2014;8:2325-7.
16. Shane B. Clark, Saud Alsubait. Non-Small Cell Lung Cancer. National Library of Medicine. Last Update: September 5, 2022.
17. N. M. Damjanov Ivan, Seiwerth Sven, Jukić Stanko. *Patologija*, 5. preured. Zagreb: Medicinska naklada, 2017.
18. Reckamp Karen L, *Lung Cancer, Treatment and Research*. Springer, 2016.
19. Kish JK, Ro JY, Ayala AG, McMurtrey MJ. Primary mucinous adenocarcinoma of the lung with signet-ring cells: a histochemical comparison with signet-ring cell carcinomas of other site. *Hum Pathol*. 1989 Nov;20(11):1097-102.
20. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I., WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1243-1260.
21. Kelly M. Latimer and Timothy F. Mott. Lung cancer: diagnosis, treatment principles and screening. *Am Fam Physician*. 2015 Feb 15;91(4):250-256.
22. Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):137S-146S.
23. Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, Raftopoulos H. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology*. 2007 Mar;242(3):882-8.
24. A. Anwar, F. Jafri, S. Ashraf, M. A. S. Jafri, and M. Fanucchi, "Paraneoplastic syndromes in lung cancer and their management.," *Ann. Transl. Med.*, vol. 7, no. 15, p. 359, Aug. 2019,
25. Ruano-Ravina A, et al. Lung Cancer symptoms at diagnosis: result of a nationwide registry study. *ESMO Open*. 2020; 5(6): e001021. Published online 2020 Nov 10.

26. Signs and Symptoms of Lung Cancer. Available: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-symptoms.html>.
27. MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143 (5 suppl):e142-165S.
28. De Leyn P, Doooms C, Kuzdzal J, et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;45: 787-798.
29. OncoLine: Cancer Clinical Practice Guidelines, 18 December 2015. Available at: <http://oncoline.nl/niet-kleincelling-longcarcinoom> (accessed 16 February 2017)
30. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer. *Chest*. 2003;123(1 suppl):97S-104S.
31. Hamilton W, Sharp D. Diagnosis of lung cancer in primary care: a structured review. *Fam Pract*. 2004;21(6):605-611.
32. UICC. TNM Classification of Malignant Tumours. 8th ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ; 2016.
33. AJCC. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Springer, New York; 2016.
34. <https://emedicine.medscape.com/article/279960-treatment>.
35. [https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq#\\_48414](https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq#_48414)
36. Government of the Republic of Croatia. "Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020.2024.," 2020, [Online]. Available: [https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2019 Programi i projekti/NACIONALNI PROGRAM PREVENCIJE RAKA PLUĆA.pdf](https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2019%20Programi%20i%20projekti/NACIONALNI%20PROGRAM%20PREVENCIJE%20RAKA%20PLUĆA.pdf)
37. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg' s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:325-337.
38. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* 2009; 121:29-40.
39. Bose S., Le A. (2018). Glucose metabolism in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1063, 3–12. 10.1007/978-3-319-77736-8\_1.

40. Santos CR, Schulze A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *Febs J.* 279 (15), 2610–2623. 10.1111/j.1742-4658.2012.08644.
41. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. (2019). The warburg effect: Essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int. J. Radiat. Biol.* 95 (7), 912–919.
42. Ward PS, Thompson CB. (2012). Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21 (3), 297–308.
43. Kim SH, Baek KH. Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 8;22(12):6173.
44. Augustin R. The protein family of glucose transporter transport facilitators: it' s not only about glucose after all. *IUBMB Life* 2010;62:315-333.
45. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (glut) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 2005; 202:654-662.
46. Joost, HG; Thorens, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence 439 characteristics, and potential function of its novel members (review). *Molecular membrane biology* 2001, 18, 247-256, 440
47. Jun, YJ; Jang, SM; Han, HL; Lee, KH; Jang, KS; Paik, SS. Clinicopathologic significance of GLUT1 expression and its 442 correlation with Apaf-1 in colorectal adenocarcinomas. *World journal of gastroenterology* 2011, 17, 1866-1873, 443.
48. Tian, M; Zhang, H; Nakasone, Y; Mogi, K; Endo, K. Expression of Glut-1 and Glut-3 in untreated oral squamous cell 445 carcinoma compared with FDG accumulation in a PET study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 446 2004, 31, 5-12,
49. Garcia Boy, R; Knapp, EM; Eisenhut, M; Haberkorn, U; Mier, W. Enzymes/transporters. *Handbook of experimental 448 pharmacology* 2008, 131-143.
50. Kaida, H; Ishibashi, M; Yuzuriha, M; Kurata, S; Arikawa, S; Kawahara, A; Uozumi, J; Uchida, M; Kobayashi, M; 450 Hirose, Y; et al. Glucose transporter expression of an esophageal gastrointestinal tumor detected by F-18 FDG PET/CT. 451 *Clinical nuclear medicine* 2010, 35, 505-509.
51. Medina, RA; Owen, GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biological research* 2002, 35, 9-26, 453.

52. Amann, T; Hellerbrand, C. GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. Expert opinion 14728220903307509 on therapeutic targets 455 2009, 13, 1411-1427,
53. Basturk, O; Singh, R; Kaygusuz, E; Balci, S; Dursun, N; Culhaci, N; Adsay, NV. GLUT-1 expression in pancreatic 457 neoplasia: implications in pathogenesis, diagnosis, and prognosis. Pancreas 2011, 40, 187-192, 458.
54. Carvalho, K; Cunha, IW; Rocha, RM; Ayala, FR; Cajaiba, MM; Begnami, MD; Vilela, RS; Paiva, GR; Andrade, 460 R; Soares, FA. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. Clinics (Sao Paulo) 461 2011, 66, 965-972.
55. Chan, DA; Sutphin, PD; Nguyen, P; Turcotte, S; Lai, EW; Banh, A; Reynolds, GE; Chi, JT; Wu, ; Solow-Cordero, 463 DE; et al. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. Science 464 translational medicine 2011, 3, 94ra70.
56. Fang, J; Luo, XM; Yao, HT; Zhou, SH; Ruan, LX; Yan, SX. Expression of glucose transporter-1, hypoxia-inducible 466 factor-1alpha, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B (Akt) in relation to [(18)F]fluorodeoxyglucose uptake in 467 nasopharyngeal diffuse large B-cell lymphoma: a case report and literature review. The Journal of international medical 468 research 2010, 38, 2160-2168.
57. Reinicke, K; Sotomayor, P; Cisterna, P; Delgado, C; Nualart, F; Godoy, A. Cellular distribution of Glut-1 and Glut-5 in 472 benign and malignant human prostate tissue. Journal of cellular biochemistry 2012, 113, 553-562.
58. Sakashita, M; Aoyama, N; Minami, R; Maekawa, S; Kuroda, K; Shirasaka, D; Ichihara, T; Kuroda, Y; Maeda, S; 474 Kasuga, M. Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. Eur J 475 Cancer 2001, 37, 204-209.
59. Luo XM, Zhou SH, Fan J. Glucose transporter-1 as a new therapeutic target in laryngeal carcinoma. J Int Med Res 2010; 38:1885-1892.
60. Schuurbiens OC, Meijer TW, Kaanders JH, Looijen-Salamon MG, de Geus-Oei LF, van der Drift MA, van der Heijden EH, Oyen WJ, Visser EP, Span PN, Bussink J. Glucose metabolism in NSCLC is histology-specific and diverges the prognostic potential of 18FDG-PET for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. J Thorac Oncol. 2014 Oct;9(10):1485-93.

61. Wang BY, Huang JY, Chen HC, Lin CH, Lin SH, Hung WH, et al. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* (2020) 146:43–52..
62. Nakamura Y, Suda T (2015) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and clinical manifestations. *Clin Med Insights: Circ Respir Pulm Med* 9:163–171.
63. Justin Goodwin, et al. The distinct metabolic phenotype of lung squamous cell carcinoma defines selective vulnerability to glycolytic inhibition. *Nature Communications* 8, article number: 15503 (2017).
64. Meijer TW, Schuurbiens OC, Kaanders JH, Looijen-Salamon MG, de Geus-Oei LF, Verhagen AF, Lok J, van der Heijden HF, Rademakers SE, Span PN, Bussink J. Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer.* 2012 Jun;76(3):316-23.
65. Zhang J, Chen L, Chen Y, Wang W, Cheng L, Zhou X, et al. Tumor vascularity and glucose metabolism correlated in adenocarcinoma, but not in squamous cell carcinoma of the lung. *PLoS One.* 2014;9(3):1–10.
66. Matsubara R, Kawano S, Chikui T, Kiyosue T, Goto Y, Hirano M, Jinno T, Nagata T, Oobu K, Abe K, Nakamura S. Clinical significance of combined assessment of the maximum standardized uptake value of F-18 FDG PET with nodal size in the diagnosis of cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Acad Radiol.* 2012 Jun; 19(6):708-17.
67. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* 2002 Sep; 2(9):683-93.
68. Higashi K, Ueda Y, Sakurai A, Wang XM, XU L, Murakami M, Seki H, Oguchi M, Taki S, Nambu Y, Tonami H, Katsuda S, Yamamoto I. Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with with [<sup>18</sup>F] FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 1778-85.
69. Ryan HE, Polni M, McNulty W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 2000;60:4010–4015.
70. Koh WY, Lee SJ, Park SY. Differential expression and prognostic significance of GLUT1 according to histologic type of non-small-cell lung cancer and its association with volume-dependent parameters. *Lung Cancer* 104: 31-37, 2017.

71. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 2000; 60:6189-95.
72. Kaira K, Endo M, Abe M, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Takahashi T, Murakami H, Tsuya A, Nakamura Y, Naito T, Hayashi I, Serizawa M, Koh Y, Hanaoka H, Tominaga H, Oriuchi N, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Biologic correlation of 2-(<sup>18</sup>F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake on positron emission tomography in thymic epithelial tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28:3746-53.
73. Vansteenkiste JF, Stroobants SG, Dupont PJ, De Leyn PR, Verbeken EK, Deneffe GJ, et al. Prognostic importance of the standardized uptake value on (18)F-fluoro-2-deoxy-glucose-positron emission tomography scan in non-small-cell lung cancer: an analysis of 125 cases. Leuven lung cancer group. *J Clin Oncol.* 1999;17:3201–6.
74. Vesselle H, Pugsley JM, Vallieres E, Wood DE. The impact of fluorodeoxyglucose F 18 positron-emission tomography on the surgical staging of non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124:511–9.
75. Paesmans M, Garcia C, Oliver Wong C-Y, Patz EF Jr, Komaki R, Eschmann S, et al. Primary tumour standardised uptake value is prognostic in nonsmall cell lung cancer: a multivariate pooled analysis of individual data. *Eur Respir J.* 2015;46:1751–61.
76. Strauss LG. Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients. *Eur J Nucl Med.* 1996;23:1409–1415.
77. Jin-Haeng Chung, Kyung-Ja Cho, Seung-Sook Lee, Hee Jong Baek, Jong-Ho Park, Gi Jeong Cheon, Chang-Woon Choi, Sang Moo Lim. Overexpression of Glut1 in lymphoid follicles correlates with false-positive (18)F-FDG PET results in lung cancer staging. *Journal of Nuclear Medicine* June 2004, 45 (6) 999-1003.
78. Khandani AH, Whitney KD, Keller SM, Isasi CR, Donald Blaufox M. Sensitivity of FDG PET, GLUT1 expression and proliferative index in bronchioloalveolar lung cancer. *Nucl Med Commun.* 2007;28:173–7.
79. Finger, EC; Giaccia, AJ. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer metastasis* 485 reviews 2010, 29, 285-293.
80. McKeown, SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *The British 487 journal of radiology* 2014, 87, 20130676.

81. Stickaert A, Saiselet M, Dom G, De Deken X, Dumont JE, Feron O, Sonveaux P, Maenhaut C. Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. *Oncogene*. 2017;36:2637-2642.
82. S. Osinsky, M. Zavelevich, P. Vaupel. Tumor hypoxia and malignant progression. *Exp Oncol* 2009. 31, 2, 80-86.
83. Yfantis, A; Mylonis, I; Chachami, G; Nikolaidis, M; Amoutzias, GD; Paraskeva, E; Simos, G. Transcriptional Response 492 to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators. *Cells* 2023, 12.
84. Koshikawa N, Hayashi J, Nakagawara A, Takenaga K. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 33185-33194.
85. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 9;20(2):238.
86. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 29083-29089.
87. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 1998, 12, 149-162.
88. Isa, AY; Ward, TH; West, CM; Slevin, NJ; Homer, JJ. Hypoxia in head and neck cancer. *The British journal of radiology* 494 2006, 79, 791-798.
89. Rankin, EB; Giaccia, AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell death and differentiation* 2008, 15, 496 678-685.
90. Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*. 2021 Sep 9;10(9):2371.
91. Iwasaki K, Yabushita H, Ueno T, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha, carbonic anhydrase-IX, glucose transporter-1 and vascular endothelial growth factor associated with



lymph node metastasis and recurrence in patients with locally advanced cervical cancer. *Oncol Lett* 2015;10:1970-8.

92. Fujino M, Aishima S, Shindo K, et al. Expression of glucose transporter-1 is correlated with hypoxia-inducible factor 1alpha and malignant potential in pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncol Lett* 2016;12:3337-43.

93. U. Berchner-Pfannschmidt, S. Frede, C. Wotzlaw, J. Fandrey. Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *European Respiratory Journal*. 2008 32: 210-217.

94. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(11), 5703.

95. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 32253-32259.

96. Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 338, 610-616.

97. Amankwah, EK; Sellers, TA; Park, JY. Gene variants in the angiogenesis pathway and prostate cancer. *Carcinogenesis* 498 2012, 33, 1259-1269.

98. Bos, R; Zhong, H; Hanrahan, CF; Mommers, EC; Semenza, GL; Pinedo, HM; Abeloff, MD; Simons, JW; van Diest, 500 P.J.; van der Wall, E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *Journal of the National Cancer 501 Institute* 2001, 93, 309-314.

99. Koukourakis, MI; Papazoglou, D; Giatromanolaki, A; Panagopoulos, I; Maltezos, E; Harris, AL; Gatter, KC; Sivridis, 503 E. C2028T polymorphism in exon 12 and dinucleotide repeat polymorphism in intron 13 of the HIF-1alpha gene define 504 HIF-1alpha protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006, 53, 257-262, 505.

100. Talks, KL; Turley, H; Gatter, KC; Maxwell, PH; Pugh, CW; Ratcliffe, PJ; Harris, AL. The expression and distribution 507 of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated 508 macrophages. *The American journal of pathology* 2000, 157, 411-421.

101. Sowa, T; Menju, T; Chen-Yoshikawa, TF; Takahashi, K; Nishikawa, S; Nakanishi, T; Shikuma, K; Motoyama, H; Hijiya, K; Aoyama, A; et al. Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression. *Cancer medicine* 2017, 6, 288-297.
102. Eleni Karetsi, Maria G. Ioannou, Theodora Kerenidi, Markos Minas (in memoriam), Paschalis A. Molyvdas, Konstantinos I. Gourgoulisanis, Efrosyni Paraskeva. Differential expression of hypoxia-inducible factor 1a in non-small cell lung cancer and small cell lung cancer. *CLINICS* 2012;67(12):1373-1378.
103. Wohlkoenig, C; Leithner, K; Olschewski, A; Olschewski, H; Hrzjenjak, A. TR3 is involved in hypoxia-induced apoptosis resistance in lung cancer cells downstream of HIF-1alpha. *Lung Cancer* 2017, 111, 15-22.
104. Yang, N; Liang, Y; Yang, P; Ji, F. Propofol suppresses LPS-induced nuclear accumulation of HIF-1alpha and tumor aggressiveness in non-small cell lung cancer. *Oncology reports* 2017, 37, 2611-2619.
105. Wan, J; Ling, X; Rao, Z; Peng, B; Ding, G. Independent prognostic value of HIF-1alpha expression in radiofrequency ablation of lung cancer. *Oncology letters* 2020, 19, 849-857.
106. Surov A, Schmidt SA, Prasad V, Beer AJ, Wienke A. FDG PET correlates weakly with HIF-1 $\alpha$  expression in solid tumors: a meta-analysis. *Acta Radiologica*. 2021;62(4):557-564.
107. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic Tumours. 5 izd. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021.
108. Shalaby, SM, Abdel-Aziz, AMR, Mansour, MG *et al.* Evaluation of relationship between maximum SUV measured on 18F-FDG PET/CT with tumor pathological types, size, lymph node metastasis and distant metastasis in non-small cell lung cancer. *Egypt J Radiol Nucl Med* 53, 220 (2022).
109. Olga CJ Schuurbiens *et al.* Glucose metabolism in NSCLC is histology-specific and diverges the prognostic potential of 18FDG-PET for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*. 2014 Oct;9(10):1485-93.
110. Ito T, Noguchi Y, Satoh S, Hayashi H, Inayama Y, Kitamura H. Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage. *Mod Pathol*. 1998;11:437-443.231.

111. Budak, E; Cok, G; Akgun, A. The Contribution of Fluorine (18)F-FDG PET/CT to Lung Cancer Diagnosis, Staging and 536 Treatment Planning. *Molecular imaging and radionuclide therapy* 2018, 27, 73-80.
112. Maman, A, Çiğdem, S, Kaya, İ. *et al.* Diagnostic value of FDG PET-CT in differentiating lung adenocarcinoma from squamous cell carcinoma. *EJNMMI Rep.* 8, 1 (2024).
113. Ozgül, MA; Kirkil, G; Seyhan, EC; Cetinkaya, E; Ozgul, G; Yuksel, M. The maximum standardized FDG uptake on 538 PET-CT in patients with non-small cell lung cancer. *Multidisciplinary respiratory medicine* 2013, 8, 69, 539.
114. Chiu CH et al. Histological subtypes of lung adenocarcinoma have differential (1)(8)F-fluorodeoxyglucose uptakes on the positron emission tomography/computed tomography scan. *J. Thorac. Oncol.* 6, 1697–1703 (2011).
115. Lee DS, Kim SJ et al (2015) Clinical correlation between tumor maximal standardized uptake value in metabolic imaging and metastatic tumor characteristics in advanced non-small cell lung cancer. *Medicine* 94:1304.
116. Higashi K, Ueda Y, Ikeda R, Kodama Y, Guo J, Matsunari I, Oguchi M, Tonami H, Katsuda S, Yamamoto I. P-glycoprotein expression is associated with FDG uptake and cell differentiation in patients with untreated lung cancer. *Nucl Med Commun.* 2004;25:19–27.
117. Duan XY, Wang W, Li M et al (2015) Predictive significance of standardized uptake value parameters of FDG-PET in patients with non-small cell lung carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 48:267–272.
118. Khandani AH, Whitney KD, Keller SM, Isasi CR, Donald Blaufox M. Sensitivity of FDG PET, GLUT1 expression and proliferative index in bronchioloalveolar lung cancer. *Nucl Med Commun.* 2007;28:173–7.
119. Cuaron J, Dunphy M, Rimner A. Role of FDG-PET scans in staging, response assessment, and follow-up care for non-small cell lung cancer. *Fron Oncol.* 2013;2:208.
120. Brown RS, Leung JY, Kison PV, Zasadny KR, Flint A, Wahl RL. Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer. *J Nucl Med.* 1999;40:556–565.
121. Wong CY, Nunez R, Bohdiewicz P, et al. Patterns of abnormal FDG uptake by various histological types of non-small cell lung cancer at initial staging by PET. *Eur J Nucl Med.* 2001;28:1702–1705.

122. Mackintosh JA, Marshall HM, Yang IA et al (2014) A retrospective study of volume doubling time in surgically resected non-small cell lung cancer. *Respirology* 19:755–762.
123. Marcelo Mamede, et al. [ <sup>18</sup>F]FDG Uptake and PCNA, Glut-1, and Hexokinase-II Expressions in Cancers and Inflammatory Lesions of the Lung. *Neoplasia* (2005) 7, 369-379.
124. Choi WH, Yoo le R, O JH, Kim TJ, Lee KY, Kim YK: Is the Glut expression related to FDG uptake in PET/CT of non-small cell lung cancer patients? *Technol Health Care* 23: S311-318, 2015.
125. Marom EM, Aloia TA, Moore MB, Hara M, Herndon JE 2nd, Harpole DH Jr, Goodman PC, Patz EF Jr. Correlation of FDG-PET imaging with Glut-1 and Glut-3 expression in early-stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Aug-Sep;33(2-3):99-107.
126. Qiang G, Huang W, Liang C et al (2016) Association between histo- pathological subtype, <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose uptake and epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 11:1769–17771.
127. Dooms C, van Baardwijk A, Verbeken E et al (2009) Association between <sup>18</sup>F-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake values and tumor vitality: prognos- tic value of positron emission tomography in early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 4:822–8281.
128. Zhu SH, Zhang Y, Yu YH et al (2013) FDG PET-CT in non-small cell lung cancer: relationship between primary tumor FDG uptake and extensional or metastatic potential. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:2925–2929.
129. Xu, H; Li, B; Yu, W; Wang, H; Zhao, X; Yao, Y; Huang, D. Correlation between (1)(8)F-FDG uptake and the expression 547 of glucose transporter-1 and hypoxia-inducible factor-1alpha in transplanted VX2 tumors. *Nuclear medicine communications* 548 2013, 34, 953-958.
130. Reinfeld BI, Madden MZ, Wolf MM, et al. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment. *Nature*. 2021;593:282-288.
131. Salas JR, Clark PM. Signaling Pathways That Drive <sup>18</sup>F-FDG Accumulation in Cancer. *J Nucl Med*. 2022 May;63(5):659-663.
132. Sunnetcioglu A, Sunnetcioglu M, Binici I et al (2015) Comparative analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis of 411 cases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14:34.
133. Zhang X, Guo X, Gao Q, Zhang J, Zheng J, Zhao G, Okuda K, Tartarone A, Jiang M. Association between cigarette smoking history, metabolic phenotypes, and *EGFR* mutation status in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2023 Oct 31;15(10):5689-5699.

134. Zhou X, Chen R, Huang G, Liu J. Potential clinical value of PET/CT in predicting occult nodal metastasis in T1-T2N0M0 lung cancer patients staged by PET/CT. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(47):82437-82445.
135. Higashi K, Ueda U, Yoshimichi M et al (2000) FDG PET measurement of the proliferative potential of non-small cell lung cancer. *J Nucl Med: Off Publ Soc Nucl Med* 41:85–92.
136. Nambu A, Kato S, Sato Y et al (2009) Relationship between maximum standardized uptake value (Max.SUV) of lung cancer and lymph node metastasis on FDG-PET. *Ann Nucl Med* 23:269–275.
137. Suárez-Piñera M, Belda-Sanchis J, Taus A et al (2018) FDG PET-CT Max.SUV and IASLC/ATS/ERS histologic classification: a new profile of lung adenocarcinoma with prognostic value. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 8:100–109.
138. Tan Z, Yang C, Zhang X, Zheng P, Shen W. Expression of glucose transporter 1 and prognosis in non-small cell lung cancer: a pooled analysis of 1665 patients. *Oncotarget*. 2017 May 4;8(37):60954-60961.
139. Park SY, Cho DG, Shim BY, Cho U. Relationship between Systemic Inflammatory Markers, GLUT1 Expression, and Maximum 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Their Prognostic Significance. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Mar 7;13(6):1013.
140. Zhang B, Xie Z, Li B. The clinicopathologic impacts and prognostic significance of GLUT1 expression in patients with lung cancer: A meta-analysis. *Gene*. 2019;689:76–83.
141. Ito R, Yashiro M, Tsukioka T, Izumi N, Komatsu H, Inoue H, Yamamoto Y, Nishiyama N. GLUT1 and PKM2 may be useful prognostic predictors in patients with non-small cell lung cancer following curative R0 resection. *Oncol Lett*. 2023 Feb 10;25(3):129.
142. In, KH et al. Lung cancer patients who are asymptomatic at diagnosis show favorable prognosis: a korean Lung Cancer Registry Study. *Lung Cancer* 64, 232–237 (2009).
143. Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, Velikina R, Shi S, Le AD. Nicotine induces hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (16): 4686–94.
144. van Baardwijk A, Dooms C, van Suylen RJ, Verbeken E, Hochstenbag M, Dehing-Oberije C, Rupa D, Pastorekova S, Stroobants S, Buell U, Lambin P, Vansteenkiste J, De Ruyscher

- D. The maximum uptake of (18)F-deoxyglucose on positron emission tomography scan correlates with survival, hypoxia inducible factor-1alpha and GLUT-1 in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2007 Jun;43(9):1392-8.
145. Swinson, DE; Jones, JL; Cox, G; Richardson, D; Harris, AL; O'Byrne, KJ. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non 550 small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *International journal of cancer* 2004, 111, 551 43-50.
146. Takasaki C, Kobayashi M, Ishibashi H, Akashi T and Okubo K: Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer. *Mol Clin Oncol* 5: 295-300, 2016.
147. Takaoki Furukawa et al, Association between [<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxyglucose uptake and expressions of hypoxia-induced factor 1 $\alpha$  and glucose transporter 1 in non-small cell lung cancer, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, Volume 45, Issue 12, December 2015, Pages 1154–1161.
148. Yuan N (2012) The expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and tumor growth factor in non-small cell lung cancer and their relationship with radiotherapy. Hebei Medical University.
149. Wang G (2018) The effect of type 2 diabetes on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer undergoing radical surgery and its correlation with the expression of igf-1r and hif-1 $\alpha$ . China Medical University.
150. Chen, YQ, Zhao, CL. & Li, W. Effect of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  on transcription of survivin in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 29 (2009).
151. Shakeri F, Ebrahimi M, Zare Karizi S. Investigation of mRNA Levels of PFK-1, LDH-A, p53, and HIF-1 $\alpha$  Genes Involved in Metabolic Reprogramming in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2023;30(1):17-24.
152. Yohena T, Yoshino I, Takenaka T, Kameyama T, Ohba T, Kuniyoshi Y, Maehara Y. Upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009 Mar;4(3):284-90.
153. Ren W, Mi D, Yang K, Cao N, Tian J, Li Z, Ma B. The expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Swiss Med Wkly*. 2013 Sep 6;143:w13855.

154. Fan LF, Diao LM, Chen DJ, Liu MQ, Zhu LQ, Li HG, Tang ZJ, Xia D, Liu X, Chen HL (2002) The expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in lung cancer tissues and its relationship with apoptosis and proliferation. *Cancer* 3: 254-258.
155. Dajio H, Hoshino Y, Kai S et al. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species dependent manner. *Nature Scientific Reports* 2016;6: 34424-34436.
156. Yang N, Liang Y, Yang P, Ji F (2017) Propofol suppresses LPS-induced nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$  and tumor aggressiveness in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 37: 2611-2619.
157. Huang Y, Wang Y, Wu C, Tian W. Elevated expression of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  regulated catabolic factors during intervertebral disc degeneration. *Life Sci.* 2019 Sep 1;232:116565.
158. Gu WL (2010) The role of Hif-1 $\alpha$  in tumor hypoxic microenvironment and the research progress of targeted therapy. *Chinese Journal of Oncology CNKI:SUN:NXYX.0.2010-06-026*.
159. Qi Q, Wang CM, Yang J, Tian Y, Feng C (2020) The correlation between Hif-1 $\alpha$ , pd-11 and lymphatic metastasis of non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Dis* 13: 242-246.
160. Shi Y, Lin X, Wang J, Zhou Z, Chen S and Chen G: Advances of HIF-1 $\alpha$ /glycolysis axis in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep* 51: 55, 2024.
161. Fan R, Hou WJ, Zhao YJ, Liu SL, Qiu XS, Wang EH, Wu GP. Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 $\alpha$  upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells. *Tumour Biol.* 2016 Apr;37(4):4655-63.
162. Yamamoto K, Brender JR, Seki T, et al. Molecular imaging of the tumor microenvironment reveals the relationship between tumor oxygenation, glucose uptake, and glycolysis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2020;80:2087.
163. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88.
164. Dirckx N, Tower RJ, Mercken EM, et al. Vhl deletion in osteoblasts boosts cellular glycolysis and improves global glucose metabolism. *J Clin Invest* 2018;128:1087.
165. Beer AJ, Lorenzen S, Metz S, et al. Comparison of integrin alphaVbeta3 expression and glucose metabolism in primary and metastatic lesions in cancer patients: A PET study using 18F-galacto-RGD and 18F-FDG. *J Nucl Med* 2008;49:22.
166. Plathow C, Weber WA. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med.* 2008;49 Suppl 2:43S-63S.

167. Kawada K, Iwamoto M, Sakai Y. Mechanisms underlying  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose accumulation in colorectal cancer. *World J Radiol.* 2016 Nov 28;8(11):880-886.
168. Kaira K, Serizawa M, Koh Y, Takahashi T, Yamaguchi A, Hanaoka H, Oriuchi N, Endo M, Ohde Y, Nakajima T, Yamamoto N. Biological significance of  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake on PET in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2014 Feb;83(2):197-204.
169. Chao F, Zhang H. PET/CT in the staging of the non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:783739.



## **10. ŽIVOTOPIS**

## **Osobni podaci**

Ime i prezime: Josipa Kokeza

Datum i mjesto rođenja: 10. kolovoza 1983. godine, Split, Hrvatska

## **Obrazovanje**

1990.-1998. Osnovna škola "Ravne Njive" Split

1998.-2002. Opća gimnazija "Vladimir Nazor" Split

2002.-2008. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, stručni naziv: doktor medicine

2014. Poslijediplomski doktorski studij Sveučilišta u Splitu, studijski program: Biologija novotvorina

## **Stručno usavršavanje**

2011.-2015. Specijalizacija interne medicine, Klinički bolnički centar Split

2016.-2018. Subspecijalizacija pulmologije, Klinički bolnički centar Split

## **Zaposlenja**

2009. Klinički bolnički centar Split-doktor medicine - pripravnik

2010. Dom zdravlja Zadarske županije - doktor medicine u turističkoj ambulanti na Viru

2010. Privatna ordinacija medicine rada u Splitu, dr. Željka Ercegović - doktor medicine

2011.-2015. Klinika za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split - specijalizant interne medicine

2015.-2018. Klinika za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split - specijalist interne medicine

2018.- Klinika za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split-specijalist interne medicine, subspecijalist pulmologije

### **Nastavna aktivnost**

2003.-2008.- Demonstrator pri katedri Građa i razvoj ljudskog tijela

2016.- Suradničko zvanje naslovnog asistentna pri Katedri za internu medicinu

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, znanstveno područje Biomedicina i zdravstvo, znanstveno polje Kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana Interna medicina

2016.-Suradnik pri Katedri kliničke vještine

### **Organiziranje tečaja**

Domaći tečaj treće kategorije-Multidisciplinarni pristup internističkom bolesniku, 2019. godine.

### **Poglavlja u knjigama**

Josipa Kokeza-Bolesti dišnog sustava. Interna medicina za zdravstvene studije-odabrana poglavlja. Višnja Kokić Maleš, Željko Šunodv i suradnici. Nakladnik: Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija.

### **Stručno-znanstvene publikacije u indeksiranim časopisima**

1. Irena Perić, Igor Barišić, Ivančica Pavličević, Josipa Kokeza, Gorana Trgo.

Hemoptize. Med Jad 2012;42(3-4):139-145.

2. Lozo Vukovac E, Lozo M, Mise K, Gudelj I, Puljiz Z, Jurcev-Savicevic A, Bradaric

A, Kokeza J, Mise J. Bronchoalveolar pH and inflammatory biomarkers in newly

diagnosed IPF and GERD patients: A case control study. *Med Sci Monit.* 2014; 20: 255-261.

3. Kokeza J, Strikic A, Ogorevc M, Kelam N, Vukoja M, Dilber I, Zekic Tomas S. The Effect of GLUT1 and HIF-1 $\alpha$  Expression on Glucose Uptake and Patient Survival in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(13), 10575.

4. Strikic A, Kokeza J, Ogorevc M, Kelam N, Vukoja M, Dolonga P, Tomas SZ. Differential expression of *HIF1A* and its downstream target *VEGFA* in the main subtypes of renal cell carcinoma and their impact on patient survival. *Front Oncol.* 2023 Nov 20;13:1287239.

### **Kongresna priopćenja**

1. Mladinov S, Kokeza J, Popovic V, Gudelj I, Ardalic Z, Mise K. Bronchoscopic findings in patients with gastroesophageal reflux (GER) and dry cough. *European Respiratory Journal* 2015 46: PA1834.

2. Ivcevic V, Kokeza J, Mise K, Mladinov S, Bozinovic T, Popovic V. Case report: idiopathic acute eosinophilic pneumonia (IAEP). *EAACI Online Library.* Jun 6, 2015; 104354.

3. Kokeza J, Mladinov S, Popovic V, Bozinovic T, Ivcevic V, Peric I, Lozo E, Mise K. Lung cancer in elderly. 5. kongres Hrvatskog torakalnog društva, Zagreb, Hrvatska. 2015.

4. Božinović T, Mladinov S, Kokeza J, Popović V, Ilak D, Šegrt I, Škopljanac I, Piljić Burazer M. Analiza EGFR mutacija iz bronhoskopskih uzoraka u KBC Split. 48. kongres Hrvatskog pulmološkog društva, Pula, Hrvatska. 2017.

5. Škopljanac I, Mladinov S, Kokeza J, Ivčević T, Brnas A. Adenovirusna pneumonija. 13. kongres Hrvatskog torakalnog društva, Zagreb, Hrvatska. 2023.

## **Članstva u strukovnim organizacijama**

Hrvatska liječnička komora, Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko pulmološko društvo