

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana D. Savić

**EKSPRESIJA PROTEINA POROZNIH VEZA,  
KONEKSINA 43, U PRIMARNIM I  
METASTATSKIM NESITNOĆELIJSKIM  
KARCINOMIMA PLUĆA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Ivana D. Savić

**EXPRESSION OF GAP JUNCTION PROTEIN,  
CONNEXIN 43, IN PRIMARY AND  
METASTATIC NON-SMALL CELL LUNG  
CARCINOMAS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

Prof. dr Dejan Oprić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Nebojša Ivanović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije:

1. Prof. dr Vesna Škodrić Trifunović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Doc. dr Sofija Glumac, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Vesna Škuletić, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane

Datum odbrane:

# EKSPRESIJA PROTEINA POROZNIH VEZA, KONEKSINA-43, U PRIMARNIM I METASTATSKIM NESITNOĆELIJSKIM KARCINOMIMA PLUĆA

## Sažetak

**Uvod:** Koneksin 43 je protein koji formira porozne veze i polukanale, a one omogućavaju direktnu komunikaciju između susednih ćelija i između ćelija i matriksa, što je značajno u ćelijskom rastu i diferencijaciji. Međutim, uloga koneksina 43 u nastanku i progresiji tumora je kontradiktorna. Posebno su oskudni podaci o ekspresiji i značaju koneksina 43 u karcinomima pluća.

**Ciljevi:** Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ispituje ekspresija i razlika u ekspresiji koneksina 43 u različitim histopatološkim tipovima nesitnoćelijskog karcinoma pluća; da se ispituje ekspresija koneksina 43 u invazivnom tumorskom frontu i centralnom delu tumora kod primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća; da se utvrdi povezanost ekspresije koneksina 43 sa markerima epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća; i da se ispituje razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća i njegovih limfogenih i hematogenih metastaza.

**Metode:** U ovom istraživanju korišćene su dve grupe uzoraka. Prvu grupu su činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka hirurških resekcija 88 pacijenata (45 muških i 43 ženskih; 61,9±7,4 godina) sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (52 adenokarcinoma i 36 skvamoznih karcinoma) sa pripadajućim limfnim čvorovima operisanih u Kliničko-bolničkom centru „Bežanijska kosa“ u Beogradu u periodu između 2012. i 2016. godine. Drugu grupu su činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (19 adenokarcinoma i 10 skvamoznih karcinoma) kao i prisutnih limfogenih i hematogenih metastaza dobijenih sa obdukcija 29 osoba (18 muških i 11 ženskih; 68,8±10,1 godina) obdukovanih na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu između 2016. i 2020. godine. Ispitivana je imunohistohemijska ekspresija koneksina 43 kao i markera epitelnomezenhimne tranzicije kod adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma pluća, u zoni invazivnog tumorskog fronta i centralnoj zoni tumora, kao i u metastazama. Za bojenje i analizu su korišćeni celi preseci kao i tkivni mikroniz.

**Rezultati:** Analiza ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je pokazala da i skvamozni karcinom i adenokarcinom mogu da ekspimiraju koneksin 43. Međutim, skvamozni karcinom je pokazao značajno veći stepen ekspresije kao i veći intenzitet ekspresije koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom ( $p < 0,05$ ). Ekspresija koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je često aberantna po lokalizaciji, tj. koneksin 43 je ekspimiran u citoplazmi ili čak u jedru. Pored izolovane membranske, citoplazmatske, i nuklearne ekspresije, bili su prisutni i slučajevi kombinovane, uglavnom membranskocitoplazmatske ekspresije. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 kod skvamoznih karcinoma je najčešće bila kombinovana, dok je kod adenokarcinoma podjednako često bila čisto citoplazmatska i kombinovana ( $p < 0,05$ ). Analiza ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je pokazala da i invazivni front i centralni deo tumora često ekspimiraju koneksin 43, ali nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji koneksina 43 između ovih delova tumora. Ekspresija koneksina 43 je korelirala sa ekspresijom markera epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ali su uočeni različiti obrasci korelacije između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma. Analiza ekspresije koneksina 43 na hirurškom materijalu je pokazala da su limfogene metastaze

skvamoznog karcinoma imale ekvivalentnu ekspresiju koneksina 43 kao primarni tumor, dok su limfogene metastaze adenokarcinoma u približno jednoj trećini slučajeva pokazale promjenjen profil ekspresije koneksina 43 u odnosu na primarni tumor. Ispitivanjem ekspresije koneksina 43 na obdukcijском materijalu nisu nađene statistički značajne razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog tumora i metastaza u limfnim čvorovima, niti između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod oba ispitivana patohistološka tipa.

**Zaključak:** Koneksin 43 je često eksprimiran kod karcinoma pluća, naročito kod skvamoznog karcinoma. Adenokarcinom i skvamozni karcinom pokazuju oprečnu ulogu koneksina 43 u tumorskom ponašanju. Tumorske metastaze mogu imati drugačiji stepen ekspresije koneksina 43 u odnosu na primarni tumor. Budući da porozne veze imaju ulogu u kancerogenezi kao i invaziji i metastaziranju malignih ćelija, dalje studije treba da razjasne da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker.

**Ključne reči:** koneksin 43, karcinom pluća, porozne veze, gap junctions, metastaze, tkivni mikroniz

**Naučna oblast:** medicinske nauke

**Uža naučna oblast:** molekularna medicina

**UDK broj:**

# EXPRESSION OF GAP JUNCTION PROTEIN, CONNEXIN 43, IN PRIMARY AND METASTATIC NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMAS

## Abstract

**Background:** Connexin 43, the protein that forms gap junctions and hemichannels, allows direct communication between neighboring cells and between cells and the matrix, which is important in cell growth and differentiation. However, the role of connexin 43 in tumor development and progression is still purely understood and contradictory. Data on the expression and significance of connexin 43 in lung cancer are particularly scarce.

**Objectives:** The objectives of this study were to examine the expression and difference in the expression of connexin 43 in different histopathological types of non-small cell lung cancer; to examine the expression of connexin 43 in the invasive tumor front and central part of the tumor in primary non-small cell lung cancer; to determine the association of the expression of connexin 43 with markers of epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer; and to examine differences in the expression of connexin 43 between primary non-small cell lung cancer and its lymphogenic and hematogenous metastases.

**Methods:** Two groups of samples were used in this study. The first group consisted of paraffin blocks of tissue samples of surgical resections of 88 patients (45 male and 43 female;  $61.9 \pm 7.4$  years) with non-small cell lung cancer (52 adenocarcinomas and 36 squamous cell carcinomas) with corresponding lymph nodes, who were operated at the University Hospital "Bežanijska kosa" in Belgrade in the period between 2012 and 2016. The second group consisted of paraffin blocks of tissue samples of primary non-small cell lung cancer (19 adenocarcinomas and 10 squamous cell carcinomas) as well as lymphogenic and hematogenous metastases obtained from autopsies of 29 individuals (18 male and 11 female;  $68.8 \pm 10.1$  years) at the Institute of Pathology, Faculty of Medicine in Belgrade in the period between 2016 and 2020. We analyzed the immunohistochemical expression of connexin 43 and markers of epithelial–mesenchymal transition in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lungs, in the zone of invasive tumor front and central zone of tumor as well as in metastases. Entire sections and tissue microarrays were used for staining and analysis.

**Results:** Analysis of connexin 43 expression in non-small cell lung carcinomas showed that both squamous cell carcinoma and adenocarcinoma can express connexin 43. However, squamous cell carcinoma showed a significantly higher degree of expression as well as a higher intensity of connexin 43 expression compared to adenocarcinoma ( $p < 0.05$ ). The expression of connexin 43 in non-small cell lung cancer is often aberrant by localization, i.e., connexin 43 is expressed in the cytoplasm or even in the nucleus. In addition to isolated membranous, cytoplasmic, and nuclear expression, there were cases of combined, mostly membranous–cytoplasmic expression. The localization of connexin 43 expression in squamous cell carcinomas was most often combined, while in adenocarcinomas it was equally often purely cytoplasmic and combined. Analysis of the expression of connexin 43 in non-small cell lung cancer showed that both the invasive front and the central part of the tumor often express connexin 43, but no statistically significant difference in the expression of connexin 43 was found between these parts of the tumor. The expression of connexin 43 correlated with the expression of markers of epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer, but different patterns of correlation were

observed between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Analysis of the expression of connexin 43 on surgical material showed that lymphogenic metastases of squamous cell carcinoma had equivalent expression of connexin 43 as the primary tumor, while lymphogenic metastases of adenocarcinoma in approximately one third of cases showed a changed profile of expression of connexin 43 relative to the primary tumor. Examination of the expression of connexin 43 on autopsy material did neither reveal statistically significant differences in the expression of connexin 43 between the primary tumor and lymph node metastases, nor between the primary tumor and associated hematogenous metastases in both pathohistological types examined.

**Conclusion:** Connexin 43 is often expressed in lung cancer, especially in squamous cell carcinoma. Adenocarcinoma and squamous cell carcinoma show the opposite role of connexin 43 in tumor behavior. Tumor metastases may have a different degree of expression of connexin 43 compared to the primary tumor. Since gap junctions play a role in carcinogenesis as well as the invasion and metastasis of malignant cells, further studies should clarify whether connexin 43 can be used as a diagnostic biomarker.

**Key words:** connexin 43, lung cancer, gap junctions, metastases, tissue microarray

**Scientific field:** medicine

**Scientific subfield:** molecular medicine

**UDK number:**

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija karcinoma pluća.....	1
1.2. Klinička slika karcinoma pluća.....	1
1.3 Histološki tipovi karcinoma pluća.....	3
1.4 Terapija karcinoma pluća.....	4
1.5 Porozne veze.....	6
1.6 Ekspresija koneksina u malignim tumorima.....	12
1.7 Epitelnomezenhimna tranzicija.....	12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1 Uzorak.....	15
3.2 Priprema uzoraka.....	15
3.3 Imunohistohemijsko bojenje.....	16
3.4 Statistička analiza.....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1 Analiza celih preseka.....	18
4.1.1 Ekspresija koneksina 43 u primarnom tumoru.....	18
4.1.2 Ekspresija koneksina 43 u metastazama u limfnom čvoru.....	23
4.1.3 Razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog tumora i limfogene metastaze.....	23
4.2 Analiza tkivnog mikroniza.....	23
4.2.1 Ekspresija koneksina 43 u invazivnom frontu i centralnom delu primarnog tumora i metastazi u limfnom čvoru.....	23
4.2.1.1 Distribucija ekspresije koneksina 43.....	23
4.2.1.2 Intenzitet ekspresije koneksina.....	29
4.2.1.3 Lokalizacija ekspresije koneksina.....	31
4.2.1.4 Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama.....	34
4.2.1.5 Poređenje ekspresije koneksina između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma.....	35
4.3 Korelacija ekspresije koneksina 43 sa markerima epitelnomezenhimne tranzicije.....	36
4.3.1 Korelacija ekspresije koneksina i E-kadherina.....	36
4.3.2 Korelacija ekspresije koneksina 43 i $\beta$ -katenina.....	42
4.3.3 Korelacija ekspresije koneksina i vimentina.....	49
4.4 Korelacija veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije.....	54
4.5 Korelacija ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i limfogenih/hematogenih metastaza.....	55
5. DISKUSIJA.....	62
6. ZAKLJUČCI.....	71
7. REFERENCE.....	73



## 1. UVOD

### 1.1 Epidemiologija karcinoma pluća

Karcinom pluća je vodeći uzrok smrti obolelih od malignih bolesti u svetu i u Srbiji. Broj novoobolelih na godišnjem nivou u svetu je oko 2,2 miliona slučajeva, sa 1,79 miliona preminulih od karcinoma pluća (WHO, 2020). Prema poslednjim podacima Instituta za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut”, muškarci su najviše obolevali i umirali od karcinoma pluća, zatim karcinoma prostate i debelog creva, dok je kod žena karcinom pluća po zastupljenosti i smrtnosti na drugom mestu, posle karcinoma dojke (Institut za javno zdravlje, 2020). Incidenca karcinoma pluća je bila viša kod muškaraca, međutim poslednjih decenija ukupne stope oboljevanja i letaliteta rastu kod žena (Howlader i sar., 2020).

Iako spada u najsmrtonosnije karcinome, karcinom pluća je moguće sprečiti. Kao najznačajniji faktor rizika za nastanak karcinoma pluća navodi se pušenje duvana (Travis, 2011). Rizik od nastanka karcinoma pluća raste sa brojem popušanih cigareta po danu, kao i sa brojem godina pušenja duvana. Sa prestankom pušenja duvana, rizik od nastanka karcinoma pluća postepeno opada. U studiji Dolla i Peta, tokom 20 godina, praćeni su britanski lekari koji su prestali da puše u odnosu na one koji su nastavili da puše, i pokazano je da je rizik od karcinoma pluća smanjen sa prestankom pušenja duvana (Doll i Peto, 1976). Ostali faktori rizika koji se pominju u literaturi su izloženost azbestu, radonu i niklu, kao i deficijencija alela za alfa1 antitripsin (Yang i sar., 1998). Iako je duvan najznačajniji faktor rizika za nastanak karcinoma pluća, u 10% slučajeva ovaj tip tumora javlja se kod onih koji nikada nisu bili pušači. Neuporedivo češći je kod žena, a adenokarcinom je najučestaliji histopatološki tip. Među faktorima rizika navodi se radon, azbest, teški metali, kao i dim iz cigareta u okolini, humani papiloma virus, ili nasledna genetska nestabilnost (Dubin, 2020).

### 1.2 Klinička slika karcinoma pluća

Ne postoje specifični znaci i simptomi karcinoma pluća, posebno u ranom stadijumu. Klinička slika je najčešće povezana sa veličinom i lokalizacijom tumorske mase kao i prisustvom metastatskih depozita. Najčešći simptomi su kašalj, hemoptizije, vizing i dispnea, mada nije neuobičajeno da se tumor pronađe kod asimptomatskih pacijenata na radiografiji grudnog koša. Ukoliko je zahvaćena pleura, najčešće se javlja bol kao i pleuralne efuzije. Uvećanje tumorske mase i medijastinalnih limfnih čvorova može dovesti do kompresije laringealnog nerva što dovodi do nastanka promuklosti (Tabela 1).

Tabela 1. Znaci i simptomi karcinoma pluća (Colby, 1995)

Sistemske efekte
<ul style="list-style-type: none"><li>• Gubitak telesne težine, gubitak apetita, malaksalost, povišena telesna temperatura</li></ul>
Lokalni efekti
<ul style="list-style-type: none"><li>• potiču od endobronhijalnog rasta tumorske mase i/ili invazije okolnih struktura: grudnog koša, ili kičmenih pršljenova</li><li>• Kašalj, dispnea, vizing, stridor, hemoptizije</li><li>• Bol u grudnom košu, bol u leđima</li><li>• Opstruktivna pneumonija (sa ili bez kavitacija)</li><li>• Pleuralne efuzije</li></ul>
Proširenost u medijastinalne strukture
<ul style="list-style-type: none"><li>• Zahvatanje nerava: rekurentni laringealni nerv (promuklost), frenični nerv (paraliza dijafragme), simpatički nervni sistem (Hornerov sindrom), zahvaćenost brahijalnih nerava</li></ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Opstrukcija gornje šuplje vene</li> <li>• Perikard: efuzije, tamponada</li> <li>• Miokard: aritmije, srčana insuficijencija</li> <li>• Jednjak: disfagija, bronhozofagealna fistula</li> <li>• Medijastinalni limfni nodusi: pleuralne efuzije</li> </ul>
<p>Metastatska bolest</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Direktni efekti povezani sa zahvaćenim organom</li> </ul>
<p>Paraneoplastični sindromi</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dermatomiozitis/polimiozitis</li> <li>• Periferne neuropatije</li> <li>• Mijastenični sindrom (uključujući Lambert-Eatonov sindrom)</li> <li>• Transverzni mijelitis</li> <li>• Progresivna multifokalna leukoencefalopatija</li> </ul>
<p>Endokrini simptomi</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperkalcemija usled povišenog stvaranja parathormonu sličnim supstancama</li> <li>• Hiponatrijemija usled neadekvatnog stvaranja antidiuretskog hormona</li> <li>• Kušingov sindrom, hiperpigmentacije usled hipersekrecije adrenokortikotropnog hormona</li> <li>• Karcinoid sindrom: hipersekrecija serotonina</li> <li>• Ginekomastija: usled pojačane sekrecije gonadotropina</li> <li>• Pojačana pigmentacija: pojačana sekrecija melanocita stimulirajućeg hormona</li> <li>• Hipoglikemija, hiperglikemija</li> </ul>
<p>Hematološki efekti/defekti koagulacije</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diseminovana intravaskularna koagulacija</li> <li>• Rekurentne venske tromboze</li> <li>• Marantični endokarditis (nebakterijski trombotični)</li> <li>• Anemija</li> <li>• Granulocitoza</li> <li>• Eozinofilija</li> <li>• Hipoalbuminemija</li> <li>• Trombocitopenija</li> </ul>
<p>Ostale manifestacije</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Henoh-Šenlajnova purpura</li> <li>• Glomerulonefritis, nefrotski sindrom</li> <li>• Hipourikemija, amiloidoza</li> <li>• Laktatna acidoza</li> <li>• Sistemski lupus eritematosus</li> </ul>

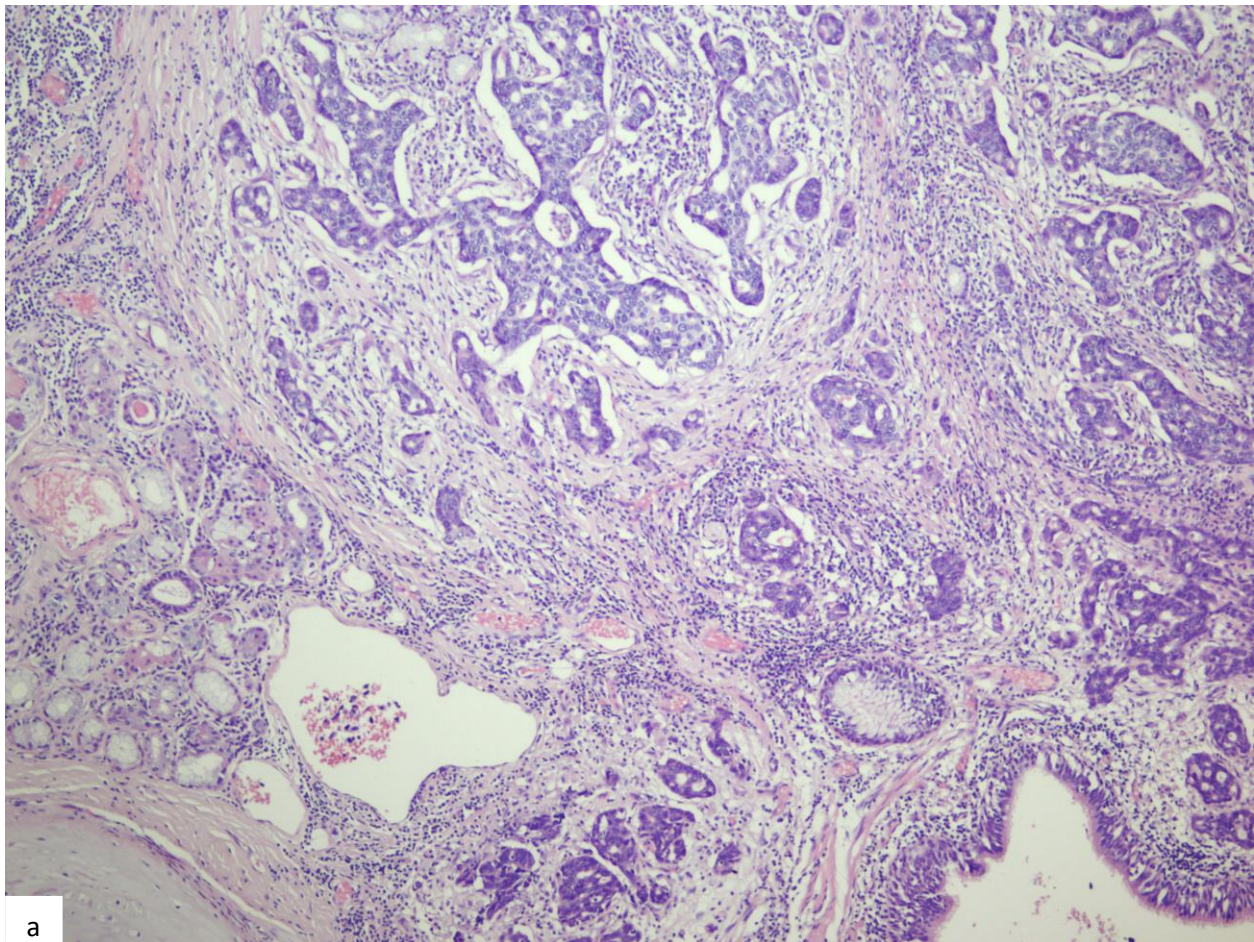
Karcinomi pluća mogu da metastaziraju limfogeno i hematogeno. Simptomi metastatske bolesti zavise od toga gde se metastaze nalaze, a najčešća mesta metastaza su jetra, nadbubrežne žlezde, mozak i kostna srž. U autopsijskoj studiji (Savić i sar., 2017), kojom je obuhvaćeno 175 obdukovanih, pokazano je da različiti histološki tipovi karcinoma pluća pokazuju drugačiji obrazac metastaziranja, te tako adenokarcinom pluća najčešće hematogeno metastazira u jetru i nadbubrežnu žlezdu, statistički značajno češće u odnosu na skvamozni karcinom, a potom u kosti. U ovoj studiji, svi obdukovani bili

su stariji od 50 godina i muškaraca je bilo dva puta više u odnosu na žene. Distribucija metastaza karcinoma pluća je značajna u dijagnostičkom algoritmu i lečenju, kao i za bolju kliničku procenu kod pacijenata sa nejasnom kliničkom slikom i sumnjom na okultni primarni karcinom pluća (Savić i sar., 2017).

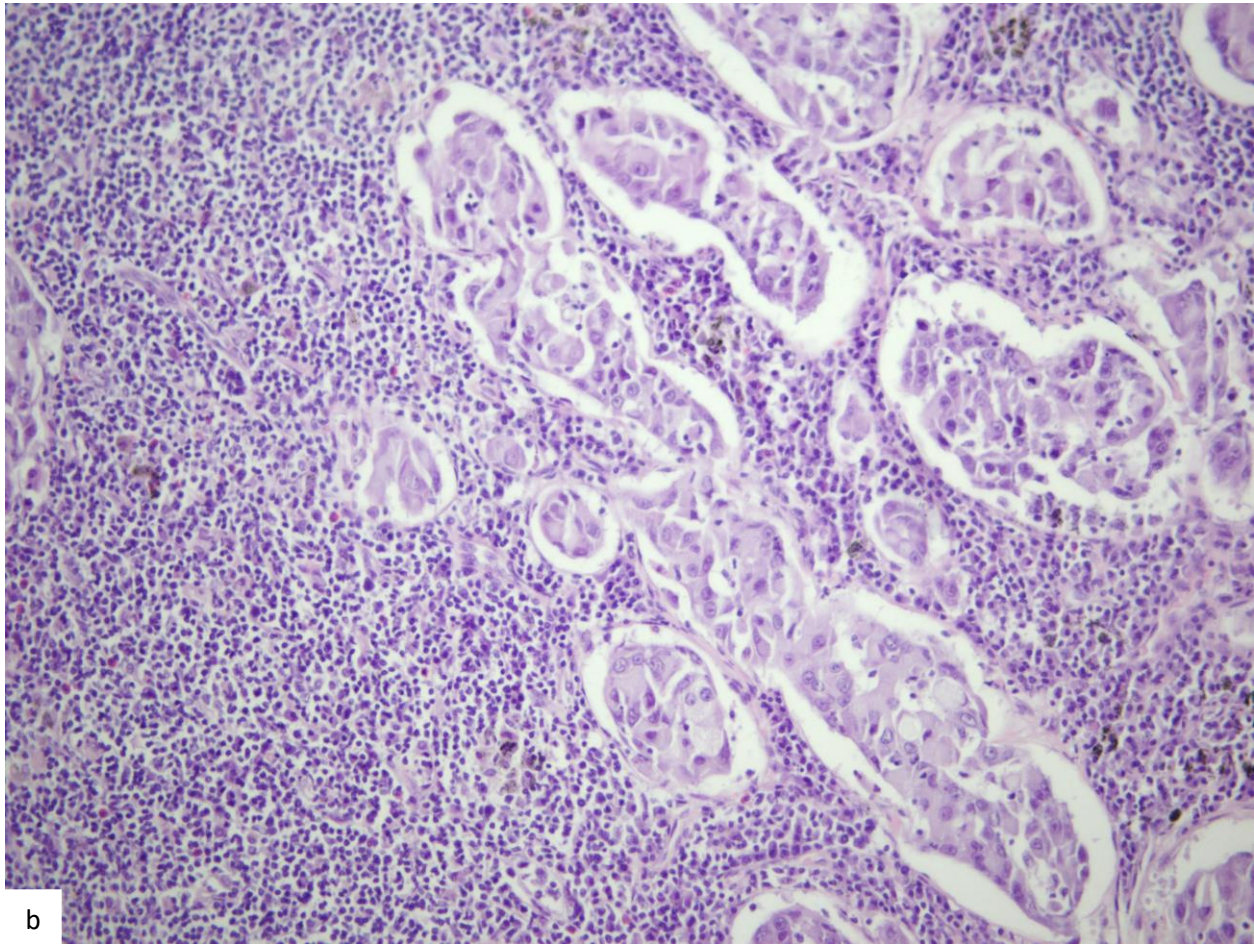
### 1.3 Histološki tipovi karcinoma pluća

Prema histološkim karakteristikama i biološkom ponašanju, karcinomi pluća se dele na nesitnoćelijske (više od 85%) i sitnoćelijske karcinome pluća. Najčešći histopatološki tip nesitnoćelijskog karcinoma pluća je adenokarcinom, a na drugom mestu je skvamozni karcinom (Travis, 2011).

Adenokarcinom je najčešće lokalizovan na periferiji pluća, čest je kod pušača, ali i kod nepušača kao i kod žena. Vreme dupliranja broja tumorskih ćelija je 161 dan (Geddes, 1979). Prema Klasifikaciji tumora pluća Svetske zdravstvene organizacije, adenokarcinom pluća deli se na: adenokarcinom in situ, minimalno invazivni adenokarcinom, invazivni adenokarcinom koji može biti mucinozni i nemucinozni (Slika 1). Histološki podtipovi odnose se na način rasta adenokarcinoma i to su: lepidični, papilarni, acinarni (imaju bolju prognozu) i solidni i mikropapilarni (koji imaju lošiju prognozu).



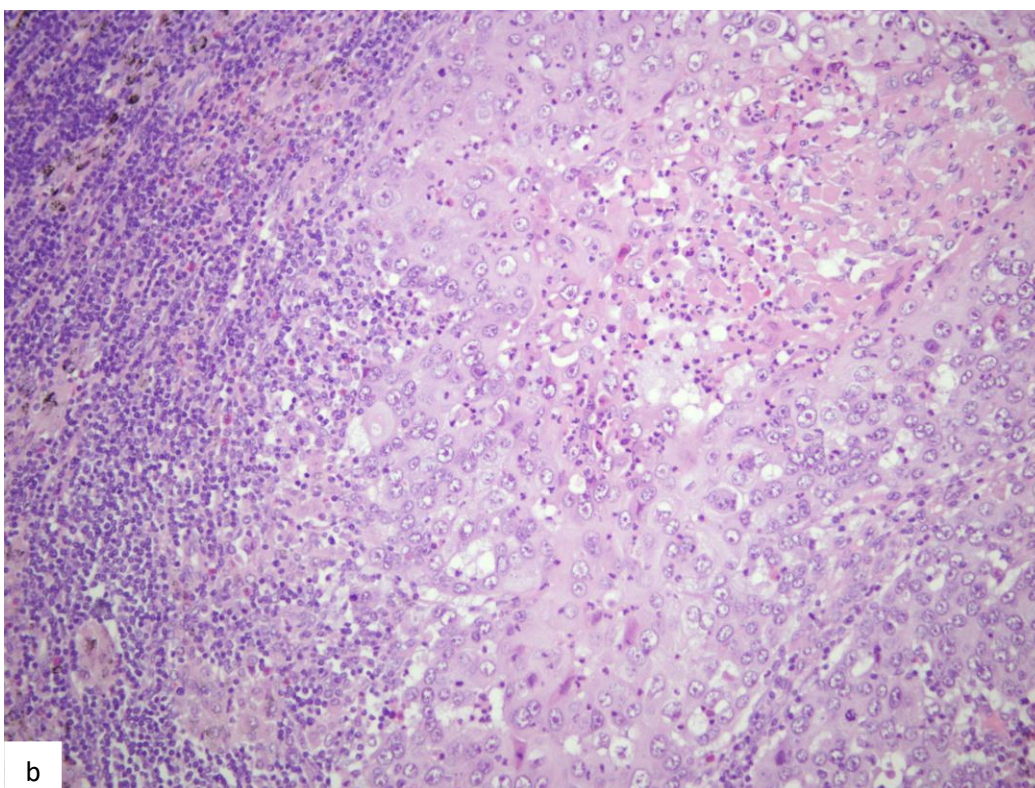
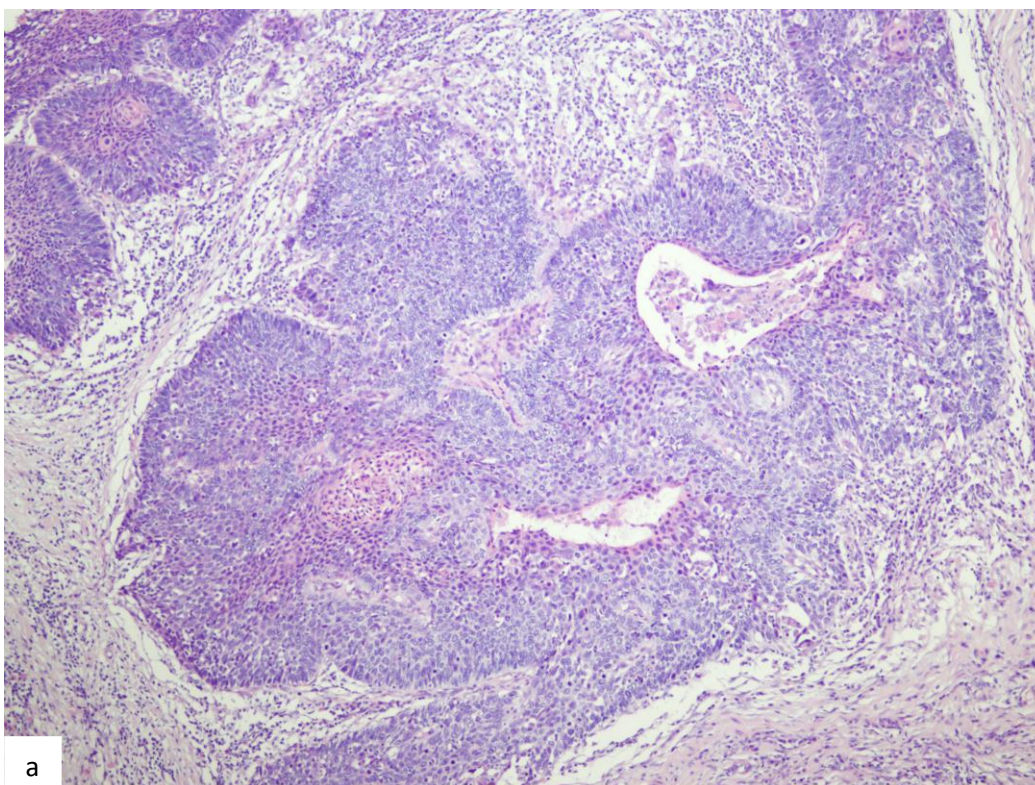




Slika 1. Adenokarcinom pluća: a) primarni tumor, HEx100; b) metastaza adenokarcinoma pluća u limfnom čvoru, HEx200

Skvamozni karcinom pluća (Slika 2) je najčešće prisutan kod muškaraca, centralno je lokalizovan, i usko je povezan sa konzumiranjem duvana. Vreme za koje se broj ćelija udvostruči je 88 dana (Geddes, 1979). Histološki tipovi skvamoznog karcinoma pluća prema Klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije su keratinizujući, nekeratinizujući i bazaloidni. Učestalost histopatološke dijagnoze skvamoznog karcinoma pluća je značajno smanjena u razvijenim zemljama najviše zbog javnozdravstvenih mera za smanjene upotrebe duvana u tim zemljama, kao i promenjenog sastava cigareta (Ganti, 2021).





Slika 2. Skvamozni karcinom pluća: a) primarni tumor, HEEx100; b) metastaza skvamoznog karcinoma pluća u limfnom čvoru, HEEx200

#### 1.4 Terapija karcinoma pluća

Karcinom pluća se najčešće dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu, te je svega 25% pacijenata kandidat za hiruršku intervenciju (van Zandwijk, 2001). Pored hirurgije, hemoterapija je metoda u lečenju karcinoma pluća koja obično ne uspeva da eliminiše sve tumorske ćelije, a najčešći uzrok je rezistencija na lekove. Pojedini pacijenti mogu biti rezistentni na hemoterapijske lekove od početka terapije, dok se kod drugih može razviti rezistencija na lekove u toku samog lečenja. Razvoj metastaza kao i rezistencija na terapiju su glavni razlozi za izostanak uspeha u lečenju karcinoma pluća (Xiao i He, 2010).

Terapija karcinoma pluća zavisi od stadijuma. Stadijum tumora podrazumeva stepen lokalne i distalne proširenosti tumora, za šta se najčešće koristi TNM klasifikacija (Tanoue, 2020). Ova klasifikacija ocenjuje veličinu i stanje proširenosti primarnog tumora, što se označava kao T (Tabela 2), prisustvo limfogenih metastaza, što se označava kao N (Tabela 3), i prisustvo hematogenih metastaza, što se označava kao M (Tabela 4).

Tabela 2. TNM klasifikacija karcinoma pluća: T stadijum (Modifikovano prema Tanoue, 2020)

T stadijum	Opis	Oznaka
Tx	Primarni tumor se ne može evaluirati ili je u pitanju tumor koji je dokazan usled prisustva malignih ćelija u sputumu ili bronhijalnim ispiranjima	Tx
T0	Nema dokaza o prisustvu tumora	T0
Tis	Carcinoma in situ	Tis
T1	≤3cm u najvećoj dimenziji, okružen plućima ili visceralnom pleurom Ili minimalno invazivni adenokarcinom	T1a (mi) T1a ≤2cm T1b >2 i ≤3cm
T2	Tumor veličine >3 cm ali ≤5 cm, ili tumor koji infiltriše visceralnu pleuru ili glavni bronh	T2a >3-4 cm T2b >4-5cm
T3	>5 cm i ≤7cm, ili tumor koji infiltriše grudni koš, perikard, frenični nerv ili odvojeni tumorski nodulusi u istom lobusu	T3
T4	>7cm, ili tumor koji invadira medijastinalne strukture, srce, velike krvne sudove, traheju, rekurentni laringealni nerv, jednjak, kičmeni pršljen, odvojen tumorski nodus u različitom lobusu u odnosu na primarni tumor	T4

Tabela 3. TNM klasifikacija karcinoma pluća: N stadijum (Modifikovano prema Tanoue, 2020)

N stadijum	Opis
N0	Nema prisustva tumora u regionalnim limfnim nodusima
N1	Zahvatanje ipsilateralnih intrapulmonalnih ili hilarnih nodusa
N2	Zahvatanje ipsilateralnih medijastinalnih ili subkarinealnih limfnih nodusa
N3	Zahvatanje kontralateralnih hilarnih ili medijastinalnih limfnih nodusa ili supraklavikularnih nodusa
Nx	N status se ne može evaluirati

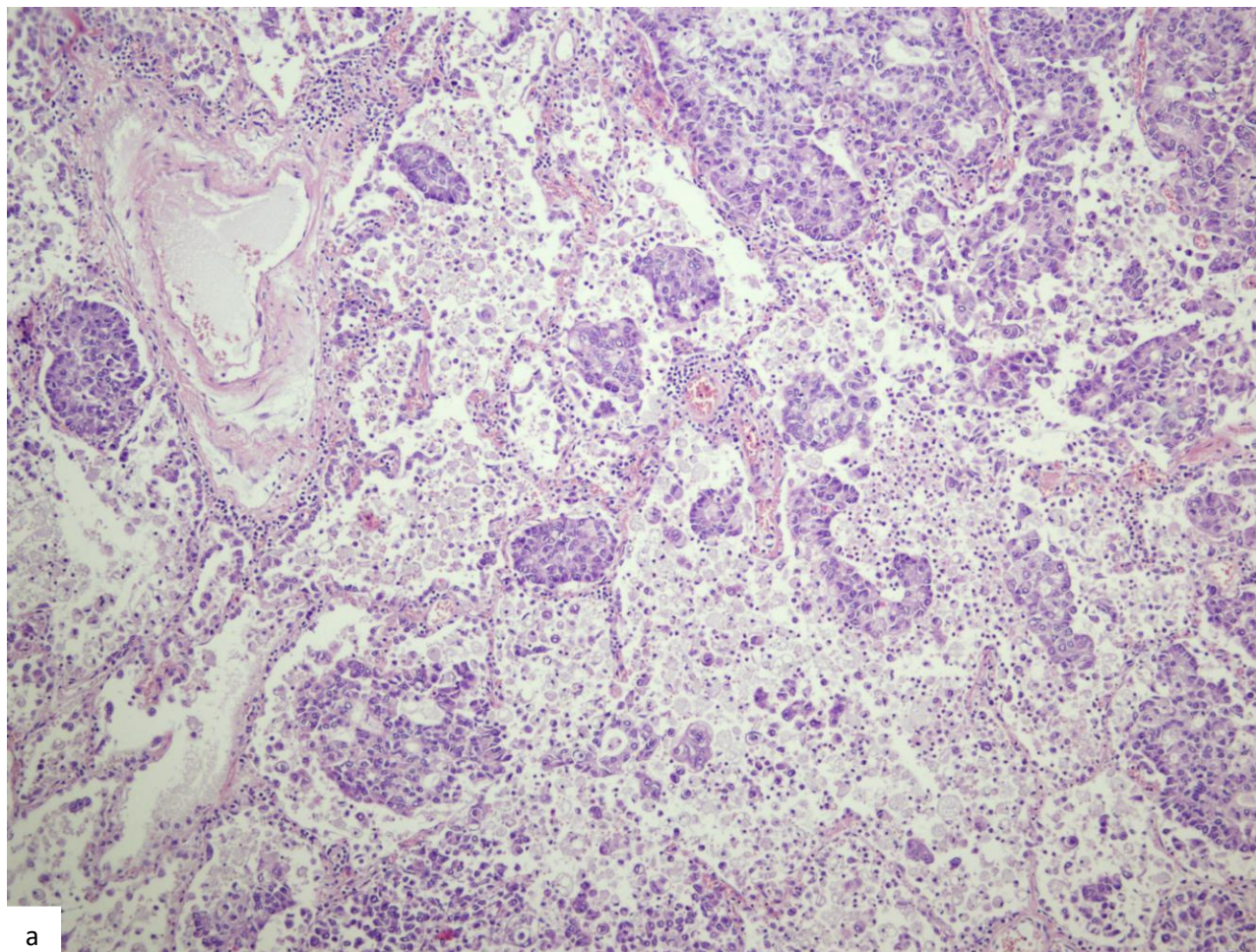
Tabela 4. TNM klasifikacija karcinoma pluća: M stadijum (Modifikovano prema Tanoue, 2020)

M	Opis
M0	Bez distalnih metastaza
M1a	Maligne pleuralne/perikardne efuzije ili maligni pleuralni/perikardni nodulusi Odvojen nodus u kontralateralnom plućnom krilu
M1b	Pojedinačna ekstratorakalna metastaza (oligometastaza)
M1c	Multiple ekstratorakalne metastaze >1 u pojedinačnom organu

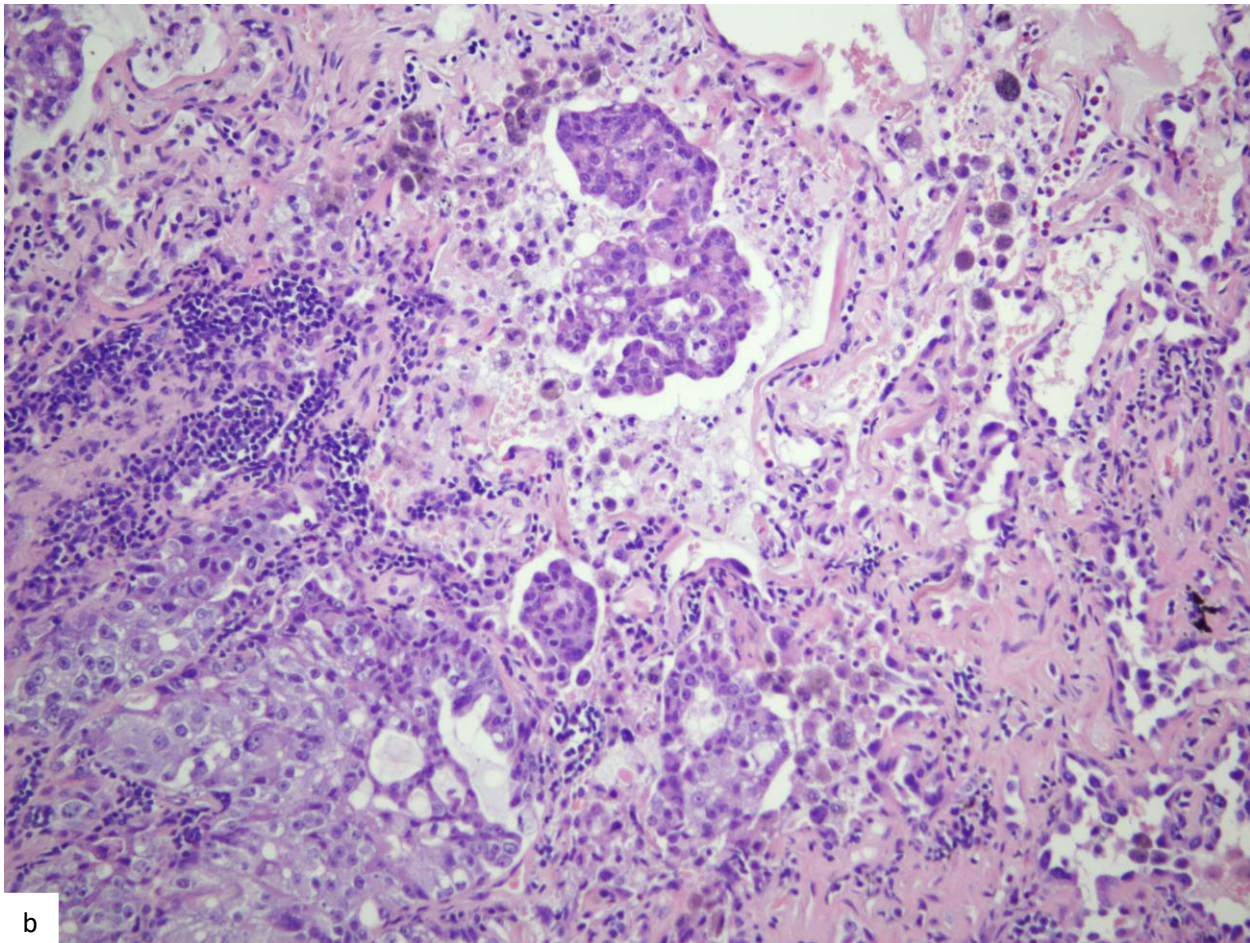
Petogodišnje preživljavanje pacijenata u stadijumu Ia je 70%, u stadijumu Ib 60%, dok pacijenti u stadijumima IIa i IIb imaju preživljavanje od 55% i 40% (Ginsberg i sar., 1983). Najčešće korišćeni vidovi terapije za karcinom pluća su hirurška resekcija, hemioterapija i radioterapija, a poslednjih godina se sve više u svetu koristi i imunoterapija. Terapijski pristup i tip hirurške intervencije zavisi od lokalne i distalne proširenosti bolesti, kao i pacijentovog opšteg stanja da podnese proceduru. Najčešća hirurška procedura je lobektomija, u kojoj se uklanja ceo lobus sa prisutnim tumorom. Moguća je i lokalna resekcija, kao što su „wedge“ resekcije, ali ovaj vid terapije je povezan sa većim rizikom od recidiva bolesti, tako da se izvodi kod onih pacijenata koji ne mogu da podnesu ekstenzivnu hiruršku intervenciju. Ponekad je potrebno odstraniti i celo plućno krilo ukoliko je bolest proširena, što se naziva pneumonektomija. Neki pacijenti nisu kandidati za hiruršku intervenciju iako su u nižem stadijumu zbog prisutnih komorbiditeta. Ovi pacijenti najčešće dobijaju radioterapiju i izlečenje je 15%-20% (Feld i sar., 2000).



Širenje tumora kroz alveolarne prostore (engl. *spread through alveolar spaces-STAS*) podrazumeva invaziju karcinoma pluća (Slika 3). U mnogim studijama pokazano je da je prisustvo STAS-a povezano sa lošijim preživljavanjem kao i da je STAS nezavisni prognostički faktor nesitnoćelijskog karcinoma pluća. STAS je kriterijum isključivanja adenokarcinoma in situ kao i minimalno invazivnog adenokarcinoma, te je bitan u dijagnostici i određivanju stadijuma tumora. Ukoliko se STAS uoči na klinastim „wedge“ resekcijama ili segmentektomijama, to ukazuje na povećan rizik od rekurentnosti tumora, te je potrebno uraditi naknadnu resekciju (Mino-Kenudson, 2020).







Slika 3. Prisustvo širenja tumora kroz alveolarne prostore (STAS), a) HEx100, b) HEx200

### 1.5 Porozne veze

Tokom 60-ih godina XX-og veka eksperimentima na animalnim modelima je uočeno da ćelije komuniciraju putem električnih signala kada je opisana difuzija malih fluorescentnih molekula (manjih od 1 kD) (Loewenstein i sar., 1965). Loewenstein i Kanno (Loewenstein i Kanno, 1967) su pokazali da normalni hepatociti komuniciraju putem prenosa električnih signala, ali da to nije slučaj među tumorskim ćelijama jetre. Kasnijim studijama na ćelijama humanih tumora štitaste žlezde kao i na kulturama ćelija, postavljena je hipoteza da u tumoru nema direktne komunikacije između ćelija. McNutt i Weinstein su metodom elektronske mikroskopije pokazali da ove veze među ćelijama koje se javljaju u normalnom epitelu nedostaju u ćelijama humanog skvamoznog karcinoma cerviksa (McNutt i Weinstein, 1969). Navedene veze su nazvane poroznim vezama (engl. *gap junctions*).

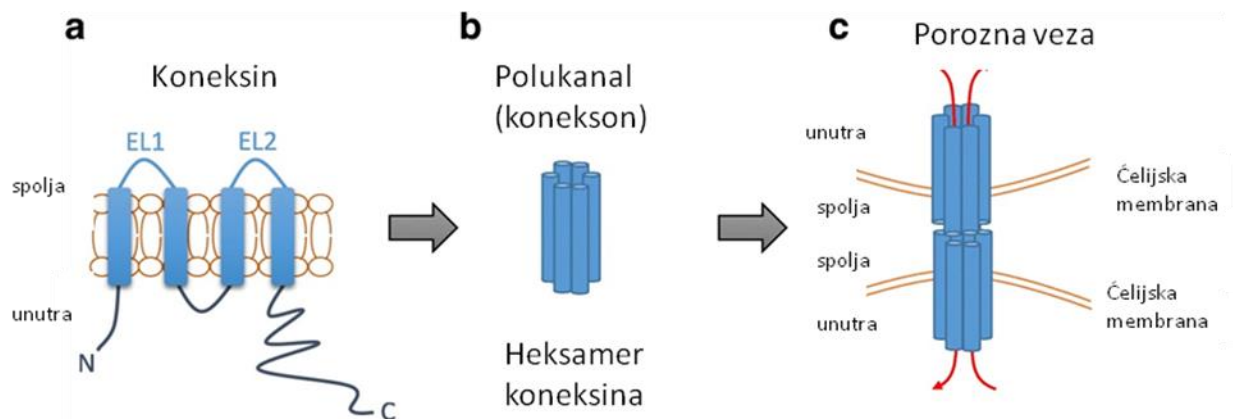
Porozne veze su međućelijski spojevi koji omogućavaju direktnu komunikaciju susjednih ćelija. Važne su u tkivnoj homeostazi, ćelijskom rastu i diferencijaciji. Omogućavaju razmenu metabolita između susjednih ćelija, kao i između ćelija i njihove okoline.

Ove veze su građene od proteina koneksina (Aasen i sar., 2019). Do sada je otkrivena 21 izoforma humanih koneksina, i prikazane su u Tabeli 5. Najčešće ispitavana izoforma među njima je koneksin 43 (Cx43) (Defamie i sar., 2014).

Tabela 5. Lista humanih izoformi koneksina (prema Söhl i Willecke, 2004).

Oznaka koneksina	Gen koji ga kodira	Hromozom na kom je lociran gen
hCx23		6
hCx25		6
hCx26	GJB2	13
hCx30.2 (hCx31.3)	GJE1	7
hCx30	GJB6	13
hCx31.9	GJA11	17
hCx30.3	GJB4	1
hCx31	GJB3	1
hCx31.1	GJB5	1
hCx32	GJB1	X
hCx36	GJA9	15
hCx37	GJA4	1
hCx40.1		10
hCx40	GJA5	1
hCx43	GJA1	6
hCx45	GJA7	17
hCx46	GJA3	13
hCx47	GJA12	1
hCx50	GJA8	1
hCx59	GJA10	1
hCx62		6

Koneksini (Slika 4A) se udružuju i prave heksamere sa centralnom porom, koji se nazivaju polukanali (engl. *hemichannels*) ili koneksoni (Slika 4B). Dva polukanala na susednim ćelijama se spajaju i formiraju poroznu vezu (Slika 4C), što omogućava brzo prenošenje malih molekula (<1 kDa) (Aasen i sar., 2019). Naime, porozne veze omogućavaju prenos jona, molekula kao što su adenzin trifosfat i drugi nukleotidi, aminokiseline, mali metaboliti (npr. glukoza), mikroRNA (uključujući mi-RNA 142, mi-R 223, mi-R 34a, mi-R 124-3p), sekundarni glasnici (kao što su cAMP, inozitol trifosfat, reaktivni oksidativni molekuli, glutation), pa čak i hemioterapijski lekovi, koji se prenose iz citoplazme jedne ćelije u citoplazmu druge ćelije (Aasen i sar., 2019). Ovaj proces prenosa molekula omogućen je putem slobodne difuzije, a ne aktivnog transporta. Otvaranje i zatvaranje kanala poroznih veza uslovljeno je faktorima kao što su pH, fosforilacija koneksina, kao i unutarćelijska koncentracija jona kalcijuma.



Slika 4. Građa poroznih veza. A. Molekul koneksina kao integralni transmembranski protein. Uočavaju se svi segmenti molekula koneksina uključujući jedan citoplazmatski N-terminus, dve ekstracelularne petlje (EL1 i EL2), jednu citoplazmatsku petlju, četiri transmembranska domena, kao i citoplazmatski C-terminus. B. Konekson ili polukanal nastaje udruživanjem šest molekula koneksina koji su raspoređeni oko centralne pore. C. Porozna veza (engl. *gap junction*). Dva polukanala na susednim ćelijama se spajaju i formiraju poroznu vezu, što omogućava brzo prenošenje malih molekula između tako povezanih ćelija. *Izvor: Wu i Wang, 2019.*

Pored učešća u formiranju poroznih veza, koneksini formiraju polukanale koji omogućavaju komunikaciju sa ekstraćelijskim matriksom, a omogućavaju i interakcije proteina preko C-terminusa aktivirajući signalne puteve odgovorne za ćelijski rast i proliferaciju (Mulkearns-Hubert i sar., 2020). C-terminus koneksina utiče i na rearanžman citoskeleta u ćeliji i na njenu pokretljivost. Najznačajniji primeri ovih funkcija izvedeni su na glijalnim i neuronalnim ćelijama gde je pokazana veza između ekspresije koneksina i ćelijske pokretljivosti i invazivnosti (Bates i sar., 2007; Cina i sar., 2009).

Porozne veze nedostaju u ćelijama koje se dele, što je važno da bi se izbegla transmisija metabolita između ćelija koje se dele i njihove okoline. Uloga koneksina u kancerogenezi pretpostavljena je još 60-ih godina prošlog veka na ćelijama tumora jetre kod pacova, gde su Loewenstein i Kanno uočili odsustvo poroznih veza, te je pretpostavljena tumor supresorska uloga poroznih veza (Loewenstein i Kanno, 1967). Kasnije studije su pak pokazale kontradiktorne rezultate, tako da još uvek nije u potpunosti razjašnjeno da li koneksin ima tumor supresorsku ili onkogenu ulogu. Imajući u vidu da su međućelijske veze značajan deo kancerogeneze, važno je ispitati ekspresiju koneksina 43 kako u primarnim tumorima tako i u metastazama. Međutim, uloga koneksina 43 u kancerogenezi je još uvek nedovoljno rasvetljena i kontradiktorna. Zbog toga je važno da se ispita ekspresija koneksina 43 u različitim primarnim i sekundarnim tumorima da bi se objasnila uloga ovog proteina u nastanku i progresiji malignih tumora.

### *1.6 Ekspresija koneksina u malignim tumorima*

Pored normalne ekspresije u različitim ćelijama, naročito u kardiomiocitima, neuronima i osteocitima, koneksin 43 se eksprimira i u tumorima (Wu i Wang, 2019). Postoji više studija koje su se bavile istraživanjem ekspresije koneksina u malignim neoplazmama. Broj studija se uvećava sa razvojem raznih peptida i antitela, i razmatra se uloga koneksina u tumorima kroz njihovu aktivnost u okviru poroznih veza, polukanala, kao i signalnih puteva nezavisno od formiranja kanala. Međutim, značaj koneksina 43 u tumorima nije dovoljno jasan, i podaci iz literature koji se odnose na njegovu ulogu u tumorskom rastu i metastatskom potencijalu su kontradiktorni (Wu i Wang, 2019; Kanczuga-Koda i sar., 2006; Han i sar., 2011; Tittarelli i sar., 2015).

Pored toga, različite studije su registrovale različitu ćelijsku lokalizaciju koneksina 43, uključujući membransku, citoplazmatsku i kombinovanu (Kanczuga-Koda i sar., 2006; Han i sar., 2011). Većina dosadašnjih istraživanja se bavila ispitivanjem ekspresije koneksina 43 u melanomu i karcinomima jednjaka, dojke i debelog creva (Kanczuga-Koda i sar., 2006; Han i sar., 2011; Tanaka i sar., 2016). Ove studije su ukazale na povezanost ekspresije koneksina 43 sa progresijom i prognozom bolesti. Međutim, literaturni podaci o ekspresiji koneksina 43 kod različitih tipova nesitnoćelijskih karcinoma pluća, kao i podaci o njegovoj ulozi u karcinomima pluća su oskudni (Zhao i sar. 2013; Jinn i Inase, 2010). Nejasno je da li se ekspresija koneksina 43 u primarnom karcinomu pluća razlikuje između tumora i njegovih metastaza, kao i da li postoji heterogenost ekspresije koneksina 43 između invazivnog tumorskog fronta i centralnog dela tumora.

### *1.7 Epitelnomezehimna tranzicija*

Epitelnomezehimna tranzicija je evolutivno očuvan proces u kome ćelije menjaju epitelni u mezenhimni fenotip. Epitelnomezehimna tranzicija je važna u razvoju embriona, gastrulaciji, razvoju srca i drugih organa (Thiery i sar., 2009). Nedavne studije pokazale su da je epitelnomezehimna tranzicija povezana sa reparacijom i regeneracijom tkiva, fibrozom ali i progresijom tumora. Epitelnomezehimna tranzicija je proces u kome epitelne ćelije gube polaritet i dobijaju karakteristike mezenhimnih ćelija, što im omogućava kretanje kroz vezivno tkivo i pojačava metastatski potencijal.

Osnovni markeri epitelnomezehimne tranzicije su E-kadherin,  $\beta$ -katenin i vimentin. U procesu epitelnomezehimne tranzicije, epitelne ćelije gube međućelijsku adhezivnost i polaritet, smanjuju ekspresiju epitelnih markera, kao što je E-kadherin, a pojačavaju ekspresiju mezenhimnog markera kakav je vimentin. Gubitak E-kadherina smatra se važnim korakom u procesu epitelnomezehimne tranzicije.

E-kadherin, glikoprotein zavisao od kalcijuma, je sastavni deo adherentnih veza na ćelijskoj membrani i odgovaran je za adheziju među ćelijama kao i održavanje citoskeleta u ćeliji. Smatra se da gubitak E-kadherina doprinosi progresiji karcinoma utičući na proliferaciju, invaziju i metastaze. Otkriveni su brojni faktori kao transkripcioni represori E-kadherina tokom epitelnomezehimne tranzicije. Neki od represora E-kadherina su Snail, ZEB i bHLH familija faktora kao što su Twist, KLF8 i FoxC2 (Xiao i He, 2010). Ispitivanjem na ćelijskoj kulturi nesitnoćelijskog karcinoma pluća je pokazano da ćelije koje su ekspimirale E-kadherin imaju i veću senzitivnost za inhibiciju epidermalnog faktora rasta (EGFR). Nasuprot tome, ćelije koje su ekspimirale vimentin i/ili fibronektin nisu bile osetljive na inhibiciju EGFR u in vitro i ksenograft modelima (Thomson i sar., 2005).

$\beta$ -katenin je protein koji igra važnu ulogu u ćelijama u normalnim uslovima. Kodira ga CTNNB1 gen i važan je deo proteinskog kompleksa kadherina.  $\beta$ -katenin je važan za regulaciju ćelijske adhezije ali i

ključan transkripcijski faktor u Wnt signalnom putu. Navedeni signalni put je evolucijski visoko očuvan i učestvuje u važnim ćelijskim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija, apoptoza i drugo (Reuter i sar., 2017).

Vimentin je ćelijski protein koji ulazi u sastav intermedijernih filamenata, komponenti citoskeleta. Pokazano je da su promene u ekspresiji intermedijernih filamenata često povezane sa progresijom kancera, a posebno sa fenotipima koji dovode do povećane migracije ćelija i tkivne invazije (Strouhalova i sar., 2020). Nakon rane ekspresije u mezenhimalnim ćelijama tokom embrionalnog razvoja, vimentin se normalno ne eksprimira u epitelnim tkivima. Međutim, nakon onkogene transformacije epitelnih ćelija, dolazi do povećane ekspresije vimentina i gubitka ekspresije keratina (Kokkinos i sar., 2007). Da bi se omogućilo kretanje tumorskih ćelija i širenje tumora, ćelije prolaze kroz proces epitelnomezenhimne tranzicije, tokom koga se dešava transformacija ćelija u smislu gubitka klasičnog epitelnog polariteta i slabljenje ćelijskih veza. U tom smislu povećana ekspresija vimentina ukazuje na akviziciju migratornog i invazivnog tumorskog fenotipa.

Dosadašnje studije su pokazale da je epitelnomezenhimna tranzicija povezana sa metastazama, stečenom rezistencijom na lekove, kao i progresijom mnogih tumora. Studije na karcinomu dojke su pokazale da tumorske ćelije putem epitelnomezenhimne tranzicije mogu da se transformišu u karcinomske stem ćelije sa sposobnošću samoobnavljanja, regeneracije i diferencijacije (Morel i sar., 2008). Mehanizmi epitelnomezenhimne tranzicije su opisani i kod karcinoma prostate i pankreasa (Hugo i sar., 2007; Lee i sar., 2006), ali su kod karcinoma pluća manje izučavani. Diseminovane tumorske ćelije u udaljenim organima podležu reverznom procesu mezenhimnoepitelne tranzicije koja je neophodna za kolonizaciju udaljenog organa kao i formiranje makrometastaza.

Smatra se da koneksini učestvuju i u ćelijskoj adheziji i migraciji, važnim elementima i za epitelnomezenhimnu tranziciju. S obzirom na ulogu epitelnomezenhimne tranzicije u procesu metastaziranja, za bolje razumevanje uloge koneksina 43 u tom procesu, značajno je ispitati kako markeri epitelnomezenhimne tranzicije koreliraju sa stepenom ekspresije koneksina 43 kod karcinoma pluća. Ovakve studije na karcinomu pluća su retke, bazirane su na relativno malim grupama pacijenata i ograničenom broju markera (Zhao i sar. 2013; Jinn i Inase, 2010), i postoji nedovoljno podataka o tome da li i u kojoj meri koneksin 43 i markeri epitelnomezenhimne tranzicije različito koreliraju između tumora i njihovih metastaza. Nije ispitivano ni da li tumorski invazivni front karcinoma pluća, koji je posebno značajan za širenje tumora, pokazuje različitu ekspresiju koneksina 43 od ostatka tumora, posebno u kontekstu korelacije sa markerima epitelnomezenhimne tranzicije.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Definisali smo sledeće ciljeve:

1. Ispitati ekspresiju i razliku u ekspresiji koneksina 43 u različitim histopatološkim tipovima nesitnoćelijskog karcinoma pluća;
2. Ispitati ekspresiju koneksina 43 u invazivnom tumorskom frontu i centralnom delu tumora kod primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća;
3. Utvrditi povezanost ekspresije koneksina 43 sa markerima epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća;
4. Ispitati razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća i njegovih limfogenih i hematogenih metastaza.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Uzorak

U ovom istraživanju korišćene su dve grupe uzoraka.

- Jednu grupu su činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka hirurških resekcija pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća sa pripadajućim limfnim čvorovima operisanih u Kliničko-bolničkom centru „Bežanijska kosa“ u Beogradu u periodu između 2012. i 2016. godine. Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili: učinjena hirurška resekcija tumora, histopatološka dijagnoza adenokarcinoma ili skvamoznog karcinoma pluća, kao i dostupnost parafinskih kalupa. Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su prisustvo metastaza u plućima, kao i drugi histološki tipovi karcinoma pluća, uključujući i mešovite tipove. Pregledana je dokumentacija Službe za patologiju Kliničko-bolničkog centra „Bežanijska kosa“, sakupljeni su njihovi parafinski kalupi iz arhive Službe za patologiju. Beleženi su dostupni podaci o pacijentu i tumoru, a posebno o prisustvu limfogenih metastaza karcinoma pluća. Ukupan broj pacijenata čiji su isecci korišćeni u ovoj tezi je bio 88 (45 muških i 43 ženskih). Opseg starosti ovih pacijenata je bio od 43 do 79 godina ( $61,9 \pm 7,4$  godina). Adenokarcinom je bio prisutan kod 52 pacijenta, dok je skvamozni karcinom bio prisutan kod 36 pacijenata. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti između ove dve grupe pacijenata ( $t$  test:  $p=0,8$ ).
- Drugu grupu su činili parafinski kalupi tkivnih uzoraka primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća kao i prisutnih limfogenih i hematogenih metastaza dobijenih sa obdukcija. Pregledani su obdukcioni protokoli izvršenih obdukcija na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu između 2016. i 2020. godine. Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili: primarni karcinom pluća, histopatološka dijagnoza adenokarcinoma ili skvamoznog karcinoma pluća, i dostupnost parafinskih kalupa. Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su prisustvo metastaza u plućima, kao i drugi histološki tipovi karcinoma pluća, uključujući i mešovite tipove. Beleženo je prisustvo metastatskih depozita u limfnim čvorovima i organima. Ukupan broj individua čiji su isecci korišćeni u ovoj tezi je bio 29 (18 muških i 11 ženskih). Opseg starosti ovih pacijenata je bio od 49 do 86 godina ( $68,8 \pm 10,1$  godina). Adenokarcinom je bio prisutan kod 19 pacijenta, dok je skvamozni karcinom bio prisutan kod 10 pacijenata.
- Ovo istraživanje je sprovedeno uz saglasnost Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 1322/II-3).

#### 3.2 Priprema uzoraka

U okviru pripreme za imunohistohemijsku analizu, parafinski kalupi hirurških resekcija i obdukcionog materijala karcinoma pluća i prisutnih metastaza tretirani su na dva načina.

Prvo, kalupi su sečeni na mikrotomu na isečke debljine 4 mikrona i lepljeni na pločice, za pripremu preseka celih kalupa (eng. *whole slide*). Ovi isecci su korišćeni za bojenje hematoksilinom i eozinom, kao i bojene imunohistohemijskom metodom antitelom na koneksin-43 (videti odeljak o imunohistohemiji). Semikvantitativnom metodom analizirali smo distribuciju ekspresije koneksina 43, intenzitet ekspresije, kao i lokalizaciju.

Nakon toga, koristili smo specijalizovanu iglu unutrašnjeg dijametra 3 mm (*Miltex*) za uzimanje cilindričnih uzoraka iz parafinskih kalupa („kalupi donora“) za pravljenje tkivnog mikroniza. Naime, pod optičkim mikroskopom Olympus BX41, na isečcima celih kalupa obojenim hematoksilinom i eozinom, obeležena su polja invazivnog tumorskog fronta kao i polja centralnog dela tumora, i metastatskih depozita u limfnim nodusima, iz kojih su zatim uzeti tkivni cilindri. Prethodno su pripremljeni recipijentni parafinski kalupi koji su služili za prijem cilindra tkiva dobijenih sa parafinskih kalupa donora. Na taj način, formiran je tkivni mikroniz, u skladu sa preporukama prethodnih studija (Fonseca i sar., 2014). Recipijentni kalupi tkivnog mikroniza su sečeni na mikrotomu na isečke debljine 4 mikrona i lepljeni na pločice za bojenje hematoksilinom i eozinom, kao i za imunohistohemiju.

### 3.3 Imunohistohemijsko bojenje

Nakon deparafinizacije, dehidratacije, demaskiranja antigena, kao i blokade endogene peroksidaze i nespecifičnog vezivanja, celi preseci a kasnije i tkivni mikronizovi su tretirani primarnim antitelom na koneksin 43 (*Sigma Aldrich*) u 1% bovinom serumskom albuminu (eng. *bovine serum albumine, BSA*) u fosfatom puferisanom fiziološkom rastvoru (eng. *phosphate-buffered saline, PBS*), kao i antitelima na markere epitelnomezehimne tranzicije, kao što su E-kadherin (*Santa Cruz*),  $\beta$ -katenin (*DAKO*) i vimentin (*Novocastra*). Za negativne kontrole, umesto primarnog antitela, korišćen je samo 1% BSA u PBS. Nakon ispiranja u PBS-u, isecci su tretirani odgovarajućim sekundarnim antitelima. Nakon bojenja sa DAB (*DAKO*), radi bolje vizualizacije tkivne arhitekture i ćelija, isecci su potopljeni u rastvor hematoksilina, u skladu sa standardnom imunohistohemijskom procedurom (Kanczuga-Koda i sar., 2006).

Evaluacija ekspresije detektovanih proteina je obavljena primenom semikvantitativne metode kako na celim presecima tako i na tkivnim mikronizovima.

- Evaluacija ekspresije koneksina 43 u tumorima je vršena na 10 polja uveličanja 200x kada su u pitanju celi preseci, odnosno na kompletnom cilindru kada su u pitanju tkivni mikronizovi. Evaluacija je obuhvatila analizu procenta tumorskih ćelija koje ekspimiraju koneksin 43 (distribucija ekspresije) i analizu intenziteta bojenja kod pozitivnih tumorskih ćelija (intenzitet ekspresije). Konkretno, distribucija ekspresije koneksina 43 u tumorima je klasifikovana na sledeći način, prema preporukama iz literature (Kanczuga-Koda i sar., 2006): 0, odsustvo ekspresije (procenat pozitivnih tumorskih ćelija <10%); umerena ekspresija (procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $\geq$ 10% i <50%); i izražena ekspresija (procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $\geq$ 50%). Intenzitet ekspresije koneksina 43 je klasifikovan u sledeće četiri kategorije: 0 (odsustvo ekspresije); 1 (nizak intenzitet ekspresije); 2 (umeren intenzitet ekspresije); i 3 (visok intenzitet ekspresije). Beležena je i ćelijska lokalizacija ekspresije koneksina 43 kao membranska, citoplazmatska, kombinovana membranskocitoplazmatska, nuklearna i kombinovana nuklearnocitoplazmatska. Pored toga, beleženo je i prisustvo širenja tumora kroz alveolarne prostore (engl. *spread through air spaces, STAS*), kao i ekspresija koneksina 43 u STAS-u na celim presecima i u stromalnim ćelijama.
- Evaluacija ekspresije E-kadherina u tumorima je vršena na površini celog cilindra tkivnog mikroniza, i obuhvatila je analizu procenta tumorskih ćelija koje ekspimiraju dati protein (distribucija ekspresije). Konkretno, distribucija ekspresije E-kadherina u tumorima je



klasifikovana kao 0 (odsustvo ekspresije, tj. procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $<10\%$ ) i 1 (prisutna ekspresija, tj. procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $\geq 10\%$ ).

- Evaluacija ekspresije  $\beta$ -katenina u tumorima je vršena na površini celog cilindra tkivnog mikroniza, i obuhvatila je analizu procenta tumorskih ćelija koje ekspimiraju dati protein (distribucija ekspresije). Distribucija ekspresije  $\beta$ -katenina u tumorima je klasifikovana kao 0 (odsustvo ekspresije, tj. procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $<10\%$ ) i 1 (prisutna ekspresija, tj. procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $\geq 10\%$ ).
- Evaluacija ekspresije vimentina u tumorima je vršena na površini celog cilindra tkivnog mikroniza, i obuhvatila je analizu procenta tumorskih ćelija koje ekspimiraju dati protein (distribucija ekspresije). Distribucija ekspresije vimentina u tumorima je klasifikovana kao 0 (odsustvo ekspresije, tj. procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $<10\%$ ) i 1 (prisutna ekspresija, tj. procenat pozitivnih tumorskih ćelija  $\geq 10\%$ ).

### 3.4 Statistička analiza

Statistička analiza je obavljena u statističkom paketu SPSS, verzija 15. Za opisivanje karakteristika operisanih i obdukovanih osoba, kao i njihovih tumora, korišćene su deskriptivne statističke metode, u skladu sa tipom varijable (frekvencije i procenti za kategorijalne varijable; aritmetička sredina i standardna devijacija za kvantitativne varijable).

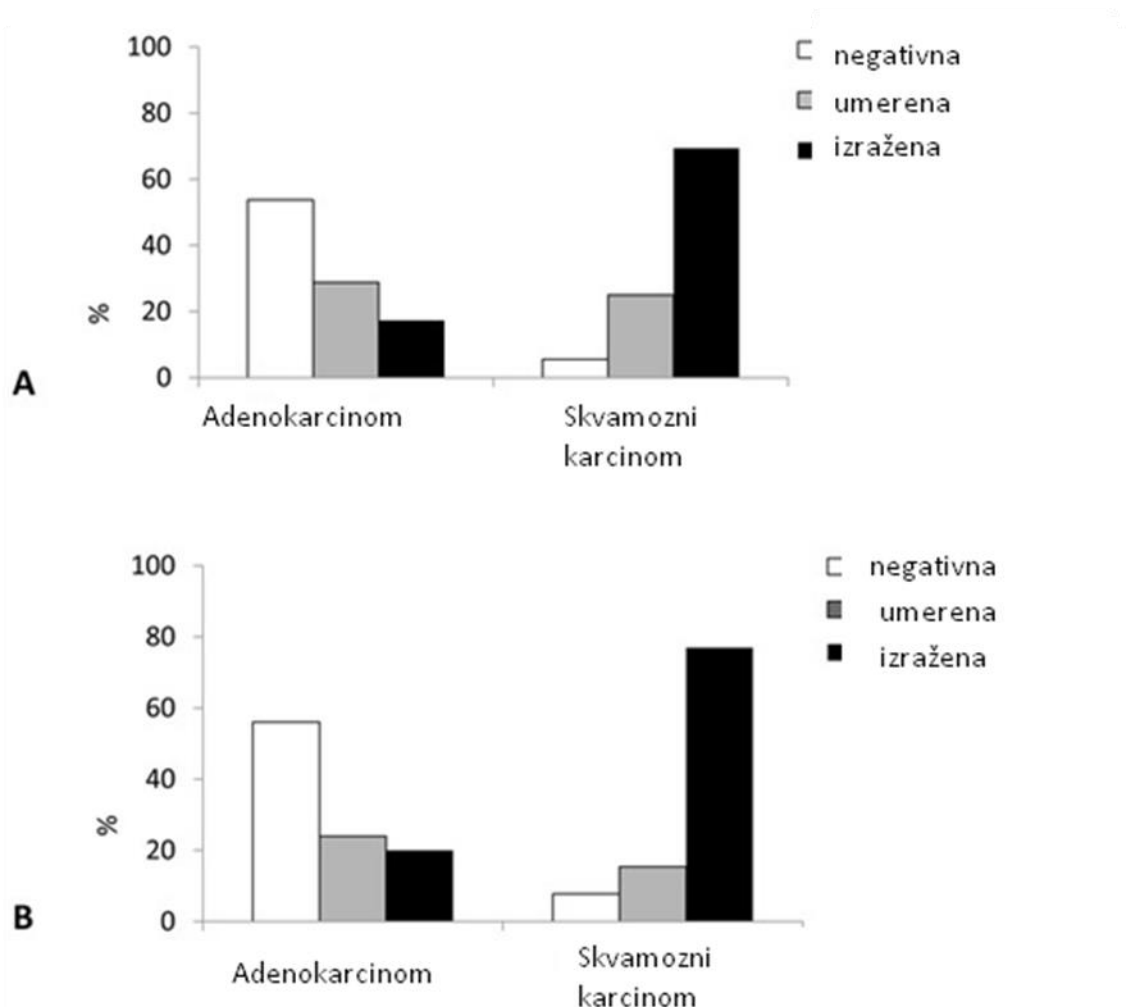
Kolmogorov-Smirnov test je korišćen za procenu normalnosti raspodele. Za ispitivanje razlike u starosti između pacijenata sa različitim patohistološkim tipovima korišćen je Studentov t-test. Za ispitivanje razlike u ekspresiji detektovanih imunohistohemijskih markera između različitih patohistoloških tipova karcinoma pluća i metastaza korišćen je hi kvadrat test ili Fišerov test tačne verovatnoće ukoliko nisu ispunjeni uslovi za primenu hi kvadrat testa. Za poređenje ekspresije detektovanih imunohistohemijskih markera između invazivnog fronta i centralnog dela tumora, kao i između primarnih i metastatskih tumora, koristili smo test marginalne homogenosti. Za ispitivanje odnosa ekspresije koneksina 43 i ekspresije markera epitelnomezenhimne tranzicije, korišćen je test marginalne homogenosti. Nivo statističke značajnosti je bio postavljen na 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Analiza celih preseka

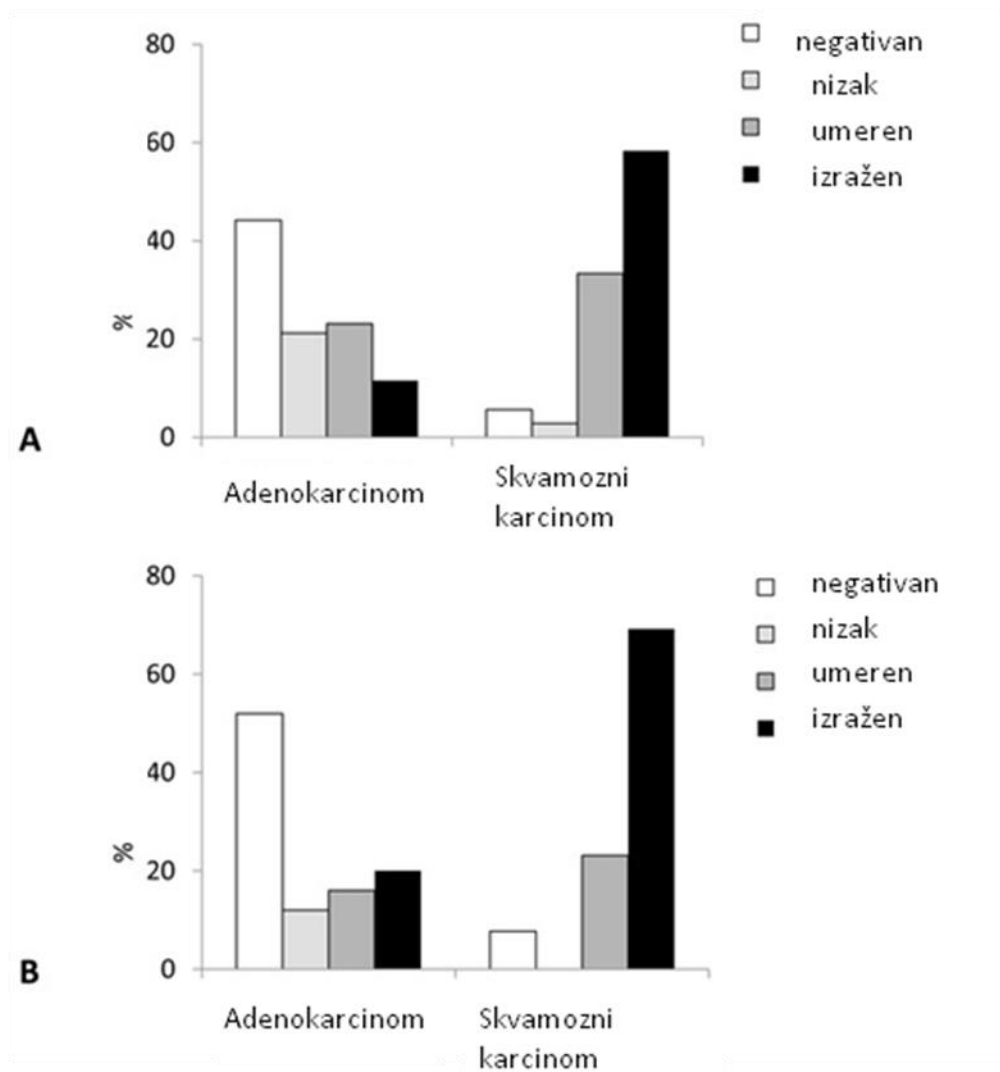
#### 4.1.1 Ekspresija koneksina 43 u primarnom tumoru

Imunohistohemijska analiza celih isečaka tkivnih uzoraka je pokazala da je skvamozni karcinom pokazao statistički značajno veću distribuciju ekspresije koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom ( $p < 0,001$ ). Naime, skoro 70% uzoraka sa skvamoznim karcinomom je pokazalo visok stepen ekspresije koneksina 43, dok je adenokarcinom pokazao nedostatak ekspresije koneksina 43 u više od 50% slučajeva (Slika 5).

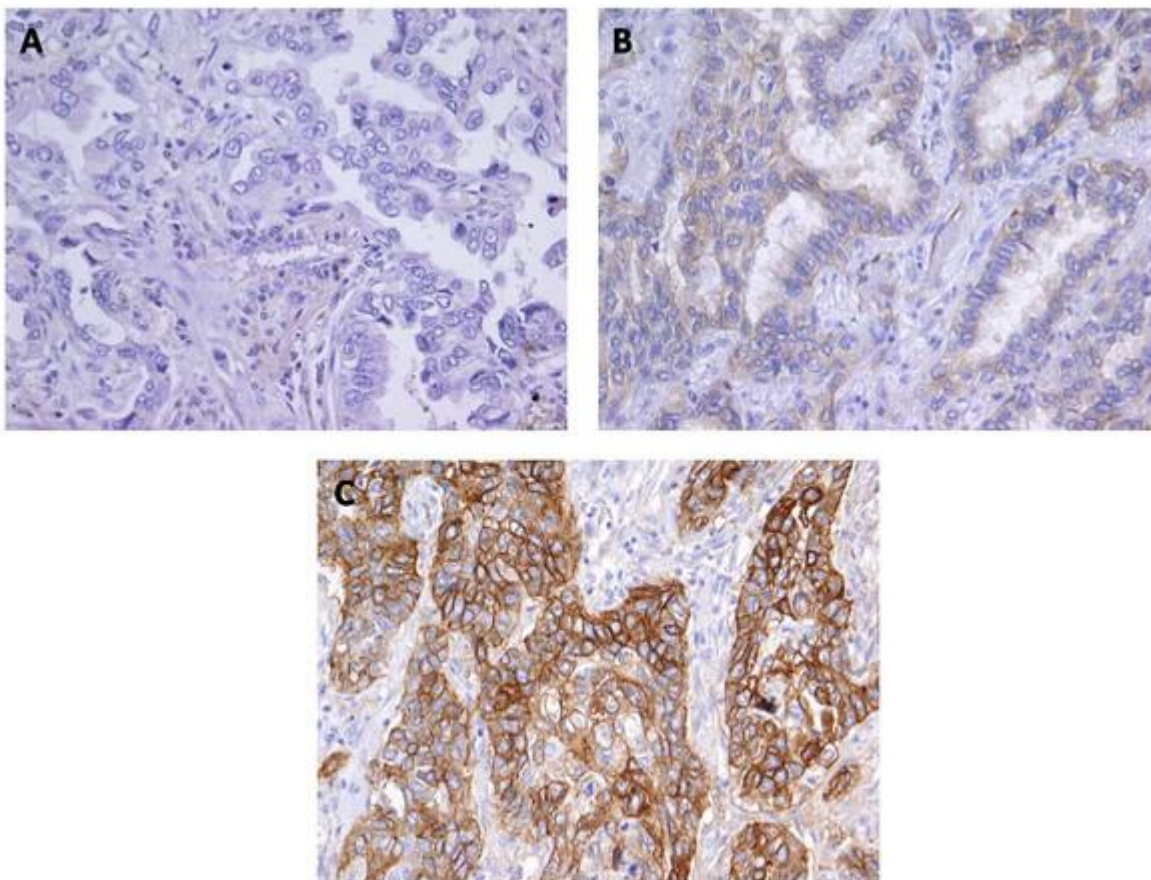


Slika 5. Distribucija ekspresije koneksina 43 u primarnom karcinomu pluća (A) i metastazi karcinoma pluća u limfnom čvoru (B). Negativna ekspresija <10% tumorskih ćelija, umerena ekspresija, 10%–50% pozitivnih tumorskih ćelija, izražena ekspresija >50% tumorskih ćelija.

Slično tome, intenzitet ekspresije koneksina 43 je bio statistički značajno veći u skvamoznom karcinomu u odnosu na adenokarcinom ( $p < 0,001$ ). Više od 90% uzoraka sa skvamoznim karcinomom je pokazalo visok intenzitet ekspresije koneksina 43 (intenzitet 2 i 3), dok je svega 30% uzoraka sa adenokarcinomom imalo visok intenzitet ekspresije koneksina 43 (intenzitet 2 i 3) (Slike 6 i 7).

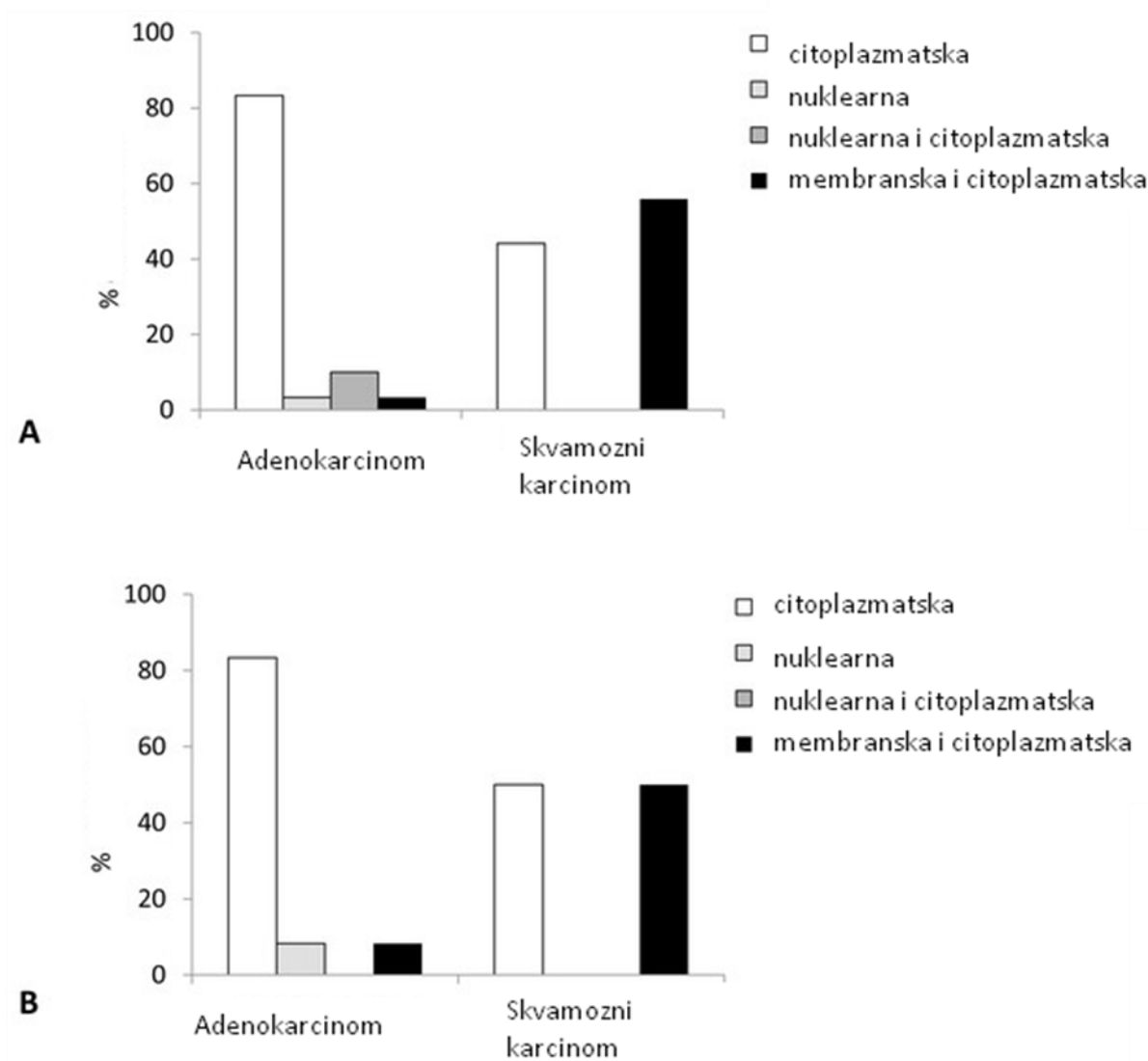


Slika 6. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom karcinomu pluća (A) i metastazi karcinoma pluća u limfnom čvoru (B).



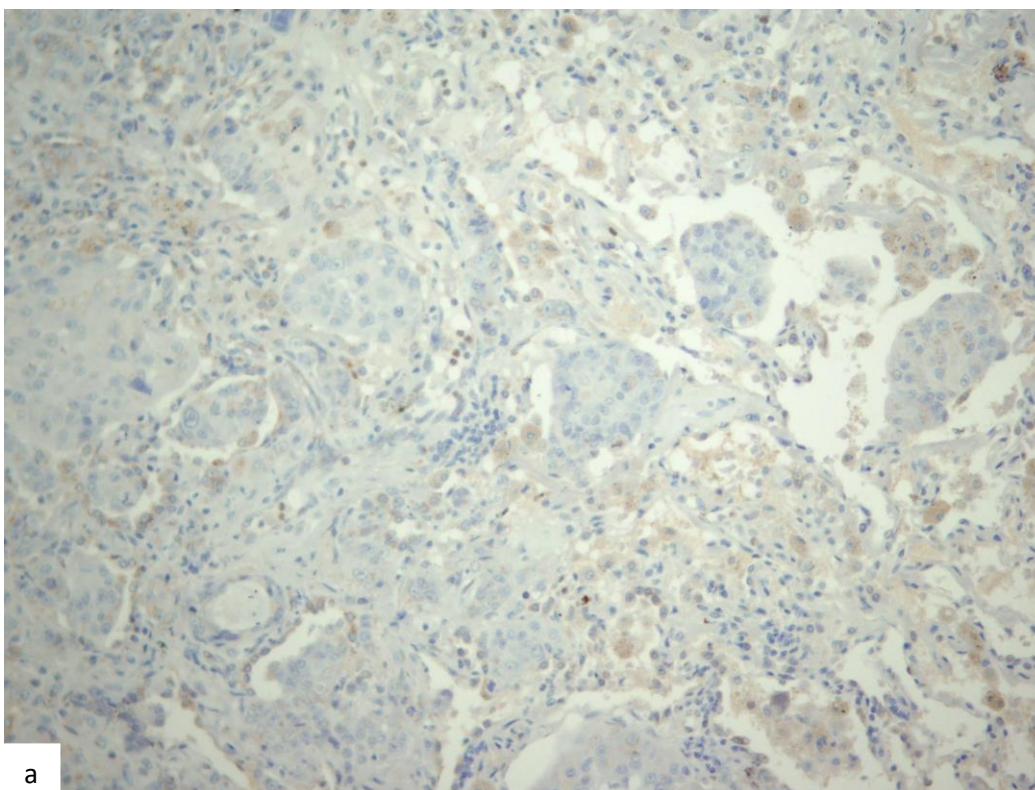
Slika 7. Imunohistohemijsko bojenje na koneksin 43. (A) odsustvo ekspresije koneksina 43; (B) nizak nivo ekspresije koneksina 43 u adenokarcinomu; (C) visok nivo ekspresije koneksina 43 u skvamoznom karcinomu. Uveličanje,  $\times 400$ .

Lokalizacija ekspresije koneksina 43 je najčešće bila citoplazmatska i kombinovana (membranska i citoplazmatska), dok je vrlo retko bila prisutna nuklearna ekspresija ili kombinacija nuklearne i citoplazmatske ekspresije. Poređenjem histoloških tipova karcinoma pluća, uočena je značajna razlika između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma ( $p < 0,001$ ). Naime, u adenokarcinomima, ekspresija koneksina 43 je najčešće bila u citoplazmi (83.3% slučajeva), dok su kombinacija nuklearne i citoplazmatske ekspresije, nuklearna ekspresija, i kombinacija citoplazmatske i membranske ekspresije bile retke. Za razliku od adenokarcinoma, skvamozni karcinom nije pokazao nuklearnu ekspresiju koneksina 43, već je ekspresija bila citoplazmatska ili kombinovano membranskocitoplazmatska (Slika 8).

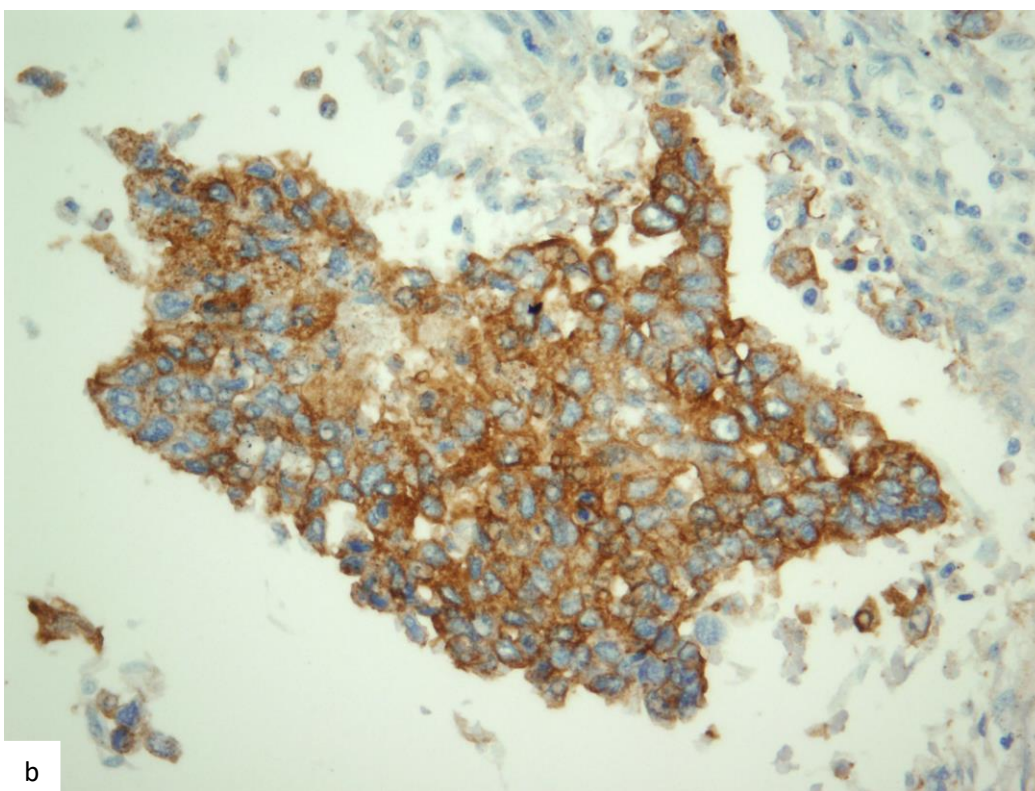


Slika 8. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u primarnom karcinomu pluća (A) i metastazi karcinoma pluća u limfnom čvoru (B).

Među ispitivanih 88 uzoraka, prisustvo STAS-a je bilo moguće analizirati u 68 uzoraka. Konkretno, STAS je pronađen kod 11 od 25 uzoraka skvamoznog karcinoma, i kod 18 od 43 uzoraka adenokarcinoma ( $p=0,341$ ). Samo prisustvo STAS-a se nije značajno razlikovalo između tumora koji su dali limfogene metastaze i onih koji nisu ( $p=1$  kod adenokarcinoma;  $p=0,697$  kod skvamoznih karcinoma). Međutim, u skvamoznom karcinomu, pozitivnost na koneksin 43 u STAS-u je imala tendenciju da bude veća kod tumora koji su dali limfogene metastaze u odnosu na one koji nisu ( $p=0,055$ ). Za razliku od toga, kod adenokarcinoma, nije bilo značajne razlike u pozitivnosti na koneksin 43 u STAS-u između tumora koji su dali limfogene metastaze i onih koji nisu ( $p=0,668$ ) (Slika 9).



a



b

Slika 9. Ekspresija koneksina-43 u STAS-u: a) odsustvo ekspresije, x200, b) prisutna ekspresija, x400.



#### **4.1.2 Ekspresija koneksina 43 u metastazama u limfnom čvoru**

U grupi pacijenata kod kojih se tumor proširio na regionalne limfne čvorove (n=38), bili su dostupni parafinski kalupi kako primarnog tumora tako i metastaze u limfnom čvoru. U limfnim čvorovima ovih pacijenata, skvamozni karcinom je pokazao statistički značajno veću distribuciju koneksina 43 nego adenokarcinom ( $p=0,002$ ). Naime, visok nivo ekspresije je pronađen kod 76,9% slučajeva sa skvamoznim karcinomom i samo 20% slučajeva sa adenokarcinomom (Slika 5).

Slično tome, skvamozni karcinom je pokazao veći intenzitet ekspresije koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom. Naime, više od 90% slučajeva sa skvamoznim karcinomom je pokazalo intenzitet ekspresije 2 i 3 (Slika 6), dok je 64% slučajeva sa adenokarcinomom imalo intenzitet ekspresije 0 i 1 ( $p=0,004$ ) (Slika 6).

Lokalizacija ekspresije koneksina 43 je najčešće bila citoplazmatska i kombinovana (membranska i citoplazmatska), sa samo jednim slučajem nuklearne ekspresije. Pronađena je razlika u lokalizaciji ekspresije koneksina 43 između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma, ali statistička značajnost nije postignuta ( $p=0,069$ ). Naime, više od 80% slučajeva adenokarcinoma je ekspresiralo koneksin 43 samo u citoplazmi, dok je kod skvamoznog karcinoma postojala slična učestalost čiste citoplazmatske i kombinovane citoplazmatskomembranske ekspresije koneksina-43 (Slika 8).

#### **4.1.3 Razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog tumora i limfogene metastaze**

Poređenje ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i limfogenih metastaza je pokazalo da u većini slučajeva sa adenokarcinomom (17/25) nije bilo promene u distribuciji ekspresije koneksina 43. Smanjenje ekspresije (ili gubitak ekspresije) je pronađeno kod 20%, dok je povećanje ekspresije (ili pojava ekspresije) nađeno kod 12% slučajeva. Za razliku od adenokarcinoma, kod skvamoznog karcinoma nije zabeležen gubitak ili smanjenje ekspresije koneksina 43 u limfogenim metastazama, dok je u jednom slučaju uočeno povećanje ekspresije koneksina 43.

Što se tiče intenziteta ekspresije koneksina 43, skvamozni karcinom je u skoro svim slučajevima imao sličan intenzitet ekspresije (intenzitet 2 i 3) između primarnog tumora i metastaza. Za razliku od toga, adenokarcinom je pokazao smanjenje intenziteta u 6 od 25 slučajeva i povećanje intenziteta u 3 od 25 slučajeva u limfogenoj metastazi u odnosu na primarni tumor.

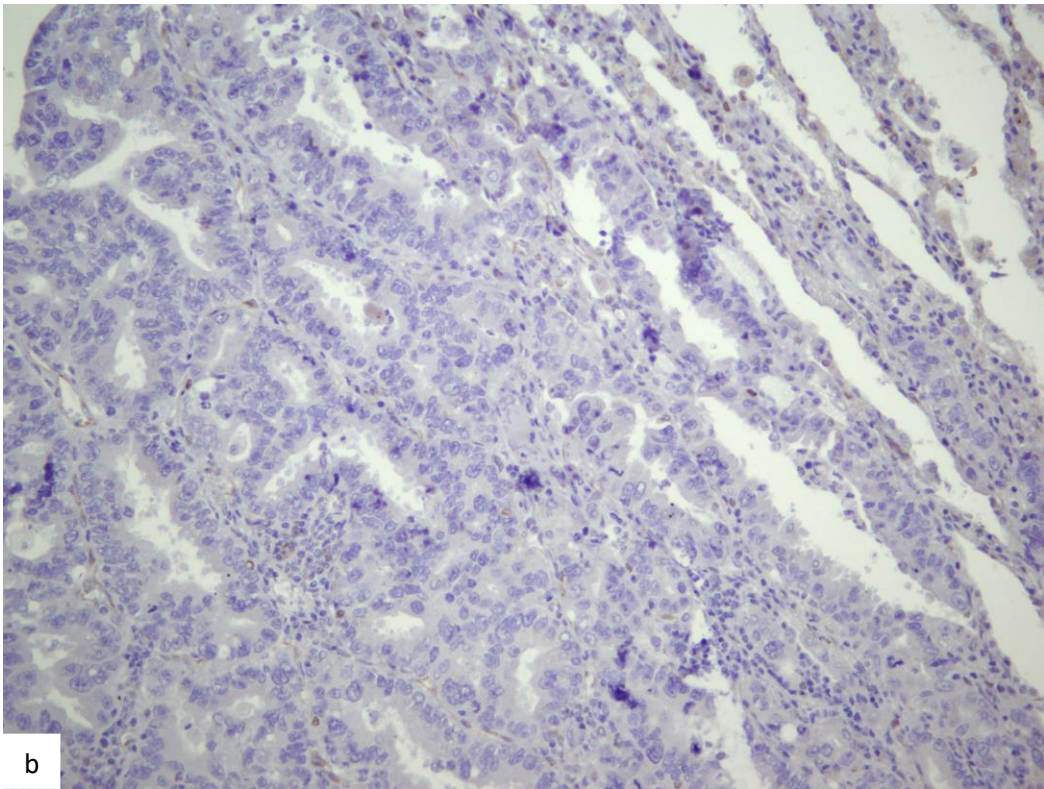
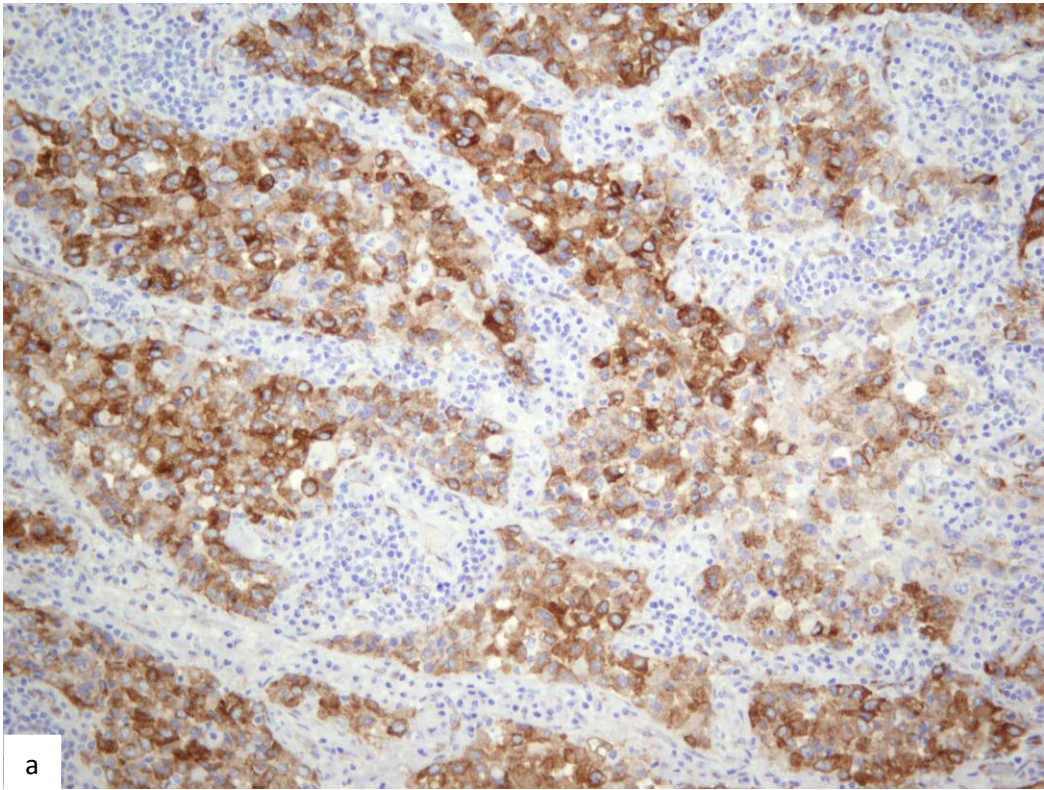
## **4.2 Analiza tkivnog mikroniza**

### **4.2.1 Ekspresija koneksina 43 u invazivnom frontu i centralnom delu primarnog tumora i metastazi u limfnom čvoru**

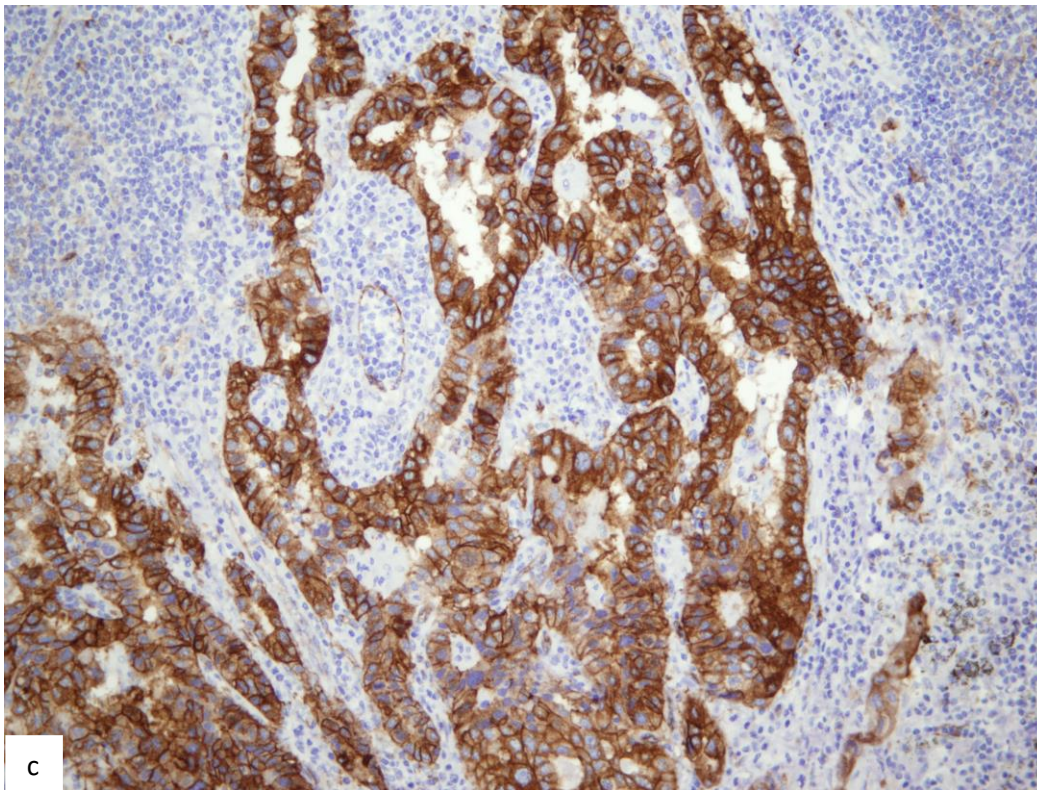
Na tkivnim mikronizovima je ispitivana ekspresija koneksina 43 u invazivnom frontu i centralnom delu primarnog tumora, kao i u limfogenoj metastazi ukoliko je bila prisutna.

#### *4.2.1.1 Distribucija ekspresije koneksina 43*

Kod adenokarcinoma, distribucija ekspresije koneksina 43 (Slika 10; Tabele 6-8) se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=0,439$ ), između invazivnog fronta i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,109$ ), kao ni između centralnog dela tumora i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,593$ ).







Slika 10. Ekspresija koneksina 43 u adenokarcinomu pluća: a) centralni deo tumora, b) invazivni front, c) limfogeni metastaza, x200

**Tabela 6. Distribucija ekspresije koneksina 43 u centralnom delu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	33	64,7
1	12	23,5
2	6	11,8
Ukupno	51	100

**Tabela 7. Distribucija ekspresije koneksina 43 u invazivnom frontu adenokarcinoma**

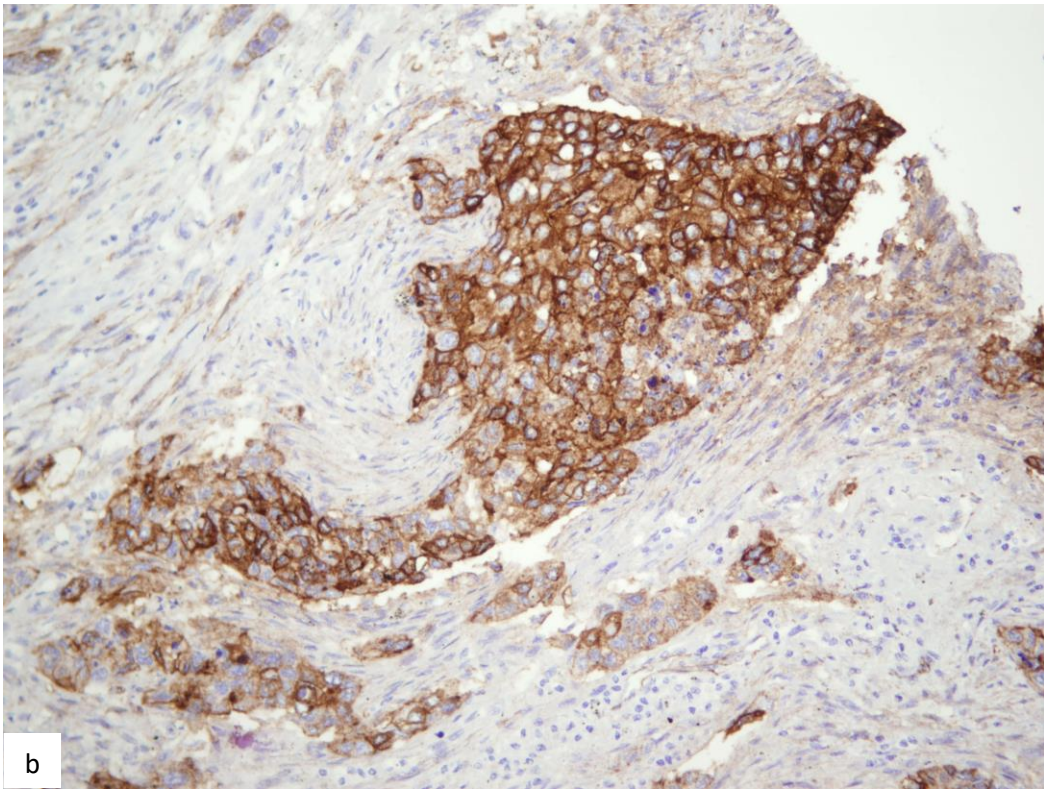
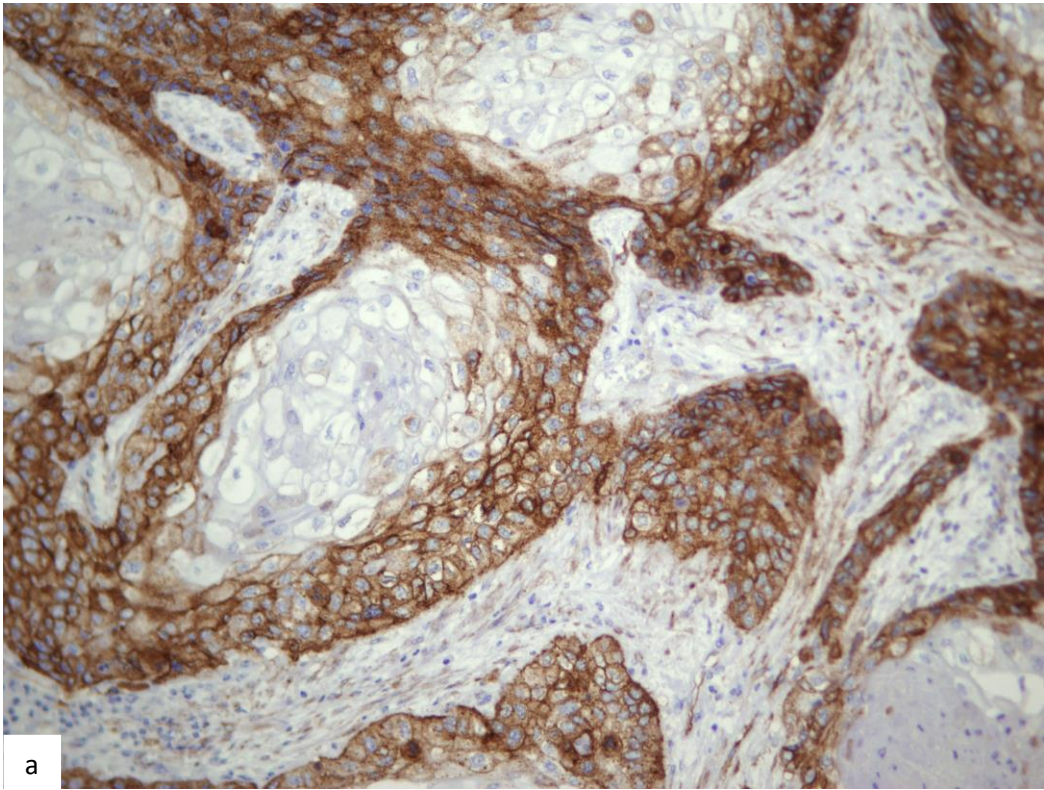
Distribucija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	30	60
1	13	26
2	7	14
Ukupno	50	100

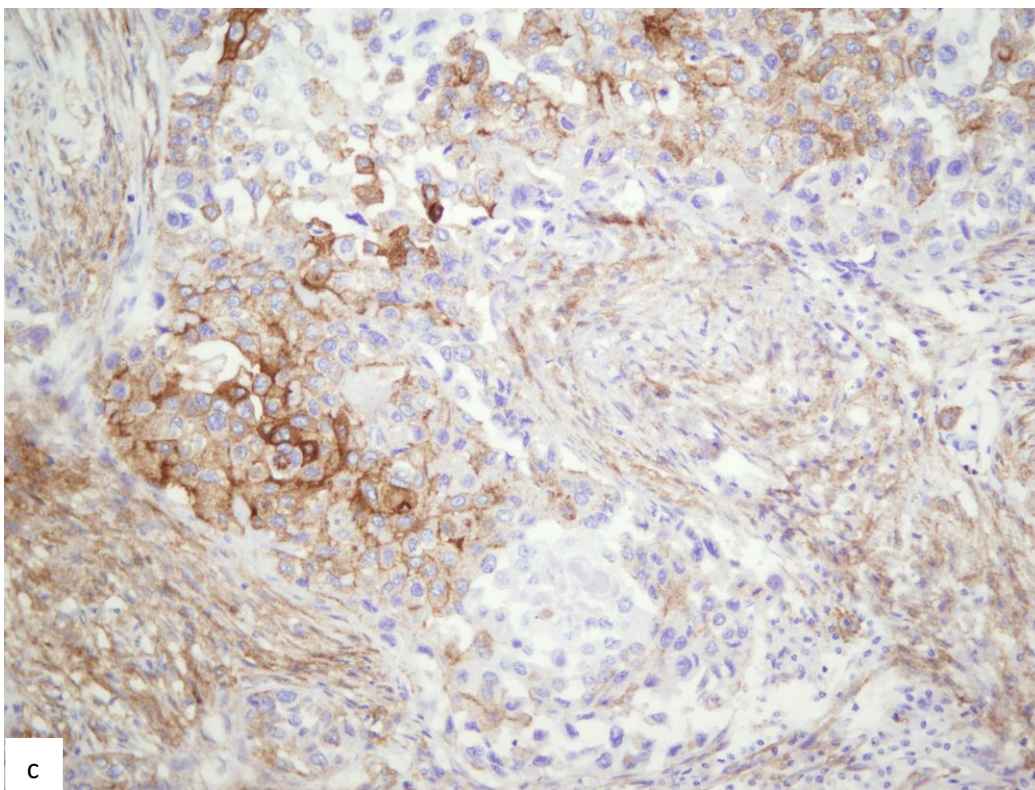
**Tabela 8. Distribucija ekspresije koneksina 43 u limfogenoj metastazi adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	16	76,2
1	3	14,3
2	2	9,5
Ukupno	21	100

Kod skvamoznog karcinoma, distribucija ekspresije koneksina 43 (Slika 11; Tabele 9-11) se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=0,366$ ), između invazivnog fronta i metastaze u limfnom čvoru ( $p=1$ ), kao ni između centralnog dela tumora i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,317$ ).







Slika 11. Ekspresija koneksina 43 u skvamoznom karcinomu pluća: a) centralni deo, b) invazivni front, c) limfogeni metastaza, x200

**Tabela 9. Distribucija ekspresije koneksina 43 u centralnom delu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	4	12,9
1	6	19,4
2	21	67,7
Ukupno	31	100



**Tabela 10. Distribucija ekspresije koneksina 43 u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	5	16,1
1	7	22,6
2	19	61,3
Ukupno	31	100

**Tabela 11. Distribucija ekspresije koneksina 43 u limfogenoj metastazi skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	2	15,4
1	4	30,8
2	7	53,8
Ukupno	13	100

#### 4.2.1.2 Intenzitet ekspresije koneksina 43

Tabele 12-14 prikazuju intenzitet ekspresije koneksina kod adenokarcinoma. Intenzitet ekspresije koneksina 43 se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=0,732$ ), između invazivnog fronta i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,223$ ), kao ni između centralnog dela tumora i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,493$ ).

**Tabela 12. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u centralnom delu adenokarcinoma**

Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Učestalost	Procenat
0	32	62,7
1	7	13,7
2	5	9,8
3	7	13,7
Ukupno	55	100

**Tabela 13. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u invazivnom frontu adenokarcinoma**

Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Učestalost	Procenat
0	28	56
1	9	18
2	8	16
3	5	10
Ukupno	50	100

**Tabela 14. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u limfogenoj metastazi adenokarcinoma**

Intenzitet ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	16	76,2
1	1	4,8
2	2	9,5
3	2	9,5
Ukupno	21	100

Kod skvamoznog karcinoma, intenzitet ekspresije koneksina 43 (Tabele 15-17) se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=0,297$ ), između invazivnog fronta i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,835$ ), kao ni između centralnog dela tumora i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,491$ ).

**Tabela 15. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u centralnom delu skvamoznog karcinoma**

Intenzitet ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	4	12,9
1	1	3,2
2	6	19,4
3	20	64,5
Ukupno	31	100,0

**Tabela 16. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Intenzitet ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	5	16,1
1	3	9,7
2	4	12,9
3	19	61,3
Ukupno	31	100,0

**Tabela 17. Intenzitet ekspresije koneksina 43 u limfogenim metastazama skvamoznog karcinoma**

Intenzitet ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
0	2	15,4
1	1	7,7
2	3	23,1
3	7	53,8
Ukupno	13	100,0

#### 4.2.1.3 Lokalizacija ekspresije koneksina

Kod adenokarcinoma, lokalizacija ekspresije koneksina 43 (Tabele 18-20) se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=1$ ), između invazivnog fronta i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,317$ ), kao ni između centralnog dela tumora i metastaze u limfnom čvoru ( $p=1$ ).

**Tabela 18. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u centralnom delu tumora kod adenokarcinoma**

Lokalizacija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
C	9	47,4
N	2	10,5
K	8	42,1
Total	19	100,0

C-citoplazmatska lokalizacija, N-nuklearna lokalizacija, K-kombinovana lokalizacija proteina koneksina 43 (membransko-citoplazmatska i nuklearno-citoplazmatska)

**Tabela 19. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u invazivnom frontu tumora kod adenokarcinoma**

Lokalizacija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
Valid C	11	50,0
M	1	4,5
N	2	9,1
K	8	36,4
Ukupno	22	100,0

C-citoplazmatska lokalizacija, M-membranska lokalizacija, N-nuklearna lokalizacija, K-kombinovana lokalizacija proteina koneksina 43 (membransko-citoplazmatska i nuklearno-citoplazmatska)

**Tabela 20. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u limfogenim metastazama adenokarcinoma**

Lokalizacija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
C	2	40
K	3	60
Ukupno	5	100

C-citoplazmatska lokalizacija, K-kombinovana lokalizacija proteina koneksina 43 (membransko-citoplazmatska i nuklearno-citoplazmatska)

Kod skvamoznog karcinoma, lokalizacija ekspresije koneksina 43 (Tabele 21-23) se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=0,083$ ), između invazivnog fronta i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,411$ ), kao ni između centralnog dela tumora i metastaze u limfnom čvoru ( $p=0,206$ ).



**Tabela 21. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u centralnom delu tumora kod skvamoznog karcinoma**

Lokalizacija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
C	4	14,8
M	1	3,7
K	22	81,5
Ukupno	27	100,0

C-citoplazmatska lokalizacija, M-membranska lokalizacija, K-kombinovana lokalizacija proteina koneksina 43 (membransko-citoplazmatska)

**Tabela 22. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Lokalizacija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
C	5	19,2
M	1	3,8
K	20	76,9
Ukupno	26	100,0

C-citoplazmatska lokalizacija, M-membranska lokalizacija, K-kombinovana lokalizacija proteina koneksina 43 (membransko-citoplazmatska)

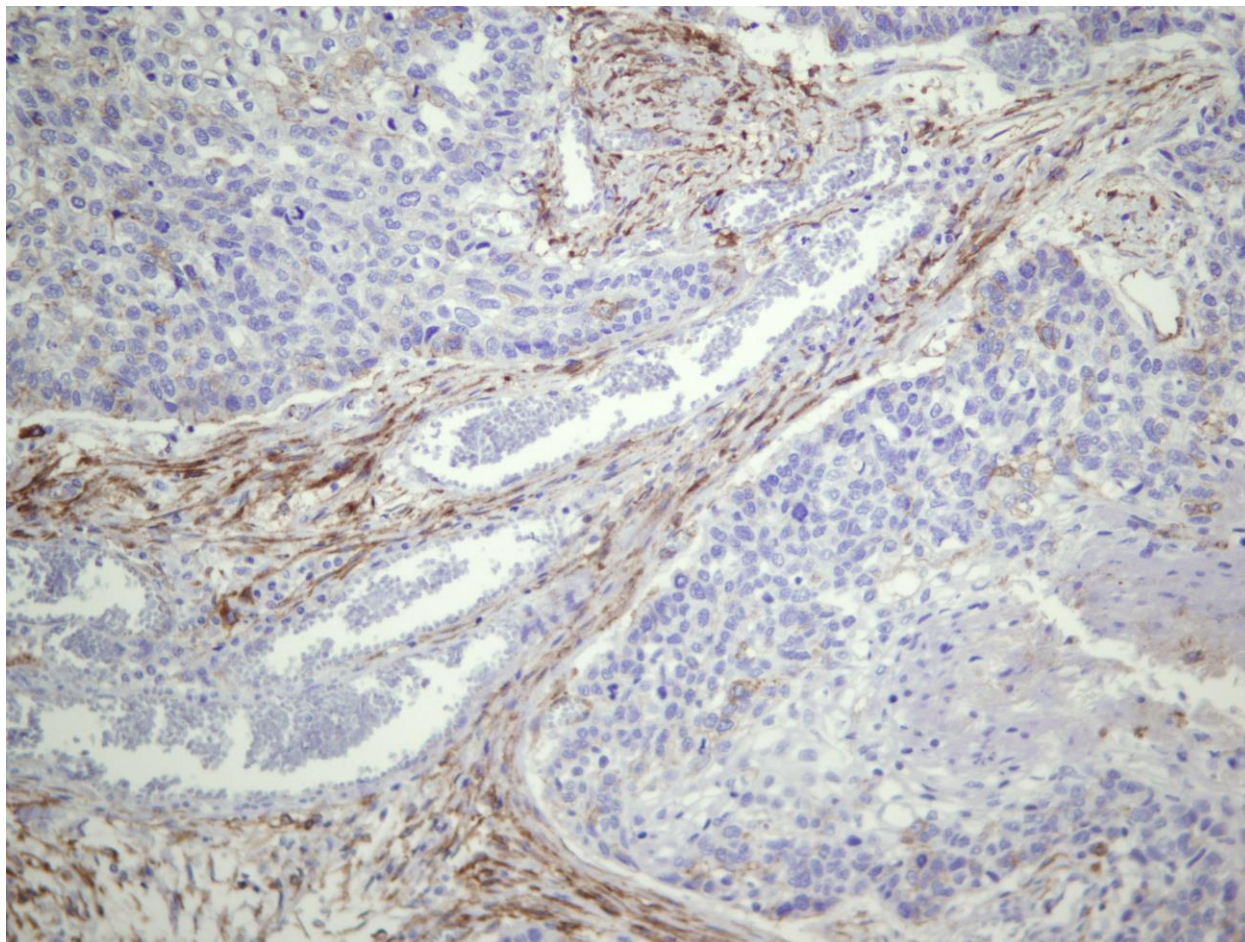
**Tabela 23. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 u limfogenoj metastazi skvamoznog karcinoma**

Lokalizacija ekspresije koneksina 43	Učestalost	Procenat
C	3	27,3
M	1	9,1
K	7	63,6
Ukupno	11	100,0

C-citoplazmatska lokalizacija, M-membranska lokalizacija, K-kombinovana lokalizacija proteina koneksina 43 (membransko-citoplazmatska)

#### 4.2.1.4 Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama

Analizirali smo i ekspresiju koneksina 43 u stromalnim ćelijama (Slika 12). Kod adenokarcinoma, ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama (Tabele 24-25) je bila statistički značajno veća u centralnom delu tumora u odnosu na invazivni front ( $p=0,008$ ).



Slika 12. Ekspresija koneksina-43 u stromalnim ćelijama, x200

**Tabela 24. Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u centralnom delu adenokarcinoma**

Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama	Učestalost	Procenat
0	23	45,1
1	28	54,9
Ukupno	51	100,0

**Tabela 25. Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u invazivnom frontu adenokarcinoma**

Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama	Učestalost	Procenat
0	30	60,0
1	20	40,0
Ukupno	50	100,0

Nasuprot tome, kod skvamoznog karcinoma, ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama (Tabele 26-27) se nije statistički značajno razlikovala između invazivnog fronta i centralnog dela tumora ( $p=1$ ).

**Tabela 26. Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u centralnom delu skvamoznog karcinoma**

Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama	Učestalost	Procenat
0	21	67,7
1	10	32,3
Ukupno	31	100,0

**Tabela 27. Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama	Učestalost	Procenat
0	21	67,7
1	10	32,3
Ukupno	31	100,0

#### 4.2.1.5 Poređenje ekspresije koneksina između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma

Poređenjem ekspresije koneksina 43 između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma, dobili smo sledeće rezultate. U centralnom delu tumora, distribucija ekspresije koneksina je bila statistički značajno veća u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p<0,001$ ). Naime, čak 64,7% adenokarcinoma nije ekspresiralo koneksin 43, dok samo 12,9% skvamoznih karcinoma nije

ekspimiralo koneksin (Tabele 6 i 9). Takođe, u invazivnom frontu tumora, distribucija ekspresije koneksina je bila statistički značajno veća u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p<0,001$ ). Naime, čak 60% adenokarcinoma nije ekspimiralo koneksin 43, dok samo 16,1% skvamoznih karcinoma nije ekspimiralo koneksin (Tabele 7 i 10). U metastazi u limfnom čvoru je takođe bila statistički značajno veća ekspresija u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p=0,002$ ). Naime, čak 76,2% adenokarcinoma nije ekspimiralo koneksin 43, dok samo 15,4% skvamoznih karcinoma nije ekspimiralo koneksin (Tabele 8 i 11).

U centralnom delu tumora, intenzitet ekspresije koneksina 43 je bio statistički značajno veći u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p<0,001$ ). Naime, najviši intenzitet ekspresije je imalo čak 64,5% skvamoznih karcinoma i samo 13,7% adenokarcinoma (Tabele 12 i 15). Takođe, u invazivnom frontu tumora, intenzitet ekspresije koneksina je bio statistički značajno veći u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p<0,001$ ). Naime, najviši intenzitet ekspresije je imalo čak 61,3% skvamoznih karcinoma i samo 10% adenokarcinoma (Tabele 13 i 16). U metastazi u limfnom čvoru je takođe bio statistički značajno veći intenzitet ekspresije u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p=0,002$ ). Naime, najviši intenzitet ekspresije je imalo čak 53,8% skvamoznih karcinoma i samo 9,5% adenokarcinoma (Tabele 14 i 17).

U centralnom delu tumora, lokalizacija ekspresije koneksina je bio statistički značajno drugačija u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p=0,008$ ). Naime, lokalizacija ekspresije koneksina kod skvamoznih karcinoma je najčešće bila kombinovana, dok je kod adenokarcinoma podjednako bila čisto citoplazmatska i kombinovana (Tabele 18 i 21). Takođe, u invazivnom frontu tumora, lokalizacija ekspresije koneksina je bila statistički značajno drugačija u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu ( $p=0,013$ ). Naime, lokalizacija ekspresije koneksina kod skvamoznih karcinoma je najčešće bila kombinovana, dok je kod adenokarcinoma podjednako bila čisto citoplazmatska i kombinovana (Tabele 19 i 22). U metastazi u limfnom čvoru, lokalizacija ekspresije koneksina nije bila statistički značajno drugačija u skvamoznom karcinomu u odnosu na adenokarcinom ( $p=1$ ) (Tabele 20 i 23).

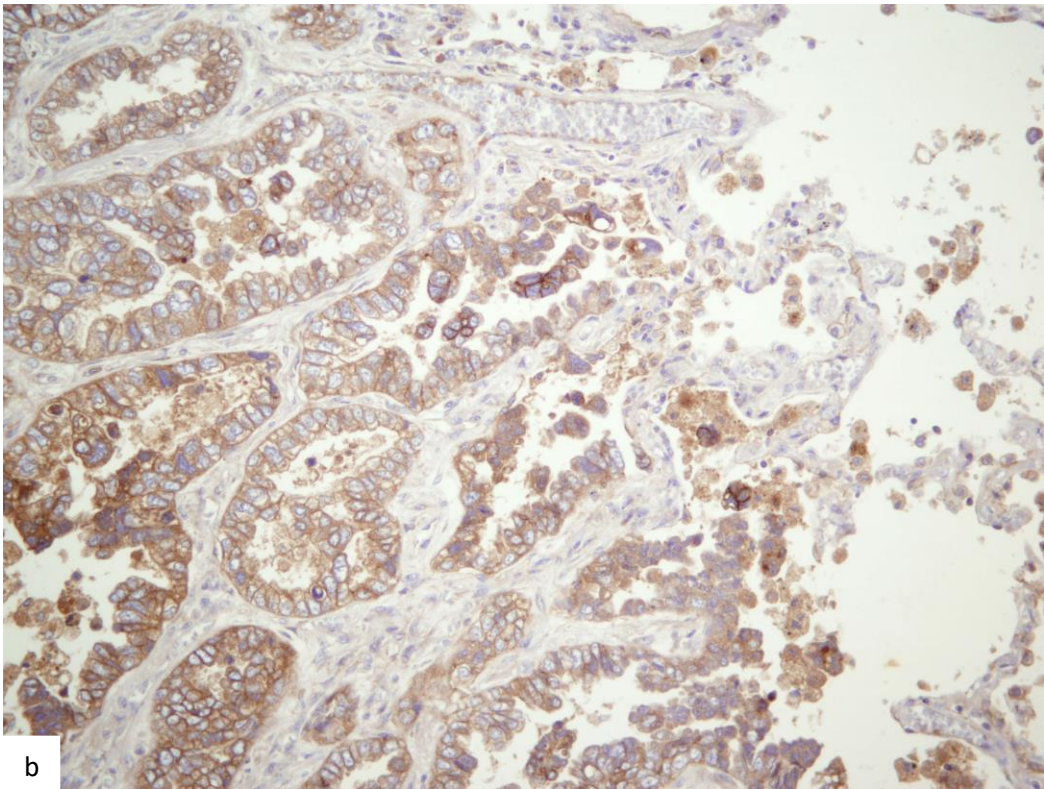
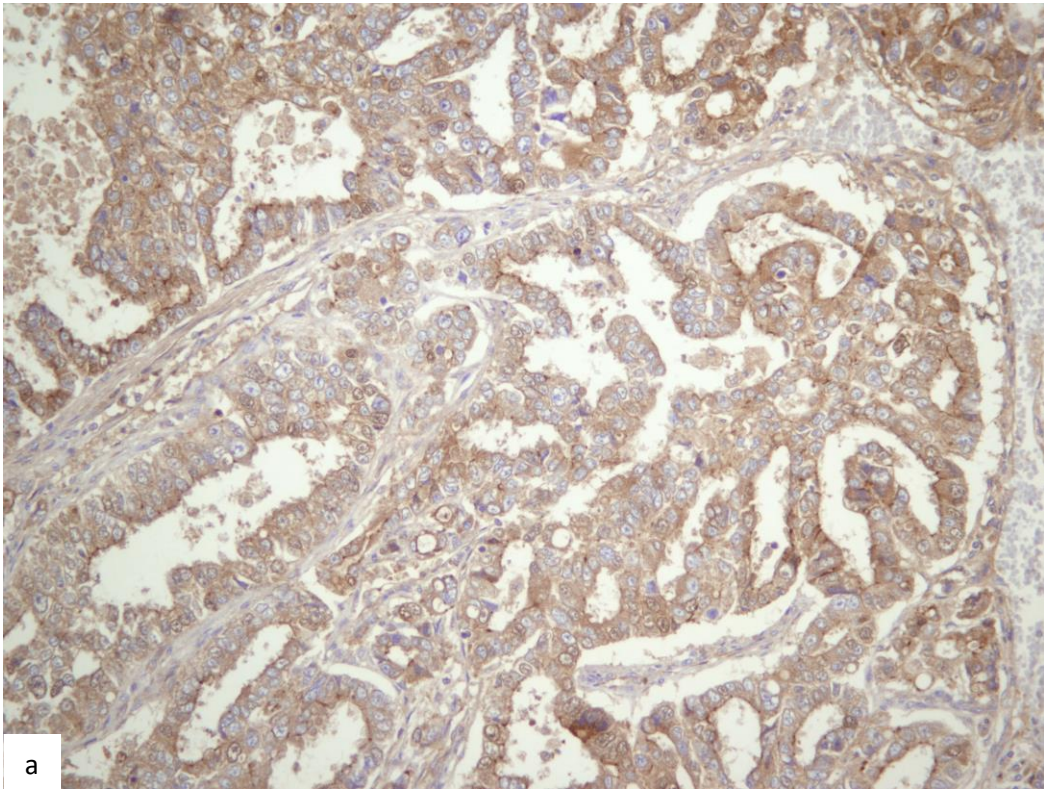
Što se tiče ekspresije koneksina u stromalnim ćelijama u centralnom delu tumora, adenokarcinom je češće imao pozitivne stromalne ćelije nego skvamozni karcinom ( $p=0,046$ ), dok u invazivnom frontu nije bilo značajne razlike između histoloških tipova ( $p=0,483$ ) (Tabele 24-27).

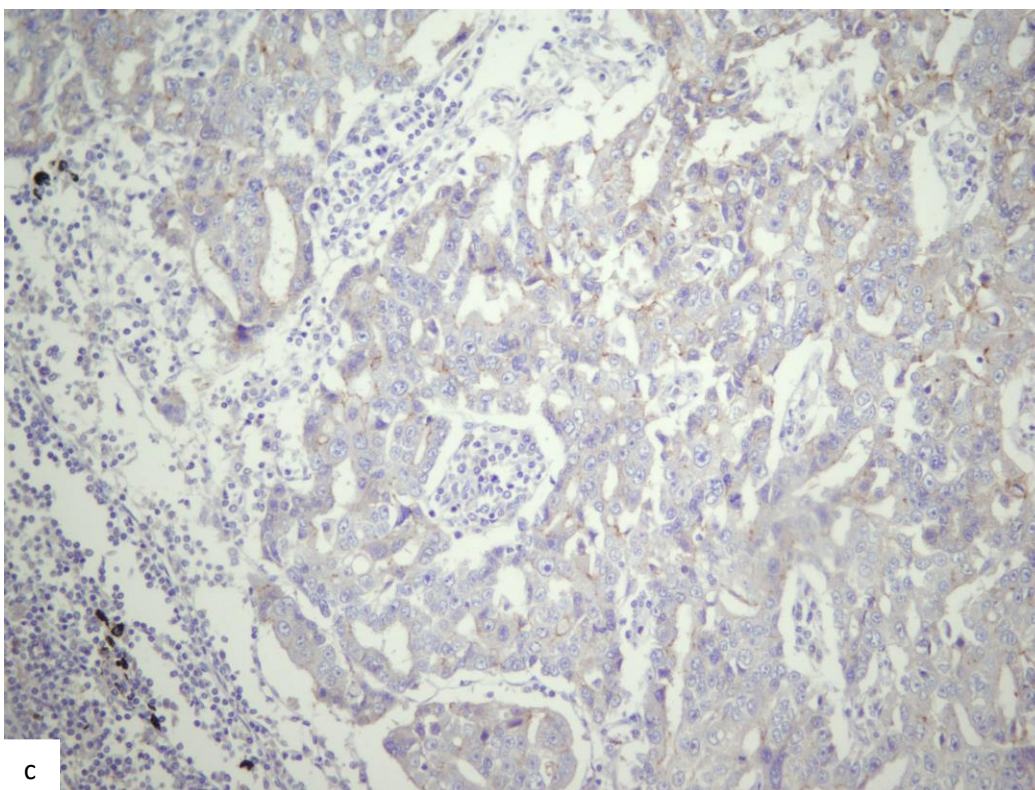
### **4.3 Korelacija ekspresije koneksina 43 sa markerima epitelnomezenhimne tranzicije**

#### *4.3.1 Korelacija ekspresije koneksina i E-kadherina*

Slika 13 pokazuje ekspresiju E-kadherina u adenokarcinomu. U centralnom delu tumora, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma ( $p=0,014$ ) (Tabela 28). Slika 14 pokazuje ekspresiju E-kadherina u skvamoznom karcinomu. U skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p<0,001$ ) (Tabela 29).

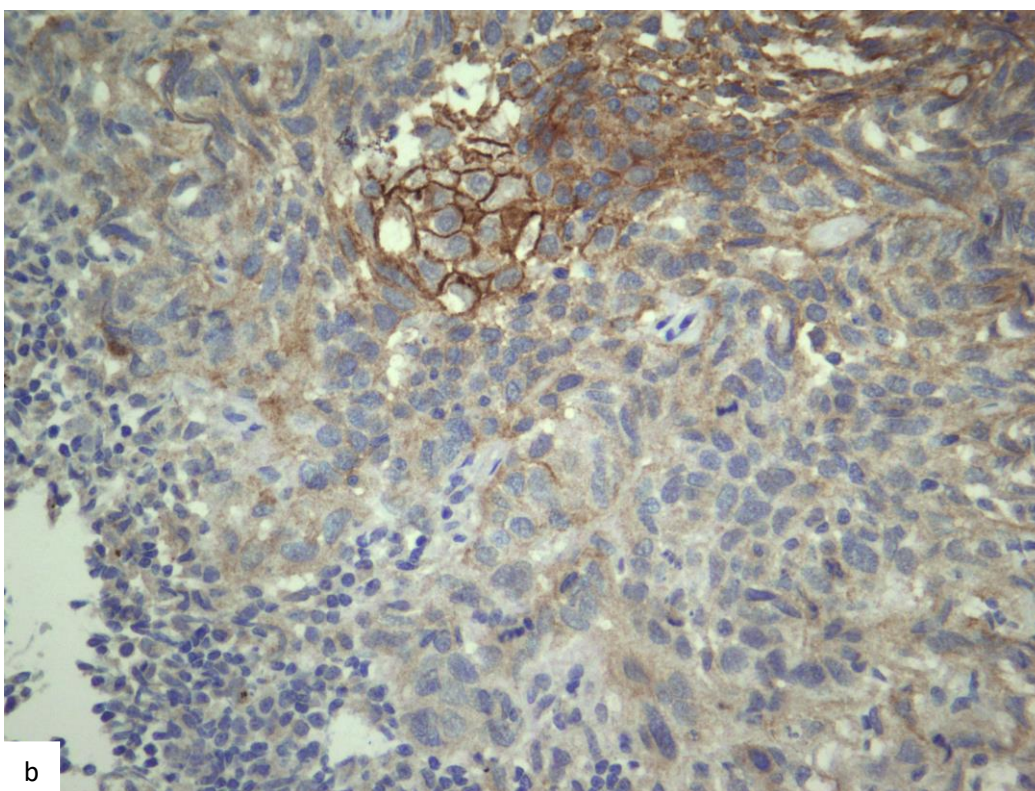
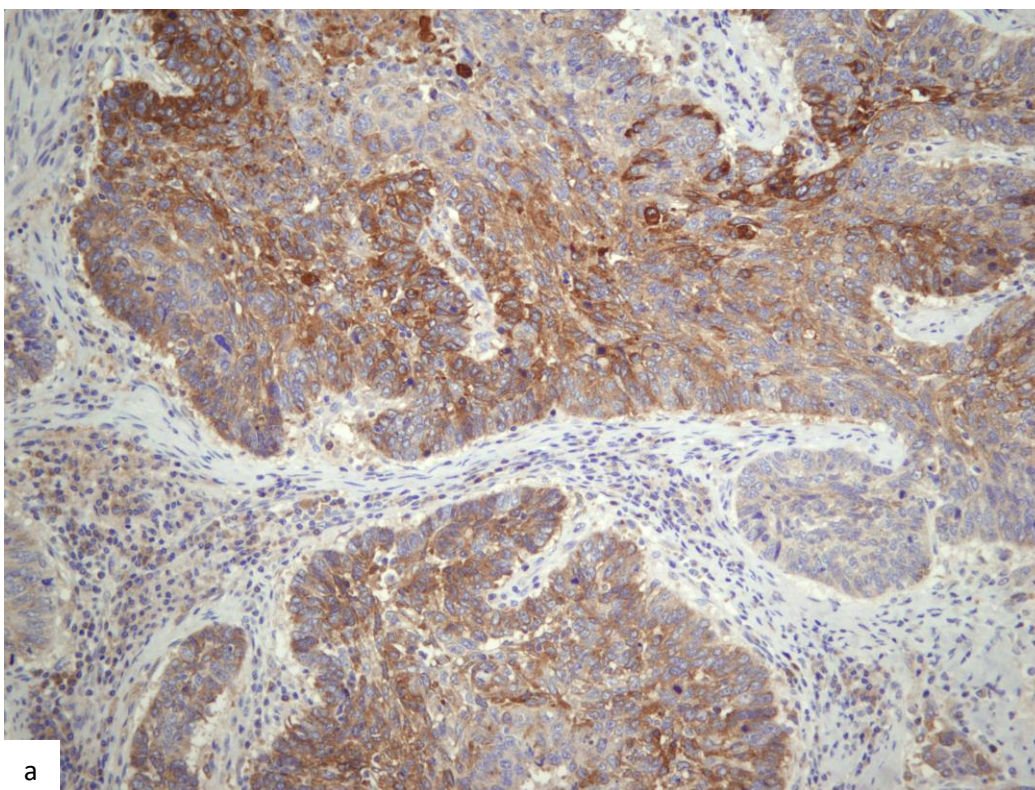






Slika 13. Ekspresija E-kadherina u adenokarcinomu pluća: a) centralni deo, b) invazivni front, c) limfogeni metastaza, x200





Slika 14. Ekspresija E-kadherina u skvamoznom karcinomu (a) i limfogenoj metastazi skvamoznog karcinoma (b), x200

**Tabela 28. Odnos ekspresije koneksina 43 i E-kadherina u centralnom delu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije E-kadherina		Ukupno
	0	1	
0	8 24,2%	25 75,8%	33 100,0%
1	4 36,4%	7 63,6%	11 100,0%
2	1 20%	4 80%	5 100%
Ukupno	13 26,5%	36 73,5%	49 100%

**Tabela 29. Odnos ekspresije koneksina 43 i E-kadherina u centralnom delu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije E-kadherina		Ukupno
	0	1	
0	2 50,0%	2 50,0%	4 100,0%
1	2 40,0%	3 60,0%	5 100,0%
2	10 50,0%	10 50,0%	20 100,0%
Ukupno	14 48,3%	15 51,7%	29 100,0%

U invazivnom frontu tumora, postojala je razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma (Tabela 30), ali nije dostignuta statistička značajnost ( $p=0,068$ ). U skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p<0,001$ ) (Tabela 31).



**Tabela 30. Odnos ekspresije koneksina 43 i E-kadherina u invazivnom frontu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije E-kadherina		Ukupno
	0	1	
0	11 36,7%	19 63,3%	30 100%
1	2 18,2%	9 81,8%	11 100%
2	1 16,7%	5 83,3%	6 100%
Ukupno	14 29,8%	33 70,2%	47 100%

**Tabela 31. Odnos ekspresije koneksina 43 i E-kadherina u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije E-kadherina		Ukupno
	0	1	
0	2 40%	3 60%	5 100%
1	1 16,7%	5 83,3%	6 100%
2	13 72,2%	5 27,8%	18 100%
Ukupno	16 55,2%	13 44,8%	29 100%

U limfogenoj metastazi, postojala je razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma, ali nije dostignuta statistička značajnost ( $p=0,059$ ) (Tabela 32). U skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p=0,039$ ) (Tabela 33).

**Tabela 32. Odnos ekspresije koneksina 43 i E-kadherina u limfogenoj metastazi adenokarcinoma**

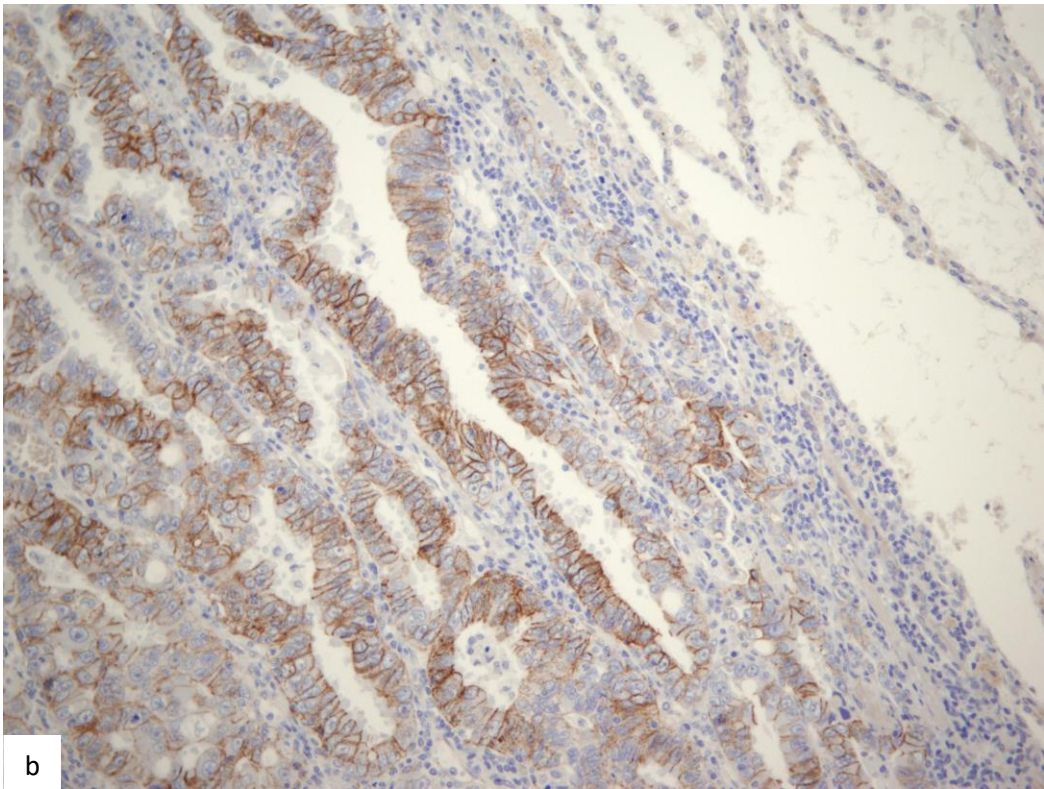
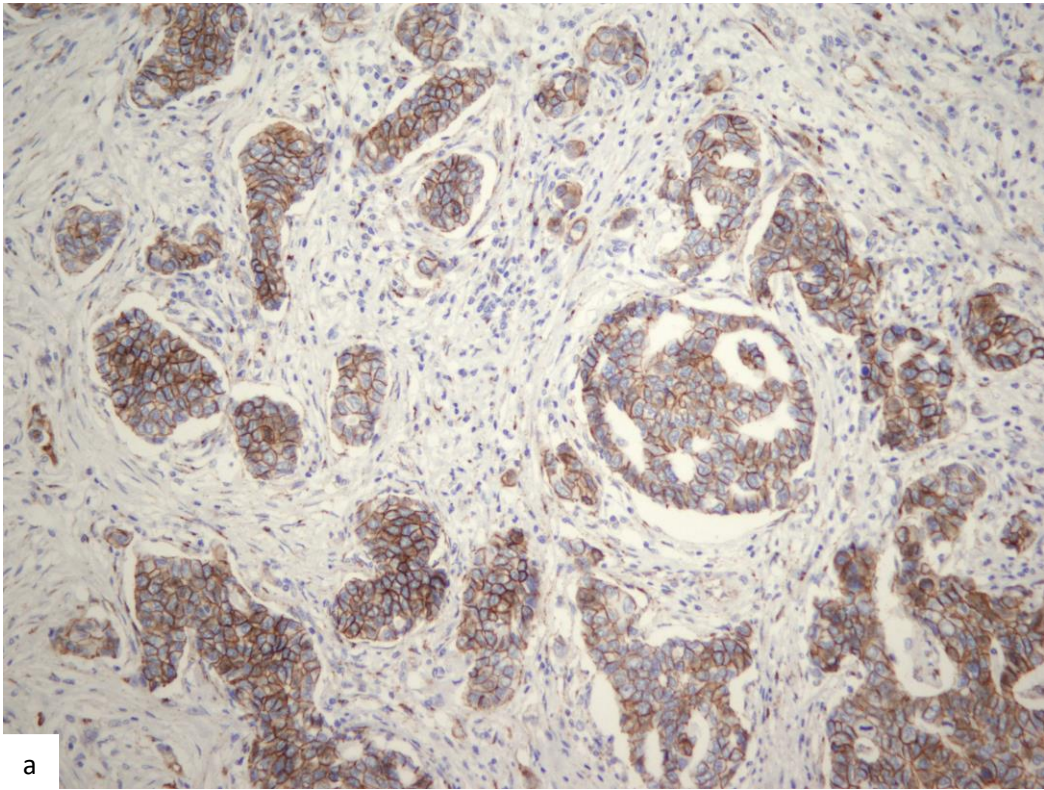
Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije E-kadherina		Ukupno
	0	1	
0	9 60%	6 40%	15 100%
1	0 0%	3 100%	3 100%
2	0 0%	1 100%	1 100%
Ukupno	9 47,4%	10 52,6%	19 100%

**Tabela 33. Odnos ekspresije koneksina 43 i E-kadherina u limfogenoj metastazi skvamoznog karcinoma**

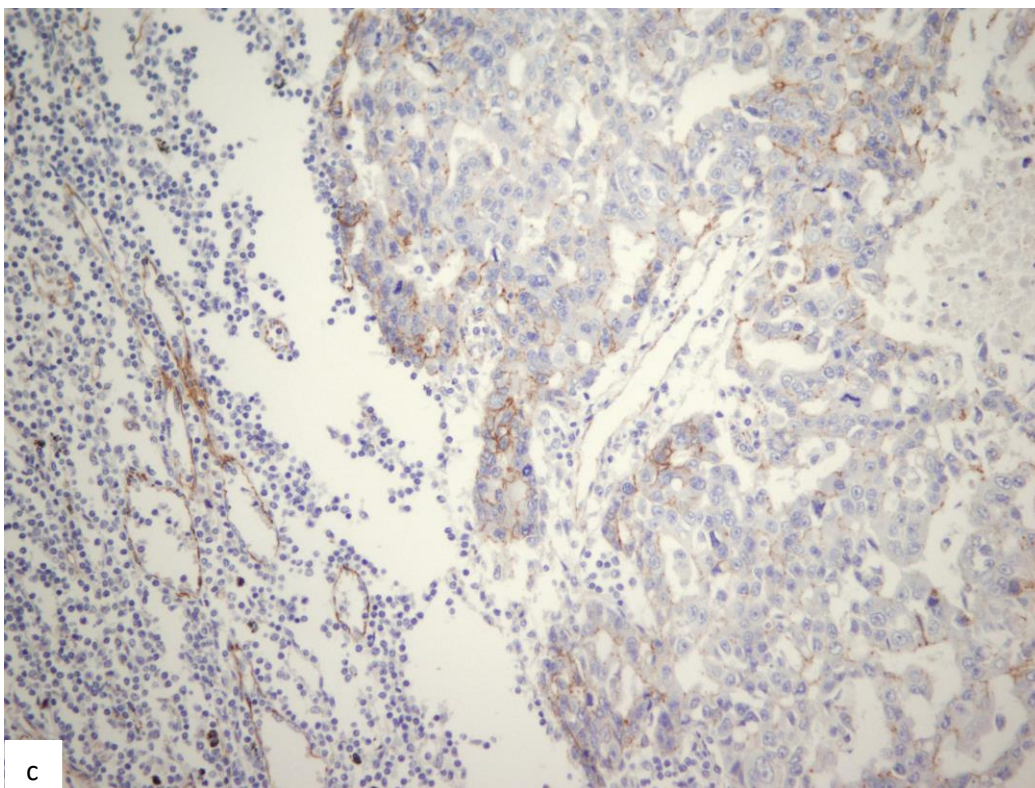
Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije E-kadherina		Ukupno
	0	1	
0	0 0%	1 100%	1 100%
1	1 25%	3 75%	4 100%
2	4 80%	1 20%	5 100%
Ukupno	5 50%	5 50%	10 100%

#### 4.3.2 Korelacija ekspresije koneksina 43 i $\beta$ -katenina

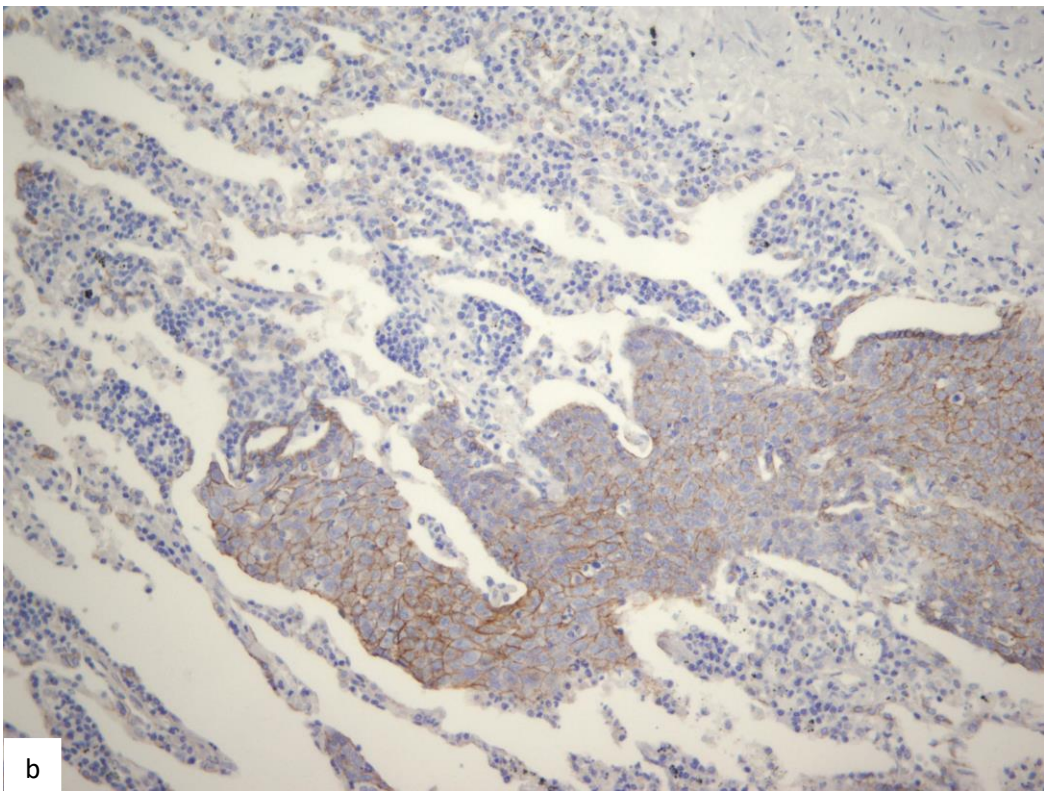
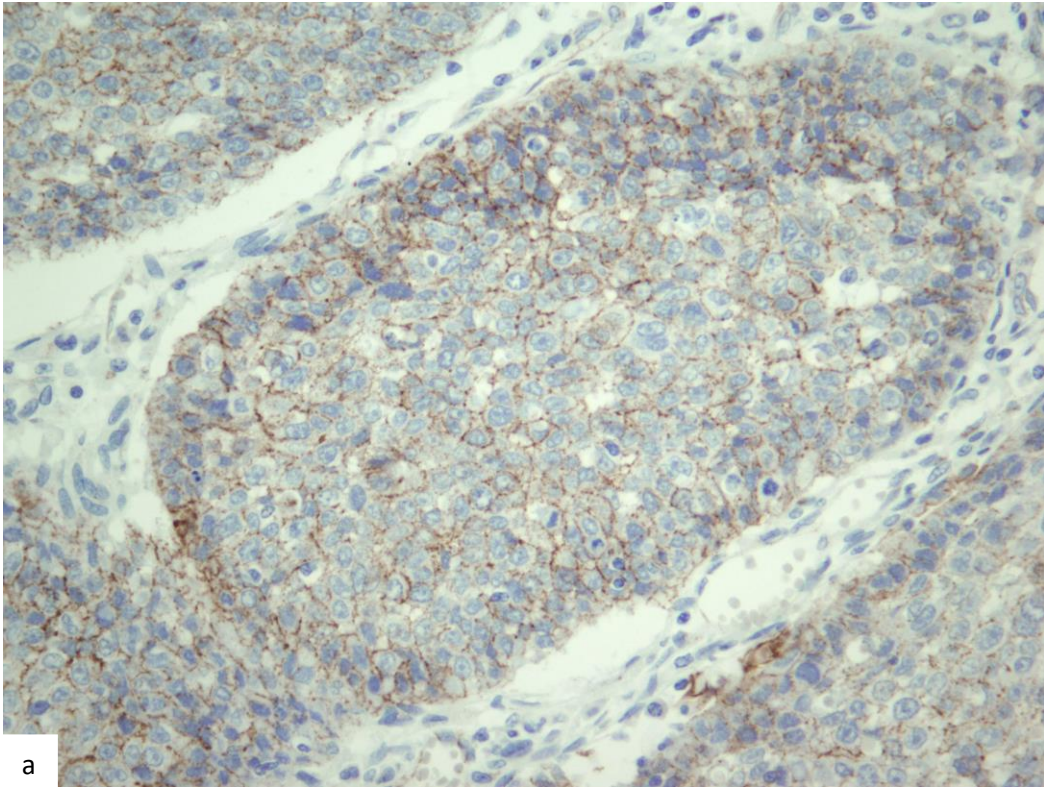
Slika 15 pokazuje ekspresiju  $\beta$ -katenina u adenokarcinomu pluća. U centralnom delu tumora, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma ( $p=0,037$ ) (Tabela 34). Slika 16 pokazuje ekspresiju  $\beta$ -katenina u skvamoznom karcinomu pluća. U skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p<0,001$ ) (Tabela 35).



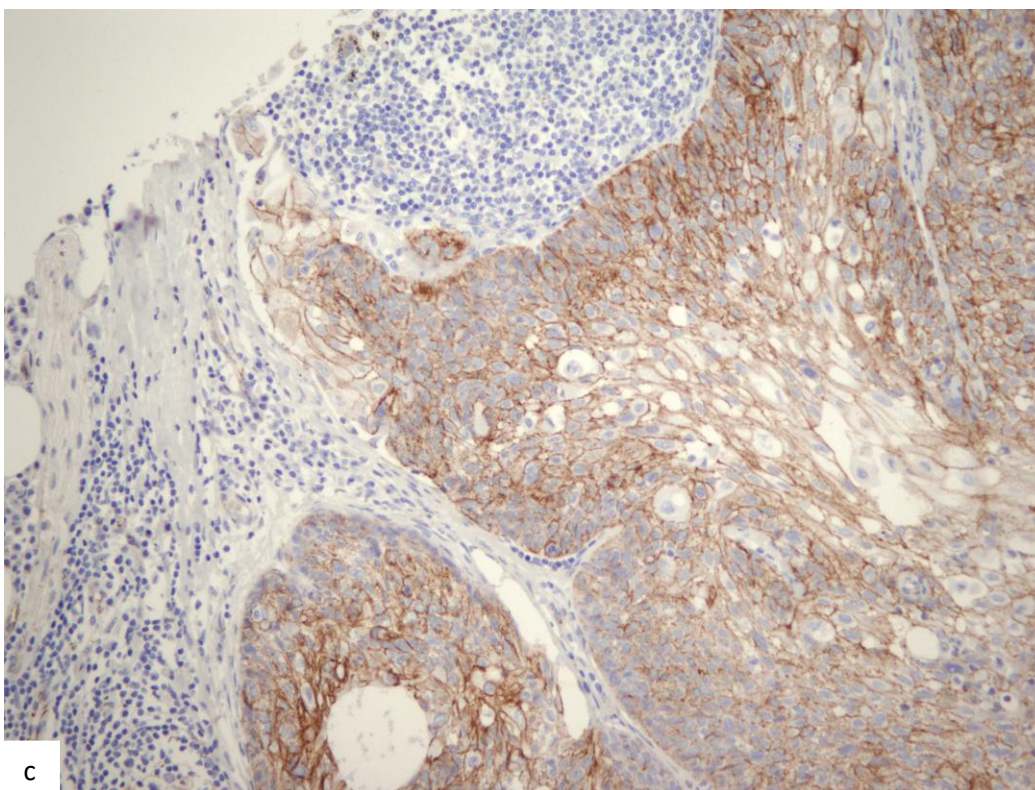




Slika 15. Ekspresija  $\beta$ -katenina u adenokarcinomu pluća a) centralni deo tumora, b) invazivni front, c) limfogenoj metastazi, x200







Slika 16. Ekspresija  $\beta$ -katenina u skvamoznom karcinomu pluća a) centralni deo tumora x200, b) invazivni front, x200 c) limfoga metastaza, x400

**Tabela 34. Odnos ekspresije koneksina 43 i  $\beta$ -katenina u centralnom delu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije $\beta$ -katenina		Ukupno
	0	1	
0	9 27,3%	24 72,7%	33 100%
1	4 33,3%	8 66,7%	12 100%
2	2 40%	3 60%	5 100%
Ukupno	15 30%	35 70%	50 100%

**Tabela 35. Odnos ekspresije koneksina 43 i  $\beta$ -katenina u centralnom delu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije $\beta$ -katenina		Ukupno
	0	1	
0	0 0%	4 100%	4 100%
1	4 80%	1 20%	5 100%
2	7 35%	13 65%	20 100%
Ukupno	11 37,9%	18 62,1%	29 100%

U invazivnom frontu tumora, postojala je razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma, ali nije dostignuta statistička značajnost ( $p=0,384$ ) (Tabela 36). U skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p<0,001$ ) (Tabela 37).

**Tabela 36. Odnos ekspresije koneksina 43 i  $\beta$ -katenina u invazivnom frontu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije $\beta$ -katenina		Ukupno
	0	1	
0	12 41,4%	17 58,6%	29 100%
1	4 30,8%	9 69,2%	13 100%
2	2 33,3%	4 66,7%	6 100%
Ukupno	18 37,5%	30 62,5%	48 100%

**Tabela 37. Odnos ekspresije koneksina 43 i  $\beta$ -katenina u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije $\beta$ -katenina		Ukupno
	0	1	
0	2 40%	3 60%	5 100%
1	2 33,3%	4 66,7%	6 100%
2	5 27,8%	13 72,2%	18 100%
Ukupno	9 31%	20 69%	29 100%

U limfogenoj metastazi, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma ( $p=0,011$ ) (Tabela 38). Slično tome, u skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p=0,033$ ) (Tabela 39).

**Tabela 38. Odnos ekspresije koneksina 43 i  $\beta$ -katenina u limfogenoj metastazi adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije $\beta$ -katenina		Ukupno
	0	1	
0	5 35,7%	9 64,3%	14 100%
1	0 0%	2 100%	2 100%
2	0 0%	1 100%	1 100%
Ukupno	5 29,4%	12 70,6%	17 100%

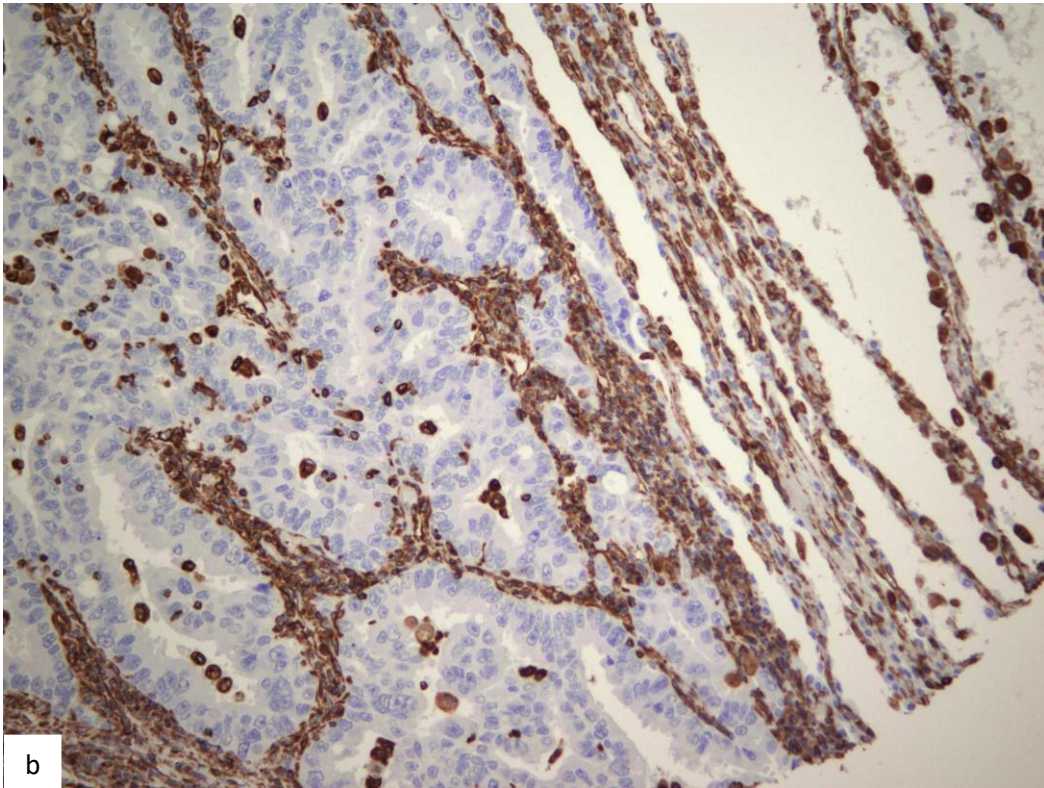
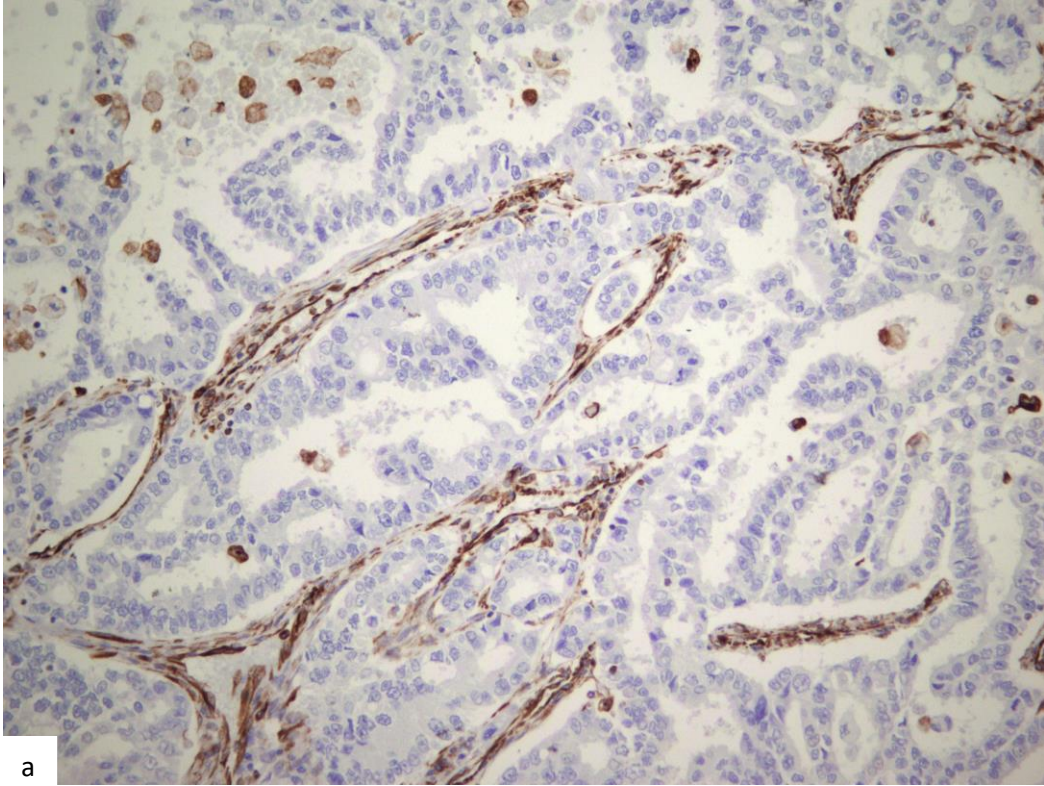


**Tabela 39. Odnos ekspresije koneksina 43 i  $\beta$ -katenina u limfogenoj metastazi skvamoznog karcinoma**

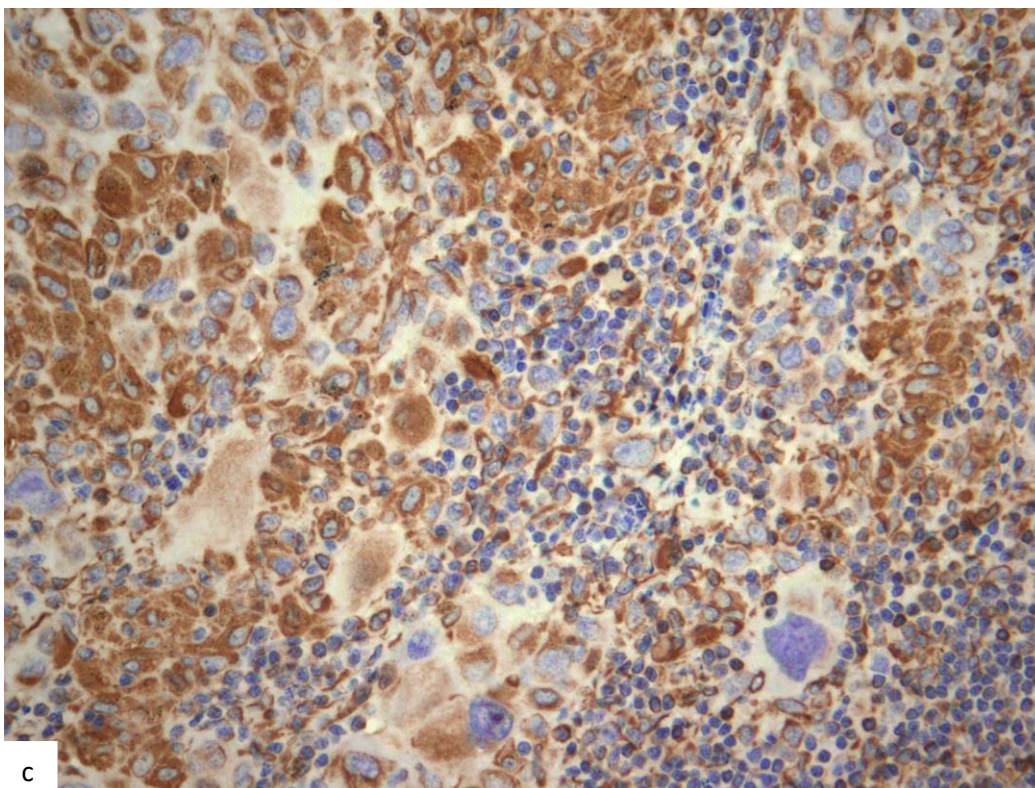
Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije $\beta$ -katenina		Ukupno
	0	1	
0	0 0%	1 100%	1 100%
1	2 50%	2 50%	4 100%
2	2 40%	3 60%	5 100%
Ukupno	4 40%	6 60%	10 100%

#### 4.3.3 Korelacija ekspresije koneksina i vimentina

Slika 17 pokazuje ekspresiju vimentina u adenokarcinomu pluća. U centralnom delu tumora, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma ( $p=0,023$ ) (Tabela 40). Slično tome, u skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p<0,001$ ) (Tabela 41).







Slika 17. Ekspresija vimentina u adenokarcinomu pluća: a) centralni deo, b) invazivni front, c) limfoga metastaza, x200

**Tabela 40. Odnos ekspresije koneksina 43 i vimentina u centralnom delu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije vimentina		Ukupno
	0	1	
0	28 87,5%	4 12,5%	32 100%
1	6 60,0%	4 40,0%	10 100%
2	4 66,7%	2 33,3%	6 100%
Ukupno	38 79,2%	10 20,8%	48 100%

**Tabela 41. Odnos ekspresije koneksina 43 i vimentina u centralnom delu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije vimentina		Ukupno
	0	1	
0	1 25,0%	3 75%	4 100%
1	4 66,7%	2 33,3%	6 100%
2	18 90%	2 10%	20 100%
Ukupno	23 76,7%	7 23,3%	30 100%

U invazivnom frontu tumora, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma ( $p=0,003$ ) (Tabela 42). Slično tome, u skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p<0,001$ ) (Tabela 43).

**Tabela 42. Odnos ekspresije koneksina 43 i vimentina u invazivnom frontu adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije vimentina		Ukupno
	0	1	
0	24 85,7%	4 14,3%	28 100%
1	10 83,3%	2 16,7%	12 100%
2	5 71,4%	2 28,6%	7 100%
Ukupno	39 83,0%	8 17%	47 100%

**Tabela 43. Odnos ekspresije koneksina 43 i vimentina u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije vimentina		Ukupno
	0	1	
0	2 40%	3 60%	5 100%
1	6 85,7%	1 14,3%	7 100%
2	17 94,4%	1 5,6%	18 100%
Ukupno	25 83,3%	5 16,7%	30 100%

U limfogenim metastazama, nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina kod adenokarcinoma ( $p=0,527$ ) (Tabela 44). Nasuprot tome, u skvamoznom karcinomu je nađena statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina ( $p=0,014$ ) (Tabela 45).

**Tabela 44. Odnos ekspresije koneksina 43 i vimentina u limfogenim metastazama adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije vimentina		Ukupno
	0	1	
0	9 60%	6 40%	15 100%
1	2 100%	0 0%	2 100%
2	0 0%	2 100%	2 100%
Ukupno	11 57,9%	8 42,1%	19 100%

**Tabela 45. Odnos ekspresije koneksina 43 i vimentina u limfogenim metastazama skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43	Distribucija ekspresije vimentina		Ukupno
	0	1	
0	1 50%	1 50%	2 100%
1	3 75%	1 25%	4 100%
2	5 100%	0 0%	5 100%
Ukupno	9 81,8%	2 18,2%	11 100%

#### **4.4 Korelacija veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije**

Ispitali smo i korelaciju veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije. Među ispitivanim uzorcima, bilo je 14 uzoraka sa pT1a (15,2%), 16 uzoraka sa pT1b (17,4%), 30 uzoraka sa pT2a (32,6%), 19 uzoraka sa pT2b (20,7%), 11 uzoraka sa pT3 (12%).

Analiza korelacije veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom koneksina 43 je pokazala sledeće rezultate. Kod adenokarcinoma, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji koneksina 43 po pT stadijumima u centralnom delu tumora ( $p=0,245$ ) niti u invazivnom frontu ( $p=0,576$ ). Kod skvamoznog karcinoma, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji koneksina 43 po pT stadijumima u centralnom delu tumora ( $p=0,074$ ). Međutim, pronađena je značajna razlika u ekspresiji koneksina 43 po pT stadijumima u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma ( $p=0,01$ ), i to tako da jedino u pT3 stadijumu nije zabeležen nijedan slučaj drugog stepena ekspresije koneksina 43, već je dominirao prvi stepen ekspresije koneksina 43 (80%).

Analiza korelacije veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom E-kadherina je pokazala sledeće rezultate. Kod adenokarcinoma, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji E-kadherina po pT stadijumima ni u centralnom ni u perifernom delu tumora ( $p>0,05$ ). Kod skvamoznog karcinoma, bilo je statistički značajne razlike u ekspresiji E-kadherina po pT stadijumima u invazivnom frontu ( $p=0,03$ ). Naime, uočeno je da su svi tumori sa pT3 stadijumom i polovina onih sa pT2b stadijumom



ekspimirali E-kadherin. U centralnom delu tumora, nije zabeležena značajna razlika u ekspresiji E-kadherina po pT stadijumima ( $p=0,152$ ).

Analiza korelacije veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom  $\beta$ -katenina i vimentina nije pokazala statistički značajne razlike u ekspresiji ovih markera po pT stadijumima ni u centralnom ni u perifernom delu tumora, kako adenokarcinomu tako i u skvamoznom karcinomu pluća ( $p>0,05$ ).

#### **4.5 Korelacija ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i limfogenih/hematogenih metastaza**

Na obdukcijском materijalu, ispitivali smo da li postoji značajna razlika u distribuciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i limfogenih i hematogenih metastaza. Bilo je ukupno 19 obdukovanih sa adenokarcinomom i 10 sa skvamoznim karcinomom. Ukupan broj obdukovanih muškog pola bio je 18, a ukupan broj obdukovanih ženskog pola bio je 11.

Nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i metastaza u limfnim čvorovima ( $p=0,317$  kod adenokarcinoma;  $p=0,739$  kod skvamoznog karcinoma).

Naime, kao što se vidi u Tabeli 46, kod adenokarcinoma, 84,6% metastaza u limfnom čvoru kod primarnih tumora sa najnižim stepenom ekspresije koneksina 43 je imalo najniži stepen ekspresije koneksina 43, dok je 66,7% metastaza u limfnom čvoru kod primarnih tumora sa najvišim stepenom ekspresije koneksina 43 imalo najviši stepen ekspresije koneksina 43.

Kod skvamoznog karcinoma (Tabela 47), 50% metastaza u limfnom čvoru kod primarnih tumora sa najnižim stepenom ekspresije koneksina 43 je imalo najniži stepen ekspresije koneksina 43, dok je 66,7% metastaza u limfnom čvoru kod primarnih tumora sa najvišim stepenom ekspresije koneksina 43 imalo najviši stepen ekspresije koneksina 43.

Nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i hematogenih metastaza ( $p=1$  kod adenokarcinoma;  $p=0,317$  kod skvamoznog karcinoma). Tabele 48 i 49 pokazuju odnos distribucije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma.

**Tabela 46. Odnos distribucije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće limfogene metastaze kod adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije Cx43 u primarnom tumoru	Distribucija Cx43 u limfogenim metastazama			Ukupno
	0	1	2	
0	11 84,6%	2 15,4%	0 0%	13 100%
1	0 0%	0 0%	1 100,0%	1 100,0%
2	0 0%	1 33,3%	2 66,7%	3 100,0%
Ukupno	11 64,7%	3 17,6%	3 17,6%	17 100,0%

**Tabela 47. Odnos distribucije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće limfogene metastaze kod skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Distribucija ekspresije koneksina 43 u limfogenim metastazama			Ukupno
	0	1	2	
0	2 50%	1 25%	1 25%	4 100%
1	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%
2	1 33,3%	0 0%	2 66,7%	3 100%
Ukupno	3 37,5%	2 25,0%	3 37,5%	8 100%

**Tabela 48. Odnos distribucije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod adenokarcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Distribucija ekspresije koneksina 43 u hematogenim metastazama			Ukupno
	0	1	2	
0	10 83,3%	1 8,3%	1 8,3%	12 100%
1	1 100%	0 0%	0 0%	1 100%
2	0 0%	2 66,7%	1 33,3%	3 100%
Ukupno	11 68,8%	3 18,8%	2 12,5%	16 100%

**Tabela 49. Odnos distribucije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod skvamoznog karcinoma**

Distribucija ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Distribucija ekspresije koneksina 43 u hematogenim metastazama			Ukupno
	0	1	2	
0	4 80%	1 20%	0 0%	5 100%
1	0 0%	2 100%	0 0%	2 100%
2	0 0%	0 0%	2 100%	2 100%
Ukupno	4 44,4%	3 33,3%	2 22,2%	9 100%

Takođe smo ispitivali da li postoji značajna razlika u intenzitetu ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i limfogenih i hematogenih metastaza. Nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i metastaza u limfnim čvorovima ( $p=0,109$  kod adenokarcinoma;  $p=0,705$  kod skvamoznog karcinoma) (Tabele 50-51). Nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i hematogenih metastaza ( $p=0,371$  kod adenokarcinoma;  $p=0,317$  kod skvamoznog karcinoma) (Tabele 52-53).

**Tabela 50. Odnos intenziteta ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće limfogene metastaze kod adenokarcinoma na obdukcijском materijalu**

Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Intenzitet ekspresije koneksina 43 u limfogenim metastazama				Ukupno
	0	1	2	3	
0	11 84,6%	1 7,7%	0 0%	1 7,7%	13 100%
1	0 0%	0 0%	0 0%	1 100%	1 100%
2	0 0%	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%
3	0 0%	0 0%	0 0%	2 100%	2 100%
Ukupno	11 64,7%	1 5,9%	1 5,9%	4 23,5%	17 100%

**Tabela 51. Odnos intenziteta ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće limfogene metastaze kod skvamoznog karcinoma na obdukcijском materijalu**

Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Intenzitet ekspresije koneksina 43 u limfogenim metastazama				Ukupno
	0	1	2	3	
0	2 50%	0 0%	0 0%	2 50%	4 100%
1	0 0%	1 100%	0 0%	0 0%	1 100%
2	0 0%	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%
3	1 50%	0 0%	1 50%	0 0%	2 100%
Ukupno	3 37,5%	1 12,5%	2 25%	2 25%	8 100%

**Tabela 52. Odnos intenziteta ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod adenokarcinoma na obdukcijском materijalu**

Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Intenzitet ekspresije koneksina 43 u hematogenim metastazama			Ukupno
	0	2	3	
0	10 83,3%	0 0%	2 16,7%	12 100%
1	1 100%	0 0%	0 0%	1 100%
2	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%
3	0 0%	1 50%	1 50%	2 100%
Ukupno	11 68,8%	2 12,5%	3 18,8%	16 100%

**Tabela 53. Odnos intenziteta ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod skvamoznog karcinoma na obdukcijском materijalu**

Intenzitet ekspresije koneksina 43 u primarnom tumoru	Intenzitet ekspresije koneksina 43 u hematogenim metastazama				Ukupno
	0	1	2	3	
0	4 80%	0 0%	0 0%	1 20%	5 100%
1	0 0%	1 100%	0 0%	0 0%	1 100%
2	0 0%	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%
3	0 0%	0 0%	0 0%	2 100%	2 100%
Ukupno	4 44,4%	1 11,1%	1 11,1%	3 33,3%	9 100%

Takođe smo ispitivali da li postoji značajna razlika u lokalizaciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i limfogenih i hematogenih metastaza (Tabele 54-57). Nije pronađena statistički značajna razlika u lokalizaciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i metastaza u limfnim čvorovima ( $p=0,180$  kod adenokarcinoma;  $p=0,739$  kod skvamoznog karcinoma). Nije pronađena ni statistički značajna razlika u lokalizaciji ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i hematogenih metastaza ( $p=0,317$  kod adenokarcinoma;  $p=0,317$  kod skvamoznog karcinoma).



**Tabela 54. Odnos lokalizacije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće limfogene metastaze kod adenokarcinoma na obdukcijском materijalu**

Lokalizacija koneksina 43 u primarnom tumoru	Lokalizacija koneksina 43 u limfogenim metastazama			Ukupno
	0	C	K	
0	11 84,6%	1 7,7%	1 7,7%	13 100,0%
C	0 0%	1 100,0%	0 0%	1 100,0%
K	0 0%	0 0%	3 100,0%	3 100,0%
Ukupno	11 64,7%	2 11,8%	4 23,5%	17 100,0%

0-nema ekspresije, C-citoplazmatska lokalizacija, K-kombinovana (citoplazmatska i membranska lokalizacija) ekspresije proteina koneksina 43

**Tabela 55. Odnos lokalizacije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće limfogene metastaze kod skvamoznog karcinoma**

Lokalizacija koneksina 43 u primarnom tumoru	Lokalizacija koneksina 43 u limfogenoj metastazi			Ukupno
	0	C	K	
0	2 50,0%	1 25,0%	1 25,0%	4 100,0%
C	0 0%	1 100,0%	0 0%	1 100,0%
K	1 33,3%	0 0%	2 66,7%	3 100,0%
Ukupno	3 37,5%	2 25,0%	3 37,5%	8 100,0%

0-nema ekspresije, C-citoplazmatska lokalizacija, K-kombinovana (citoplazmatska i membranska lokalizacija) ekspresije proteina koneksina 43

**Tabela 56. Odnos lokalizacije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod adenokarcinoma**

Lokalizacija koneksina 43 u primarnom tumoru	Lokalizacija koneksina 43 u hematogenim metastazama		Ukupno
	0	K	
0	9 81,8%	2 18,2%	11 100,0%
C	1 100,0%	0 0%	1 100,0%
K	0 0%	3 100,0%	3 100,0%
Ukupno	10 66,7%	5 33,3%	15 100,0%

0-nema ekspresije, C-citoplazmatska lokalizacija, K-kombinovana (citoplazmatska i membranska lokalizacija) ekspresije proteina koneksina 43

**Tabela 57. Odnos lokalizacije ekspresije koneksina 43 između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod skvamoznog karcinoma**

Lokalizacija koneksina 43 u primarnom tumoru	Lokalizacija koneksina 43 u hematogenim metastazama			Ukupno
	0	C	K	
0	4 80%	0 0%	1 20%	5 100%
C	0 0%	1 100%	0 0%	1 100%
K	0 0%	0 0%	3 100%	3 100%
Ukupno	4 44,4%	1 11,1%	4 44,4%	9 100%

0-nema ekspresije, C-citoplazmatska lokalizacija, K-kombinovana (citoplazmatska i membranska lokalizacija) ekspresije proteina koneksina 43

## 5. DISKUSIJA

Imajući u vidu raširenost koneksina u tkivima kao i njihov značaj za komunikaciju ćelija međusobno i sa okolnim matriksom, postoji mogućnost da koneksini igraju izvesnu ulogu u kancerogenezi kao i da učestvuju u ćelijskoj adheziji i migraciji, pa samim tim i u tumorskom širenju i prognozi pacijenata sa tumorima. Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ispita ekspresija koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća i da se utvrdi da li postoji razlika u njegovoj ekspresiji između histoloških tipova nesitnoćelijskih karcinoma pluća; da se ispita da li se ekspresija koneksina 43 u primarnom nesitnoćelijskom karcinomu pluća razlikuje između invazivnog tumorskog fronta i centralnog dela tumora; da se ispita postojanje povezanosti ekspresije koneksina 43 sa markerima procesa epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća; kao i da se utvrdi da se koneksin 43 različito ekspresira između primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća i njegovih limfogenih i hematogenih metastaza.

Na osnovu analize imunohistohemijske ekspresije koneksina 43 na celim presecima tkivnih isečaka primarnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, pokazali smo da više od 65% uzoraka ekspresira koneksin 43. Međutim, pokazali smo i da postoje značajne razlike između histoloških tipova nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Naime, skvamozni karcinom ima značajno izraženiju ekspresiju (visok procenat tumorskih ćelija pozitivnih na koneksin 43) kao i veći intenzitet ekspresije na koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom pluća. Slične rezultate smo dobili i analizom tkivnih mikronizova ovih tumora gde je skvamozni karcinom konzistentno pokazivao veću ekspresiju koneksina 43 u poređenju sa adenokarcinomom.

Podaci o imunohistohemijskoj ekspresiji koneksina 43 u karcinomu pluća su vrlo oskudni u literaturi. Zhao i saradnici su ispitivali ekspresiju koneksina 43 kod 25 pacijenata sa adenokarcinomom i 19 pacijenata sa skvamoznim karcinomom pluća. Ovi autori su pokazali veću ekspresiju Cx43 mRNA i veću imunohistohemijsku ekspresiju koneksina u adenokarcinomima u odnosu na skvamozne karcinome pluća (Zhao i sar., 2013), što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Nije dovoljno jasno koji je razlog za ovakvu razliku u rezultatima između naše analize i studije Zhao i saradnika, ali je moguće da su razlici doprineli manji uzorak u njihovoj studiji, znatno mlađa populacija pacijenata, i rasa (azijska populacija).

Naši rezultati su pokazali razliku u ekspresiji koneksina 43 između adenokarcinoma pluća i skvamoznog karcinoma pluća, sugerišući i postojanje razlika u međućelijskoj komunikaciji i komunikaciji ćelija sa okolinom između ova dva tipa tumora pluća. Pored toga, rezultati sugerišu različite uloge koneksina 43 u procesu tumorske progresije kod ova dva histološka tipa. U svakom slučaju, koneksin 43 se pokazao kao jedan od potencijalnih dodatnih markera za razlikovanje adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma pluća, ali su dalja istraživanja neophodna da bi se utvrdilo koliko su ovi rezultati korisni u rutinskoj praksi patologa.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja u literaturi, možemo zaključiti da se ekspresija koneksina 43 razlikuje između različitih tipova tumora, kao i između različitih stadijuma istog tumora. Ekspresija koneksina 43 je normalno membranska, a aberantnom ekspresijom se smatraju citoplazmatska i nuklearna ekspresija. Dosadašnja istraživanja uloge koneksina 43 su dala protivrečne rezultate. Brockmeyer i saradnici su pokazali da je veća ekspresija koneksina u skvamoznom karcinomu u odnosu na normalnu mukožu usne duplje, i da je viši nivo membranske ekspresije koneksina 43 bio

povezan sa lošijim preživljavanjem (Brockmeyer i sar., 2014). Slično tome, Tanaka i saradnici su pokazali da je ekspresija koneksina 43 povezana sa lošijim preživljavanjem kod pacijenata sa skvamoznim karcinomom jednjaka (Tanaka i sar., 2016). Kod karcinoma dojke, Elzarrad i saradnici su pokazali da je viši stepen ekspresije koneksina 43 povezan sa većim stepenom adhezije tumorskih ćelija za endotel plućnih kapilara, što dovodi do razvoja metastaza (Elzarrad i sar., 2008). Tang i saradnici (2011) su ispitali ekspresiju koneksina 43 na uzorcima primarnih karcinoma želuca i njihovih metastaza, i pokazali da je u primarnim karcinomima želuca, imunohistohemijska ekspresija koneksina 43 bila znatno manja u odnosu na okolnu normalnu sluznicu, što sugeriše da smanjena ekspresija koneksina 43 može da doprinese inicijaciji karcinoma želuca (Tang i sar., 2011). Poyet i saradnici su pokazali da je povećana ekspresija koneksina 43 u primarnom karcinomu mokraćne bešike bila povezana sa lošom prognozom (Poyet i sar., 2015). Sun i saradnici su pokazali da je ekspresija koneksina 43 u karcinomu larinksa niža nego u normalnom epitelu larinksa (Sun i sar., 2004). Pored toga, pokazali su i da postoji značajna povezanost između niske ekspresije koneksina 43 i limfogenih metastaza, ali ne i preživljavanja (Sun i sar., 2004). Sa druge strane, Puzzo i saradnici su pokazali da je petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom larinksa oko 60% kod koneksin 43 pozitivnih tumora i ispod 40% kod koneksin 43 negativnih tumora (Puzzo i sar., 2016). Na uzorcima tumora štitaste žlezde, Jian-Guo i saradnici su ispitali ekspresiju koneksina 43 i pokazali da je ekspresija koneksina 43 značajno smanjena u karcinomu u odnosu na benigne tumore štitaste žlezde (Jian-Guo i sar., 2016). Takođe je pokazano da je niska ekspresija koneksina 43 povezana sa rastom tumora i proliferacijom, kao i sa nastankom distalnih metastaza (Jian-Guo i sar., 2016). Stoletov i saradnici su ispitali ekspresiju koneksina 43 kod metastaza karcinoma dojke u moždanom parenhimu. Pokazali su da je prisutna pojačana ekspresija koneksina 43 u metastatskim depozitima u odnosu na normalni moždani parenhim (Stoletov i sar., 2013).

Na animalnom modelu, de Oliveira i saradnici su pokazali da nedostatak koneksina 43 značajno povećava podložnost razvoju karcinoma pluća, što ukazuje na povezanost nedostatka koneksina 43 i karcinogeneze (de Oliveira i sar., 2013). Slično tome, Tittarelli i saradnici su primetili niži stepen rasta tumora kod melanoma koji su imali viši stepen ekspresije koneksina 43 (Tittarelli i sar., 2015), a slični rezultati su nađeni i na ćelijskoj kulturi karcinoma pluća (Zhang i sar., 1998). Ovi rezultati bi se mogli objasniti time da pojačana ekspresija koneksina 43 dovodi do većeg stvaranja poroznih veza, što ima za posledicu inhibiciju tumorskog rasta preko olakšane transmisije cAMP, što je dovelo i do hipoteze o inhibitornoj ulozi koneksina u nastanku karcinoma (Zhang i sar., 2001). Takođe, koneksini mogu dovesti do inhibicije tumorskog rasta preko C-terminusa interagujući sa signalnim medijatorima. Osim toga, na ćelijskoj kulturi karcinoma pluća, Zhao i saradnici su pokazali i da transfekcija koneksinom 43 smanjuje invazivnost i metastatski potencijal preko inhibicije histonskih deacetilaza, ali ne redukuje ćelijsku migraciju (Zhao i sar., 2013). Na kulturi C6 glioma ćelija, pokazano je da transfekcija koneksinom 43 smanjuje tumorigenost, i brzina tumorskog rasta je bila obrnuto proporcionalna sa stepenom ekspresije koneksina 43, što ukazuje na to da je ekspresija koneksina 43 povezana sa smanjenim rastom tumora mozga (Naus i sar., 1992). Soroceanu i saradnici su našli da je ekspresija koneksina 43 smanjena u glioblastomu u odnosu na niskogradusne astroцитome ili uzorke temporalnog režnja kod epilepsije, što korelira sa smanjenim brojem poroznih veza (Soroceanu i sar., 2001).

Budući da je koneksin 43 integralni transmembranski protein, normalna tkiva ga ekspimiraju membranski u imunohistohemijskim bojenjima (Cogliati i sar., 2016). Za razliku od toga, prethodne studije su pokazale dominantno aberantnu, citoplazmatsku ekspresiju koneksina 43 u tumorima (Cogliati i sar., 2016; Brockmeyer i sar., 2014), što se može razumeti ili kao smanjen transport koneksina 43 do ćelijske membrane ili kao njegoa povećana internalizacija i razgradnja (Rose i sar.,

1993). Dok neki autori smatraju da aberantna ekspresija koneksina 43 promoviše onkogenezu (Cogliati i sar., 2016), prethodna studija na skvamoznom karcinomu usne duplje je sugerisala da citoplazmatski koneksin 43 funkcioniše kao depo, a da jedino membranska translokacija koneksina 43, koji gradi porozne veze, ima uticaja na interćelijsku komunikaciju (Brockmeyer i sar., 2014). Pored toga, studija na skvamoznom karcinomu usne duplje je pokazala da je visoka membranska ekspresija koneksina 43 nezavisni prognostički faktor lošeg preživljavanja (Brockmeyer i sar., 2014).

Nema detaljnih podataka o subcelularnoj lokalizaciji koneksina u karcinomima pluća, ali podaci iz studije na pacijentima sa karcinomom dojke pokazuju dominaciju citoplazmatske lokalizacije koneksina 43 u primarnim tumorima, dok limfogene metastaze imaju dodatnu izraženu membransku pozitivnost (Kanczuga-Koda i sar., 2006). Naši rezultati su pokazali pretežno aberantnu lokalizaciju ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća, budući da je retko bila čisto membranska, već uglavnom čisto citoplazmatska, kombinovana membranskocitoplazmatska, i ponekad čak nuklearna. Iako je još uvek nedovoljno jasno značenje aberantne ekspresije koneksina 43 u tumorima, naši rezultati na celim presecima tkivnih isečaka hirurških resekcija su pokazali da je skvamozni karcinom pluća imao sličnu učestalost čisto citoplazmatske i kombinovane membranskocitoplazmatske ekspresije koneksina 43. Za razliku od skvamoznog karcinoma, u adenokarcinomu je ekspresija koneksina 43 bila pretežno citoplazmatska. Imajući u vidu rezultate prethodnih studija, moglo bi se pretpostaviti da je citoplazmatska ekspresija depo koneksina; dok se kod nekih tumora koneksin 43 iz citoplazme ugrađuje u ćelijsku membranu (kombinovana membranskocitoplazmatska ekspresija), što omogućuje formiranje poroznih veza i/ili hemikanala, kod drugih postoji blok u ugradnji koneksina 43 u membranu, što sprečava komunikaciju putem poroznih veza. Pored toga, zanimljivo je da je uočena i nuklearna ekspresija koneksina 43; ova lokalizacija ekspresije koneksina 43 je vrlo retko bila prisutna, i gotovo isključivo prisutna u adenokarcinomima.

Različita ekspresija koneksina 43 bi mogla da sugerise razlike u biološkom ponašanju različitih histoloških podtipova tumora. Ona je možda povezana sa razlikama u promotorskoj metilaciji (Chen i sar., 2003), a moguće je i da je delom rezultat različitog porekla adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma. Međutim, dodatne eksperimentalne i kliničke studije su potrebne da bi se razjasnila uloga koneksina 43 u razvoju kancera i njegovoj progresiji, te da bi se bolje razumele ove razlike i njihov klinički značaj. Takođe su neophodne studije sa većom veličinom uzorka da se istraže razlozi za razlike u lokalizaciji između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma pluća i da se utvrdi potencijalni prognostički značaj ovih razlika.

Intraalveolarno širenje tumora pluća (STAS) je fenomen koji u poslednje vreme privlači sve veću pažnju istraživača budući da odgovara invazivnom frontu i da je povezan sa prognozom i ponašanjem tumora (Warth, 2017). Iako smo pokazali da se prisustvo STAS-a nije razlikovalo između tumora koji su dali limfogene metastaze i onih koji nisu, ekspresija koneksina 43 u STAS-u je bila povezana sa blago povećanim rizikom od nastanka limfogenih metastaza u skvamoznom karcinomu ali ne i adenokarcinomu. Međutim, budući da su ovi podaci bazirani na malom broju uzoraka sa STAS-om u našem istraživanju, potrebne su veće studije da bi se dalje razjasnila veza između koneksina 43, STAS-a i ponašanja tumora.

Takođe smo ispitali razlike u ekspresiji koneksina 43 između invazivnog fronta i centralnog dela tumora na tkivnom mikronizu nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Analiza ekspresije koneksina 43 je pokazala da i invazivni front i centralni deo tumora često ekspresiraju koneksin 43. Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji koneksina 43 između invazivnog fronta i centralnog dela tumora

u adenokarcinomu i skvamoznom karcinomu pluća. Ipak, pokazali smo da je kod adenokarcinoma, ali ne i skvamoznog karcinoma, bila statistički značajno veća ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u centralnom delu tumora nego u invazivnom frontu tumora, što sugeriše da i stromalne ćelije mogu imati ulogu u tumorskoj progresiji, kao i da se ta uloga razlikuje između patohistoloških tipova karcinoma pluća.

Nema podataka u literaturi u vezi sa razlikama u ekspresiji koneksina 43 između invazivnog fronta i centralnog dela tumora kod nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Studija na adenokarcinomu kolona je pokazala veću ekspresiju koneksina 43 u invazivnom frontu (Han i sar., 2011), što sugeriše da koneksin 43 igra određenu ulogu u karcinogenezi i tumorskoj progresiji preko poroznih veza ili preko nekih drugih signalnih puteva kao što je Wnt/ $\beta$ -catenin.

Migracija karcinomskih ćelija iz primarnog tumora u limfne noduse i udaljene organe zahteva promenu fenotipa ćelija iz epitelnog u mezenhimni kroz proces epitelnomezenhimne tranzicije (Thiery i sar., 2009). Konkretno, epitelnomezenhimna tranzicija je proces u kome epitelne ćelije gube polaritet i dobijaju karakteristike mezenhimnih ćelija. Na taj način, maligne ćelije dobijaju sposobnost kretanja kroz vezivno tkivo, što pojačava njihov metastatski potencijal (Thiery i sar., 2009). Budući da u procesu epitelnomezenhimne tranzicije epitelne ćelije gube međućelijsku adhezivnost i polaritet, one smanjuju ekspresiju epitelnih markera, kao što je E-kadherin, dok pojačavaju ekspresiju mezenhimnih markera kakav je vimentin. Eksperimentalna studija na kulturi nesitnoćelijskog karcinoma pluća je pokazala da ćelije koje ekspimiraju E-kadherin imaju i veću senzitivnost za inhibiciju epidermalnog faktora rasta (EGFR), dok ćelije koje ekspimiraju vimentin nisu osetljive na inhibiciju EGFR (Thomson i sar., 2005).  $\beta$ -catenin je važan deo proteinskog kompleksa kadherina. Važan je za regulaciju ćelijske adhezije ali i ključan transkripcioni faktor u Wnt signalnom putu koji učestvuje u važnim ćelijskim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija, apoptoza i drugo (Sahin i sar., 2017). Vimentin je važan mezenhimni marker. Pokazano je da nakon onkogene transformacije epitelnih ćelija, dolazi do povećane ekspresije vimentina i gubitka ekspresije keratina (Kokkinos i sar., 2007). Ovo omogućava kretanje tumorskih ćelija i širenje tumora. Dakle, povećana ekspresija vimentina ukazuje na akviziciju migratornog i invazivnog tumorskog fenotipa.

Prethodne studije su pokazale da je epitelnomezenhimna tranzicija povezana sa metastazama, stečenom rezistencijom na lekove, kao i progresijom mnogih tumora (Morel i sar., 2008; Hugo i sar., 2007; Lee i sar., 2006), ali postoji nedovoljno podataka na tumorima pluća. Posebno imajući u vidu potencijalnu vezu između koneksina 43 i epitelnomezenhimne tranzicije, sledeći deo ovog istraživanja je obuhvatio analizu odnosa ekspresije koneksina 43 sa ekspresijom markera epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, budući da su ovi markeri važan pokazatelj progresije tumora i rizika od metastaziranja.

U ovom istraživanju smo pokazali da postoji određena veza između ekspresije koneksina 43 i ekspresije markera epitelnomezenhimne tranzicije, ali smo i uočili da se obrazac ove veze razlikuje između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma kako u primarnom tumoru (invazivni front i centralni deo tumora) tako i u limfogenoj metastazi karcinoma pluća.

U centralnom delu tumora, postojala je značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u invazivnom frontu tumora i limfogenim metastazama postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma.



Konkretno, u centralnom delu tumora kod adenokarcinoma, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su češće ekspimirali E-kadherin (75,8%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 1 (63,6%), mada ne i tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 2. Međutim, skvamozni karcinom je pokazao suprotan trend; naime, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su ređe ekspimirali E-kadherin (50%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 1 (60%), mada ne i tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 2.

U invazivnom frontu tumora je postojala značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 samo kod skvamoznog karcinoma. Odnos ekspresije E-kadherina i koneksina 43 je bio sličan kao kod centralnog dela tumora; naime, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su ređe ekspimirali E-kadherin (60%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 1 (83,3%), mada ne i tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 2.

U limfogenim metastazama je postojala značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 samo kod skvamoznog karcinoma. Metastaze koji nisu ekspimirale koneksin 43 su češće ekspimirale E-kadherin u odnosu na metastaze koji su ekspimirale koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2).

Kada je u pitanju ekspresija  $\beta$ -katenina, pokazali smo da je u centralnom delu tumora i limfogenim metastazama postojala značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u invazivnom frontu tumora postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma.

Konkretno, u centralnom delu tumora kod adenokarcinoma, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su češće ekspimirali  $\beta$ -katenin (72,7%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 1 ili 2 (64,7%). Što se tiče skvamoznog karcinoma, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su češće ekspimirali  $\beta$ -katenin (100%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 1 ili 2 (56%).

U invazivnom frontu tumora je postojala značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 samo kod skvamoznog karcinoma. Naime, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su ređe ekspimirali  $\beta$ -katenin (60%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 sa stepenom ekspresije 1 ili 2 (70,8%).

U limfogenim metastazama je postojala značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma. Kod adenokarcinoma, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su češće ekspimirali  $\beta$ -katenin (100%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (64,3%). Sličan trend je pokazao skvamozni karcinom; naime, metastaze koje nisu ekspimirale koneksin 43 su češće ekspimirale  $\beta$ -katenin (100%) u odnosu na metastaze koje su ekspimirale koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (55,5%).

Najzad, kada je u pitanju vimentin, i u centralnom delu tumora i u invazivnom frontu je postojala statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma. Konkretno, u centralnom delu tumora kod adenokarcinoma, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su ređe ekspimirali vimentin (12,5%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (37,5%). Međutim,

skvamozni karcinom je pokazao suprotan trend; naime, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su češće ekspimirali vimentin (75%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (15,4%).

Slični rezultati su dobijeni i u invazivnom frontu tumora. Naime, kod adenokarcinoma, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su ređe ekspimirali vimentin (14,3%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (21%). Skvamozni karcinom je pokazao suprotan trend; naime, tumori koji nisu ekspimirali koneksin 43 su češće ekspimirali vimentin (60%) u odnosu na tumore koji su ekspimirali koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (8,3%).

U limfogenim metastazama je postojala značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 samo kod skvamoznog karcinoma. Odnos ekspresije vimentina i koneksina 43 je bio sličan kao kod primarnog tumora; naime, metastaze koji nisu ekspimirale koneksin 43 su češće ekspimirale vimentin (50%) u odnosu na metastaze koji su ekspimirale koneksin 43 (stepen ekspresije 1 ili 2) (11,1%).

Ukoliko se zajedno sagledaju ovi rezultati koji se odnose na povezanost između ekspresije koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije, može se primetiti da uglavnom postoji suprotan obrazac veze između ekspresije koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije kod adenokarcinoma u odnosu na skvamozni karcinom. Naime, prisustvo ekspresije koneksina 43 u primarnom adenokarcinomu pluća je uglavnom bilo povezano sa češćom ekspresijom vimentina, intermedijernog filameta koji je normalno prisutan u mezenhimnim ćelijama, kao i sa ređom ekspresijom E-kadherina i  $\beta$ -katenina, što ukazuje na odvijanje procesa epitelnomezenhimne tranzicije. Postoji veći broj dokaza da je vimentin značaj igrač u progresiji karcinoma pluća. Naime, intermedijerni vimentinski filamenti se dovode u vezu sa brojnim aspektima inicijacije i progresije karcinoma, uključujući tumorigenezu, epitelnomezenhimnu tranziciju i metastaziranje tumora. Vimentin je kanonski marker epitelnomezenhimne tranzicije i važan regulator ćelijskog motiliteta (Kidd i sar., 2014). Budući da je u adenokarcinomu dominirala citoplazmatska ekspresija, koja je u osnovi aberantna, očekivano je da koneksin 43 kod ovog tipa tumora ređe formira porozne veze, koje su membranske strukture. U prethodnoj studiji koja je rađena na ćelijskoj kulturi HCC827 and PC9 humanog plućnog adenokarcinoma, endogeni i naglašeno ekspimirani koneksin 26 bio je lokalizovan pretežno u citoplazmi, te stoga nije mogao da formira porozne veze (Yang i sar., 2015); pored toga, izražena ekspresija koneksina 26 je promovisala tumorski rast, epitelnomezenhimnu tranziciju (što pokazuje smanjena ekspresija E-kadherina, kao i pojačana ekspresija vimentina i Slug), migraciju i invaziju preko signalnog PI3K/Akt puta (Yang i sar., 2015).

Za razliku od adenokarcinoma, prisustvo ekspresije koneksina 43 u primarnom skvamoznom karcinomu pluća je bilo povezano sa ređom ekspresijom vimentina. Epitelni markeri kao što su E-kadherin i  $\beta$ -katenin su pokazali delimično kontradiktornu ekspresiju; naime, E-kadherin i  $\beta$ -katenin su pokazali sličnu i očekivanu ekspresiju samo u invazivnom frontu, dok su u centralnom delu tumora pokazali međusobno suprotne rezultate. Uopšte uzevši, primećene razlike u povezanosti ekspresije koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma pluća mogu ukazivati na različitu ulogu koneksina 43 kod ova dva histološka tipa nesitnoćelijskog karcinoma pluća kao i na njihovo različito biološko ponašanje.

Takođe se da uočiti da veza između ekspresije koneksina 43 i ekspresije markera epitelnomezenhimne tranzicije nije nužno linearna, budući da smo kod E-kadherina uočili da drugi stepen ekspresije

koneksina 43 pokazuje neočekivano suprotnu ekspresiju ovih markera u odnosu na tumore sa prvim stepenom ekspresije koneksina 43. Ovo sugerise da možda postoji kompleksnija veza između analiziranih markera, te da možda postoje i drugi faktori koji modulišu vezu između ekspresije koneksina i epitelnih markera.

Zanimljivo je i da se veza između ekspresije koneksina 43 i ekspresije markera epitelnomezenhimne tranzicije u metastazama u limfnom čvoru ne poklapa uvek sa nalazom u primarnom tumoru, što je pretežno bio slučaj epitelnih markera kod skvamoznog karcinoma. Ovaj rezultat je moguće objasniti na sledeći način. Ekspresija koneksina 43 u primarnom skvamoznom karcinomu je generalno bila povezana sa smanjenom ekspresijom vimentina i povećanom ekspresijom epitelnih markera u odnosu na tumore koji ne ekspimiraju koneksin 43. Ovo bi moglo da sugerise da prisustvo koneksina 43 u skvamoznom karcinomu ukazuje i na manji rizik od epitelnomezenhimne tranzicije i metastaziranja. Međutim, kada se limfogene metastaze kod skvamoznog karcinoma ipak razvijaju, nije nelogično da one pokazuju smanjenu ekspresiju epitelnih markera.

Treba imati u vidu i da su određene podkategorije u tablicama kontingencije koje se odnose na vezu između ekspresije koneksina 43 i ekspresije markera epitelnomezenhimne tranzicije imale mali broj uzoraka, tako da su pojedini kontradiktorni rezultati ili nedostatak statističke značajnosti moguće time uslovljeni. Osim toga, ekspresija svih markera je tretirana kao kategorijalna varijabla, gde su za markere epitelnomezenhimne tranzicije korišćene samo dve kategorije. Ove kategorije su definisane na sledeći način: kada je manje od 10% tumorskih ćelija ekspimiralo određeni marker, takav uzorak je označavan kao negativan; kada je 10% ili više tumorskih ćelija ekspimiralo određeni marker, takav uzorak je označavan kao pozitivan. Moguće je da bi drugačiji odabir praga za pozitivnost doveo do nešto drugačijih rezultata, kao i da bi neki trendovi bili uočljiviji sa više podkategorija ekspresije ovih markera. Međutim, dalje usitnjavanje uzorka ove veličine ne bi imalo statističkog smisla, pa so svakako potrebne dodatne studije sa većim uzorkom da bi se detaljnije utvrdila veza između koneksina 43 i markera epitelnomezenhimne tranzicije.

Analiza korelacije veličine tumora (pT stadijuma) sa ekspresijom koneksina 43 nije pokazala statistički značajne razlike u ekspresiji koneksina 43 po pT stadijumima u centralnom delu tumora niti u invazivnom frontu kod adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma. Međutim, pokazali smo značajnu razliku u ekspresiji koneksina 43 po pT stadijumima u invazivnom frontu skvamoznog karcinoma. Naime, uočeno je da je kod svih stadijuma izuzev pT3 stadijuma barem 50% uzoraka ekspimiralo koneksin sa stepenom ekspresije 2; kod stadijuma pT3 nije zabeležen nijedan slučaj visokog stepena ekspresije koneksina 43, već je dominirao prvi stepen ekspresije koneksina 43 (80%). Ovo ukazuje da veliki skvamozni karcinomi smanjuju ekspresiju koneksina, što možda može biti povezano sa različitim ponašanjem ovog tumora.

Tang i saradnici (Tang i sar., 2011) su ispitali ekspresiju koneksina 43 i E-kadherina na uzorcima primarnih karcinoma želuca i njihovih metastaza, i pokazali da je imunohistohemijska ekspresija koneksina 43 i E-kadherina u limfnim čvorovima bila znatno viša u odnosu na primarni tumor. Ovi rezultati sugerisu da povećana ekspresija koneksina 43 može da doprinese nastanku metastaza (Tang i sar., 2011). Kanczuga-Koda i saradnici su ispitali ekspresiju koneksina 43 u primarnom karcinomu dojke i odgovarajućim metastazama u limfnim čvorovima. Autori su pokazali da je ekspresija koneksina 43 bila veća u metastazama u odnosu na primarni tumor, što ukazuje na to da je koneksin potreban za efikasno metastaziranje karcinoma dojke u limfne čvorove. Pored toga, pokazali su i da je pored membranske lokalizacije koneksina bila prisutna i citoplazmatska ekspresija (Kanczuga-Koda i

sar., 2006). Kada su u pitanju karcinomi pluća, naše istraživanje je pokazalo da je više od 65% primarnih nesitnoćelijskih karcinoma pluća ekspresiralo koneksin 43, i da je skvamozni karcinom imao značajno veću ekspresiju koneksina 43 nego adenokarcinom. Dok su limfne metastaze skvamoznog karcinoma pokazale sličnu ekspresiju koneksina 43 kao primarni tumor, trećina pacijenata sa adenokarcinomom je imala izmenjenu ekspresiju koneksina 43 u odnosu na primarni tumor, bilo u smislu smanjenja ili u smislu povećanja ekspresije. Dalje studije su neophodne da bi se utvrdilo da li transkriptom u limfogenim metastazama značajno odstupa od transkriptoma primarnog tumora, što bi mogao da bude indikator tumorske heterogenosti. Fenomen tumorske heterogenosti se danas smatra odgovornim za recidiv nakon hirurške resekcije tumora, rezistenciju na lečenje, i lošije ishode različitih tumora (Stanta i Bonin, 2018; Guo i sar., 2019). Ipak, treba naglasiti da slična ekspresija koneksina 43 između primarnog i sekundarnog tumora kod skvamoznog karcinoma u našem istraživanju možda odražava i rezultat da je već primarni tumor imao maksimalan stepen ekspresije koneksina 43. Zanimljivo je da za razliku od adenokarcinoma, kod skvamoznog karcinoma nisu zabeleženi slučajevi smanjenja ekspresije koneksina 43 u limfogenoj metastazi u odnosu na primarni tumor.

Ispitali smo i razliku u ekspresiji koneksina 43 između primarnog i metastatskog tumora na obdukcijom materijalu da bismo bolje razumeli ulogu koneksina 43 u tumorskom ponašanju. Evidentno je da ekspresija koneksina 43 nije uvek ista između primarnog tumora i limfogene ili hematogene metastaze, ali nismo našli statistički značajnu pravilnost u ovoj razlici. Ovo je možda delom posledica manje veličine uzorka sa obdukcijom, kao i delimične autolize tkiva nakon smrti. Međutim, ispitivanje ekspresije koneksina u hematogenim metastazama je gotovo isključivo jedino moguće na obdukcijom materijalu budući da se kod raširene bolesti ne radi resekcija pojedinačnih hematogenih metastaza.

U ovom istraživanju smo pokazali kakva je ekspresija koneksina 43 u različitim histopatološkim tipovima nesitnoćelijskog karcinoma pluća, što može da bude od koristi kao dodatni parametar u diferenciranju ovih tipova karcinoma, posebno imajući u vidu da je adenokarcinom značajno ređe i manje ekspresirao koneksin 43 u odnosu na skvamozni karcinom.

Budući da je od izuzetnog značaja otkrivanje novih markera biološkog ponašanja nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ovo istraživanje postavlja osnovu da bi se ustanovilo da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker ili kao marker rizika od nastanka metastaza u karcinomima pluća. Veći broj studija je ispitivao ekspresiju koneksina kod različitih primarnih i/ili sekundarnih tumora kao i njenu povezanost sa prognozom. Dosadašnji rezultati su pokazali da je ekspresija koneksina 43 povezana sa različitim aspektima tumorskog ponašanja. Međutim, ova istraživanja su pokazala da se ekspresija koneksina razlikuje između različitih tipova i lokalizacija tumora, kao i između različitih faza u progresiji tumora, što ukazuje na kompleksnu ulogu koneksina 43 u različitim fazama razvoja tumora i kod različitih tumora. Neke od studija su pokazale i aberantnu, uglavnom citoplazmatsku ekspresiju koneksina u tumorima, ali još uvek nije jasno da li je citoplazmatska ekspresija koneksina samo depo ili igra aktivnu ulogu u tumorskom ponašanju.

S obzirom na to da gradiranje i određivanje stadijuma kod malignih neoplazmi nije dovoljno za predviđanje progresije bolesti, važno je otkrivanje novih prognostičkih i prediktivnih markera. Budući da porodne veze imaju ulogu u kancerogenezi kao i invaziji i metastaziranju malignih ćelija, dalje studije treba da razjasne da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker ili kao marker rizika od nastanka metastaza u različitim karcinomima. Dalja istraživanja su potrebna i da bi se

razjasnile uloge koneksina i poroznih veza u fiziološkim i patološkim uslovima, što je preduslov za potencijalno targetovanje koneksina u terapiji.



## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih istraživanja, možemo da izvedemo sledeće zaključke:

- Analiza ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je pokazala da i skvamozni karcinom i adenokarcinom često ekspimiraju koneksin 43. Međutim, skvamozni karcinom je pokazao značajno veći stepen ekspresije kao i veći intenzitet ekspresije koneksina 43 u odnosu na adenokarcinom.
- Ekspresija koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je često aberantna po lokalizaciji, tj. koneksin 43 je ekspimiran u citoplazmi ili čak u jedru, u odnosu na tipičnu membransku lokalizaciju. Pored izolovane membranske, citoplazmatske, i nuklearne ekspresije, bili su prisutni i slučajevi kombinovane membranskocitoplazmatske i nuklearnocitoplazmatske ekspresije. Lokalizacija ekspresije koneksina 43 je bila statistički značajno drugačija u skvamoznom karcinomu nego u adenokarcinomu. Naime, lokalizacija ekspresije koneksina 43 kod skvamoznih karcinoma je najčešće bila kombinovana, dok je kod adenokarcinoma podjednako često bila čisto citoplazmatska i kombinovana.
- Analiza ekspresije koneksina 43 u nesitnoćelijskim karcinomima pluća je pokazala da i invazivni front i centralni deo tumora često ekspimiraju koneksin 43. Nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji koneksina 43 između invazivnog fronta i centralnog dela tumora kako u adenokarcinomu tako i u skvamoznom karcinomu. Međutim, kod adenokarcinoma je nađena statistički značajno veća ekspresija koneksina 43 u stromalnim ćelijama u centralnom delu tumora nego u invazivnom frontu tumora, što nije potvrđeno kod skvamoznog karcinoma.
- Pokazali smo i da ekspresija koneksina 43 korelira sa ekspresijom markera epitelnomezenhimne tranzicije kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ali su uočeni različiti obrasci korelacije između adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma.
- U centralnom delu tumora, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji E-kadherina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u invazivnom frontu tumora i limfogenim metastazama postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma.
- U centralnom delu tumora i limfogenim metastazama, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji  $\beta$ -katenina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u invazivnom frontu tumora postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma.
- U centralnom delu tumora i invazivnom frontu, postojala je statistički značajna razlika u ekspresiji vimentina u zavisnosti od ekspresije koneksina 43 i kod adenokarcinoma i kod skvamoznog karcinoma, dok je u limfogenim metastazama postojala značajna razlika samo kod skvamoznog karcinoma.
- Analiza ekspresije koneksina 43 na hirurškom materijalu je pokazala da su limfogene metastaze skvamoznog karcinoma imale ekvivalentnu ekspresiju koneksina 43 kao primarni tumor, dok su limfogene metastaze adenokarcinoma u približno jednoj trećini slučajeva pokazale promenjen profil ekspresije koneksina 43 u odnosu na primarni tumor.
- Ispitivanjem ekspresije koneksina 43 na obdukcijском materijalu nisu nađene statistički značajne razlike u ekspresiji koneksina 43 između primarnog tumora i metastaza u limfnim čvorovima, niti između primarnog tumora i pripadajuće hematogene metastaze kod oba ispitivana patohistološka tipa.

- Dalje studije su potrebne da bi se potvrdilo da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker ili kao marker rizika od nastanka metastaza u karcinomima pluća.

## 7. REFERENCE

- Aasen T, Leithe E, Graham SV, Kameritsch P, Mayán MD, Mesnil M, Pogoda K, Taberner A. Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*. 2019;38(23):4429-4451.
- Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia*. 2007;55(15):1554-64.
- Brockmeyer P, Jung K, Perske C, Schliephake H, Hemmerlein B. Membrane connexin 43 acts as an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014;45(1):273-81.
- Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci*. 2009;29(7):2009-21.
- Colby TV, Koss MN, Travis WD (1995). Tumors of the lower respiratory tract AFIP Atlas of Tumor Pathology. 3rd ed volume 13. Washington, DC: American Registry of Pathology.
- Crespo Yanguas S, Willebrords J, Maes M, da Silva TC, Veloso Alves Pereira I, Cogliati B, Zaidan Dagli ML, Vinken M. Connexins and pannexins in liver damage. *EXCLI J*. 2016;15:177-86.
- Cogliati B, Maes M, Pereira IV, Willebrords J, Da Silva TC, Crespo Yanguas S, Vinken M. Immunohisto- and Cytochemistry Analysis of Connexins. *Methods Mol Biol*. 2016;1437:55-70.
- Defamie N, Chepied A, Mesnil M. Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS Lett*. 2014;588(8):1331-8.
- de Oliveira KD, Tedardi MV, Cogliati B, Dagli ML. Higher incidence of lung adenocarcinomas induced by DMBA in connexin 43 heterozygous knockout mice. *Biomed Res Int*. 2013;2013:618475.
- Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 1976;2:1525-36.
- Dubin S, Griffin D. Lung Cancer in Non-Smokers. *Mo Med*. 2020;117(4):375-379.
- Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi AB. Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med*. 2008;6:20.
- Feld R, Ginsberg RJ, Payne DG i sar. Lung. In: Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS i sar., eds. *Clinical oncology*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 2000:1398-477.
- Fonseca FP, de Andrade BA, Rangel AL, Della Coletta R, Lopes MA, de Almeida OP, Vargas PA. Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117(1):81-88.

Ganti AK, Klein AB, Cotarla I, Seal B, Chou E. Update of Incidence, Prevalence, Survival, and Initial Treatment in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer in the US. *JAMA Oncol.* 2021;7(12):1824-1832.

Geddes DM. The natural history of lung cancer: a review based on rates of tumour growth. *Br J Dis Chest.* 1979;73:1-17.

Ginsberg RJ, Hill LD, Eagan RT i sar. Modern 30-day operative mortality for surgical resection in lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983;86:654-8.

Guo M, Peng Y, Gao A, Du C, Herman JG. Epigenetic heterogeneity in cancer. *Biomark Res.* 2019;7:23.

Han Y, Zhang PJ, Chen T, Yum SW, Pasha T, Furth EE. Connexin43 Expression Increases in the Epithelium and Stroma along the Colonic Neoplastic Progression Pathway: Implications for Its Oncogenic Role. *Gastroenterol Res Pract.* 2011;2011:561719.

Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, Mariotto AB, Lowy DR, Feuer EJ. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med.* 2020;383(7):640-649.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, i sar. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007;213:374-83.

Institut Batut. Health Statistical Yearbook of the Republic of Serbia. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia; 2012. [Last accessed on 2017 Feb 05]. Available from: <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2012.pdf>

International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: cancer today. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today> (accessed Jan 19, 2020).

Jian-Guo S, Bin W, Zong-Ping D, Kun-Kun C, Sai Z, Zheng-Guo. BRMS1 and Cx43 expression in fine needle aspiration thyroid cancer tissue and their correlation with tumor malignancy, *Journal of Hainan Medical University* 2016; 22:112-115.

Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M, Sulkowska M. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(4):429-33.

Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(1):1-6.

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer—Observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs.* 2007;185:191-203.

- Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006;12:5369-76.
- Loewenstein WR, Socolar SJ, Higashino S, Kanno Y, Davidson N. Intercellular communication: renal, urinary bladder, sensory, and salivary gland cells. *Science* 1965;149:295-298.
- Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J Cell Biol*. 1967;33(2):225-34.
- McNutt NS, Weinstein RS. Carcinoma of the cervix: deficiency of nexus intercellular junctions. *Science* 1969;165:597-599.
- Mino-Kenudson M. Significance of tumor spread through air spaces (STAS) in lung cancer from the pathologist perspective. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(3):847-859.
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3:e2888.
- Mulkearns-Hubert EE, Reizes O, Lathia JD. Connexins in Cancer: Jekyll or Hyde? *Biomolecules*. 2020;10(12):1654.
- Naus CC, Elisevich K, Zhu D, Belliveau DJ, Del Maestro RF. In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Cancer Res*. 1992;52(15):4208-13.
- Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, Kaplan JB, Chae YK, Giles FJ. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):101.
- Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone*. 2013 Jan;52(1):157-66.
- Poyet C, Buser L, Roudnicky F, Detmar M, Hermanns T, Mannhard D, Höhn A, Rüschoff J, Zhong Q, Sulser T, Moch H, Wild PJ. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol*. 2015;68(10):819-24.
- Puzzo L, Caltabiano R, Parenti R, Trapasso S, Allegra E. Connexin 43 (Cx43) Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas: Preliminary Data on Its Possible Prognostic Role. *Head Neck Pathol*. 2016;10(3):292-7.
- Reuter S, Martin H, Beckert H, Bros M, Montermann E, Belz C, Heinz A, Ohngemach S, Sahin U, Stassen M, Buhl R, Eshkind L, Taube C. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway attenuates experimental allergic airway disease. *J Immunol*. 2014;193(2):485-95.
- Rose B, Mehta PP, Loewenstein WR. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. *Carcinogenesis*. 1993;14(5):1073-5.



- Savic Milovanovic I, Stjepanovic M, Mitrovic D. Distribution patterns of the metastases of the lung carcinoma in relation to histological type of the primary tumor: An autopsy study. *Ann Thorac Med.* 2017;12(3):191-198.
- Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):228-32.
- Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia.* 2001;33(2):107-17.
- Stanta G, Bonin S. Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:85.
- Stoletov K, Strnadel J, Zardouzian E, Momiyama M, Park FD, Kelber JA, Pizzo DP, Hoffman R, VandenBerg SR, Klemke RL. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 4):904-13.
- Sun WH, Liu HM, Li YJ, Ji XR, Liang DP. [A study of the relationship between the expression of connexin43, E-cadherin and biological behaviors of human laryngeal cancer]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2004;39(5):293-7.
- Tanaka T, Kimura M, Ishiguro H, Mizoguchi K, Takeyama H. Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2016;4(6):989-993.
- Tang B, Peng ZH, Yu PW, Yu G, Qian F. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med Oncol.* 2011;28(2):502-8.
- Tanoue LT. Lung Cancer Staging. *Clin Chest Med.* 2020;41(2):161-174.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90.
- Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, Iwata KK, Gibson N, Haley JD. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res.* 2005;65(20):9455-62.
- Tittarelli A, Guerrero I, Tempio F, Gleisner MA, Avalos I, Sabanegh S, Ortíz C, Michea L, López MN, Mendoza-Naranjo A, Salazar-Onfray F. Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *Br J Cancer.* 2015;113(2):259-67.
- Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2011;32(4):669-692.
- van Zandwijk N. Neoadjuvant strategies for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2001;34 Suppl 2:S145-50.

Verheule S, Kaese S. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. *Front Pharmacol.* 2013;4:81.

Warth A. Spread through air spaces (STAS): a comprehensive update. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(5):501-507.

Wu JI, Wang LH. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):8.

Xiao D, He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis.* 2010;2(3):154-159.

Yang P, Wentzlaff KA, Katzmann JA i sar. Alpha1 antitrypsin deficiency allele carriers among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 8:461-5.

Yang J, Qin G, Luo M, Chen J, Zhang Q, Li L, i sar. Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1829.

Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene.* 2001;20(31):4138-49.

Zhao JQ, Sun FJ, Liu SS, Yang J, Wu Y-Q, Li G-S, i sar. Expression of connexin 43 and E-cadherin protein and mRNA in non-small cell lung cancers in Chinese patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013;14:639-643.

Zhang ZQ, Zhang W, Wang NQ, Bani-Yaghoub M, Lin ZX, Naus CC. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis.* 1998;19(11):1889-94.

## **Biografija kandidata**

Dr Ivana Savić je rođena 20.08.1986. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2005. g. a diplomirala 2011. g. sa prosečnom ocenom 9,27. Specijalizaciju iz patologije je stekla na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2018. g. Doktorske studije na modulu Molekularna medicina je upisala 2018. g. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast patologija izabrana je 2013. g, a 2015. g. godine je izabrana u zvanje asistenta. Dobitnik je većeg broja priznanja za naučni rad kao i nagrade za posvećenost u radu sa studentima. Usavršavala se kako na brojnim stručnim i naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu, tako i na studijskim boravcima u SAD, Nemačkoj i Sloveniji. Učesnik je na projektu koji finansira MNTR od 2011. g. kao i na projektu u okviru programa Promis koji finansira Fond za nauku R. Srbije od 2020. g. Autor je ili koautor 8 naučnih publikacija od kojih je 4 štampano u celini u časopisima indeksiranim u Journal Citation Reports listi, a 4 rada su objavljena u celini u časopisima koji nisu referisani u navedenoj listi.



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Савић

Број индекса ММ-2018 5061

Студијски програм молекуларна медицина

Наслов рада ЕКСПРЕСИЈА ПРОТЕИНА ПОРОЗНИХ ВЕЗА, КОНЕКСИНА 43, У  
ПРИМАРНИМ И МЕТАСТАТСКИМ НЕСИТНОЋЕЛИЈСКИМ КАРЦИНОМИМА  
ПЛУЋА

Ментор Проф. др Дејан Опрић и проф. др Небојша Ивановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 14.07.2022.



---



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ЕКСПРЕСИЈА ПРОТЕИНА ПОРОЗНИХ ВЕЗА, КОНЕКСИНА 43, У ПРИМАРНИМ И МЕТАСТАТСКИМ НЕСИТНОЋЕЛИЈСКИМ КАРЦИНОМИМА ПЛУЋА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

**Потпис аутора**

У Београду, 14.07.2022.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.