

Ekspresija proteina SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 i DVL3 signalnog puta Wnt u tkivu seroznoga karcinoma jajnika

Kardum, Vedran

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:561754>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vedran Kardum

**Ekspresija proteina SFRP1, SFRP3,
DVL1, DVL2 i DVL3 signalnog puta Wnt
u tkivu seroznoga karcinoma jajnika**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vedran Kardum

**Ekspresija proteina SFRP1, SFRP3,
DVL1, DVL2 i DVL3 signalnog puta Wnt
u tkivu seroznoga karcinoma jajnika**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice Merkur, Zagreb, a u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu (CERRM), jedinice za biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja. Ovaj rad je primio potporu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj, pod ugovorom KK.01.1.1.01.0008, projekt "Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala".

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ljiljana Šerman, dr.med.

Posebno zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, dr.med. na neiscrpnom strpljenju, podršci, razumijevanju i nesebično darovanom znanju.

Zahvaljujem svim suradnicima Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu za cjelokupnu pomoć u radu, a osobito Valentini Karin-Kujundžić, mag.biol.mol. na savjetima i tehničkoj pomoći.

Zahvaljujem djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur i prof. dr. sc. Semiru Vraniću, dr.med. na darovanom vremenu, znanju i trudu za patohistološku reevaluaciju prikupljenih uzoraka seroznih karcinoma jajnika.

Ovaj rad posvećujem svojoj Dini koja me je nesebično podržavala i vjerovala u mene te našim kćerima Sari i Teni koje su bile krajnja motivacija za završetak disertacije.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1	UVOD	1
1.1	Molekularna genetika tumora	1
1.2	Maligni epitelni tumori jajnika	2
1.2.1	Epidemiologija raka jajnika	2
1.2.2	Razvoj karcinoma jajnika	3
1.2.3	Čimbenici rizika	4
1.2.4	Zaštitni faktori	5
1.2.5	Histološka klasifikacija i dvojni model nastanka karcinoma jajnika	6
1.2.6	Morfološke i molekularne osobine tumora tip I i tumora tip II.	8
1.2.7	Određivanje proširenosti karcinoma jajnika	15
1.2.8	Testovi probira	17
1.2.9	Dijagnostika	18
1.2.10	Liječenje	18
1.3	Signalni put Wnt	22
1.3.1	Kanonski signalni put	23
1.3.2	Nekanonski signalni put	24
1.3.3	Ekstracelularni antagonisti Wnt signalnog puta – obitelj SFRPa	25
1.3.4	Unutarstanični posrednici Wnt signalnog puta – DVL obitelj	26
1.3.5	Signalni put Wnt u karcinomu jajnika	27
2	HIPOTEZA	30
3	CILJEVI RADA	31
4	MATERIJAL I METODE	32
4.1	Arhivski materijal KZPC	32
4.2	Stanične linije	33
4.3	Imunohistokemijska analiza	33
4.3.1	Priprema za imunohistokemiju	33
4.3.2	Imunohistokemijska analiza	34
4.4	Izolacija DNA	35
4.5	PCR ovisan o metilaciji (MSP)	36
4.6	Stanična kultura	36

4.7	Izolacija proteina i Western blot	37
4.8	Ekstrakcija RNA, reverzna transkripcija i RT PCR.	38
4.9	Stereološka i kvantitativna analiza	38
4.10	Statističke metode	39
5	REZULTATI	41
5.1	Negativni regulatori signalnog puta Wnt - SFRP1 i SFRP3	45
5.1.1	MSP – PCR ovisan o metilaciji	50
5.2	Pozitivni regulatori signalnog puta Wnt	51
5.2.1	Ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u staničnim linijama	57
5.3	Usporedba ekspresije pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt	59
5.4	Klinički podatci i odnos prema ekspresiji proteina	60
6	RASPRAVA	70
6.1	Negativni regulatori signalnog puta Wnt	70
6.1.1	SFRP1	70
6.1.2	SFRP3	72
6.2	Pozitivni regulatori signalnog puta Wnt	73
6.2.1	DVL1, DVL2, DVL3	73
6.3	Usporedba ekspresije pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika (visokog i niskog stupnja malignosti)	76
6.4	Ekspresija proteina i klinički pokazatelji	77
7	ZAKLJUČAK	79
8	SAŽETAK	80
9	SUMMARY	81
10	POPIS LITERATURE	82
11	KRATKA BIOGRAFIJA	100

POPIS OZNAKA I KRATICA

APC	adenomatozna polipoza kolona (<i>engl. Adenomatous-polyposis-coli</i>)
AJCC	Američko zajedničko udruženje za rak (<i>engl. American Joint Committee on Cancer</i>)
AKT	obitelj serin/treonin protein kinaza
APST	atipično proliferativni serozni tumor (<i>engl. Atypical Proliferative serous tumor – „borderline tumor“</i>)
ARID1A	protein ARID1A koji se veže na područja DNA bogata adeninom i timinom (<i>engl. AT-rich interaction domain 1A</i>)
ASR	dobno standardizirana stopa (<i>engl. age-standardised rate</i>)
AXIN1/2	protein koji je kodiran genom <i>AXIN1/2</i>
<i>BRAF</i>	gen koji kodira za serin/treonin kinazu B-raf (<i>engl. B-Raf proto-oncogene</i>)
<i>BRCA 1/2</i>	geni povezani s nasljednim karcinomom dojke i jajnika (<i>engl. BReast CAncer 1 and BReast CAncer 2</i>)
CA 125	glikoprotein, ugljikohidratni antigen 125 ili karcinomski antigen 125 (<i>engl. carbohydrate antigen</i>)
CaM kinaze II	protein-kinaze koje se aktiviraju pomoću kompleksa Ca^{2+} /kalmodulin (<i>engl. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CCN2/CTGF	faktor rasta vezivnog tkiva (<i>engl. Connective-tissue-growth-factor</i>)
<i>CCNE1</i>	gen koji kodira za ciklin E1, (<i>engl. G1/S-specific cyclin-E1</i>)
c-jun	protein kinaza c-jun (<i>engl. c-Jun N-terminal kinases; JNK</i>)
CK1	kazein kinaza 1 (<i>engl. Casein-kinase-1</i>)
c-myc	onkogen c-myc (<i>engl. cellular-myelocytomatosis-oncogene</i>)
CRD	proteinska domena bogata cisteinom (<i>engl. cysteine-rich domain</i>)

CTNNB1	gen za β -katenin (<i>engl. Catenin beta 1</i>)
DAAM1	protein DAAM1 (<i>engl. Dishevelled associated activator of morphogenesis 1</i>)
DEP	karboksiterminalna DEP domena proteina (<i>engl. Dvl, Egl-10, Pleckstrin domain</i>)
DIX	DIX domena proteina Dishevelled (<i>engl. Dishevelled, Axin</i>)
DKKs	proteini obitelji <i>Dickkopf</i> (<i>engl. Dickkopf proteins</i>)
DMEM	nekompletirane tekuće hranjive podloge DMEM (<i>engl. Dulbecco's modified Eagle Medium</i>)
DVLs	proteini obitelji Dishevelled (<i>engl. Dishevelled</i>)
ER	estrogenski receptor
ERBB2	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (<i>engl. human epidermal growth factor receptor 2</i>)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (<i>engl. extracellular signal-related kinase</i>)
FAP	obiteljska adenomatozna polipoza (<i>engl. Familial Adenomatous Polyposis</i>)
FBS	serum fetusa goveda (<i>engl. Fetal bovine serum</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (<i>engl. Food and drug administration</i>)
FIGO	Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique (<i>engl. International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>)
FNE1	stanična linija normalnog epitela jajnika i jajovoda
FOXM1	transkripcijski faktor FOXM1 (<i>engl. forkhead box M1</i>)
Fzd1/5	frizzled receptor 1/5
GOG	ginekološko onkološka grupa (<i>engl. gynecologic oncology group</i>)

G-protein Rac	protein Rac (<i>engl. Rho family of GTPases</i>)
GSK3	glikogen sintaza kinaza 3 (<i>engl. Glycogen-synthase-kinase-3</i>)
H2AX	protein iz obitelji histona H2A (<i>engl. H2A histone family member X</i>)
HE	hemalaun eozin, metoda bojanje patohistoloških preparata
HE4	tumorski marker za karcinom jajnika (<i>engl. human epididymis protein 4</i>)
HGSC	serozni karcinom visokog stupnja malignosti (<i>engl. high grade serous carcinoma</i>)
HLA G	humani leukocitni antigen G (<i>engl. human leukocyte antigen – G</i>)
IL8	interleukin 8
Ki-67	marker stanične proliferacije; (prema Kiel University, a 67 prema rednom broju u mikrotitarskim pločicama kada je otkriven)
KRAS	protein KRAS (<i>engl. kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
KZPC	klinički zavod za patologiju i citologiju
LGSC	serozni karcinom niskog stupnja malignosti (<i>engl. low grade serous carcinoma</i>)
LRP5/6	receptor LRP 5/6 (<i>engl. low density lipoprotein receptor related protein 5/6</i>)
LTCC	banka tkiva Sveučilišta u Miamiu (<i>engl. Live Tumor Culture Core</i>)
MAP	mitogenom aktiviran protein (<i>engl. mitogen-activated protein</i>)
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenom (<i>engl. mitogen-activated protein kinase</i>)
MEK	akronim dobiven od MAPK/ERK kinaze (<i>engl. mitogen-activated protein (MAP) extracellular signal-related kinase (ERK) kinase</i>)
MEM	medij za uzgoj staničnih kultura (<i>engl. Minimum Essential Medium</i>)

MMR	popravak pogrešno sparenih baza u molekuli DNA (<i>engl. DNA mismatch repair</i>)
MSP	PCR ovisan o metilaciji (<i>engl. Methylation-specific PCR</i>)
NCCN	neprofitni savez vodećih onkoloških centara posvećenih boljoj brizi o pacijentima (<i>engl. National Comprehensive Cancer Network</i>)
NF1	transkripcijski faktor NF1 (<i>engl. nuclear factor 1</i>)
NFAT	faktor transkripcije NFAT (<i>engl. Nuclear factor of activated T cell</i>)
NHPCC	nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (<i>engl. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>)
niLGSC	neinvazivni serozni karcinom niskog stupnja malignosti (<i>engl. non-invasive low grade serous tumor</i>)
NLK	serin/treonin protein kinaza NLK (<i>engl. Nemo-like kinase</i>)
Notch3	transmembranski protein Notch3 (<i>engl. Neurogenic locus notch homolog protein 3</i>)
OVASHO	stanična linija tumora jajnika, tip adenokarcinom
OVCAR5/8	stanična linija seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti
p16	tumor supresorski protein p16
PARP	poli (ADP-ribozil) polimeraza (<i>engl. poly ADP -ribose polymerase</i>)
PBS	fosfatni pufer (<i>engl. Phosphate buffered saline</i>)
PCP	nekanonska grana Wnt signalnog puta (<i>engl. Planar cell polarity</i>)
PDZ	proteinska domena (<i>engl. Postsynaptic density 95, Discs large, Zonula occludens-1</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (<i>engl. Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PIK3CA	enzim fosfatidilinozitol 3-kinaza regulacijska podjedinica alfa (<i>engl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>)

PKC	protein kinaza C (<i>engl. Protein kinase C</i>)
PR	progesteronski receptor
<i>PTEN</i>	humani tumor supresor gen <i>PTEN</i> (<i>engl. phosphatase and tensin homolog</i>)
Rb	retinoblastomski protein
Rho	protein kinaza Rho (<i>engl. Rho-associated protein kinase; ROCK</i>)
<i>RhoA</i>	gen koji kodira za malu GTPazu iz obitelji Rho (<i>engl. Ras homolog gene family, member A</i>)
ROCK	kinaza koja pripada obitelji serin-treonin kinaza (<i>engl. Rho-associated kinase</i>)
ROMA	algoritam za izračun rizika ovarijske malignosti (<i>engl. The Risk of Ovarian Malignancy Algorithm</i>)
SCF	proteini s domenom za F-box (<i>engl. SKP1-cullin-F-box</i>)
SEE FIM	patohistološki protokol za pripremu jajovoda (<i>engl. Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End</i>)
SET	histološki podtip HGSC tumora (<i>engl. solid, pseudoendometroid transitional</i>)
SFRP1-5	protein povezan s Frizzled receptorom (<i>engl. secreted frizzled related proteins 1-5</i>)
siRNA	mala interferirajuća RNA (<i>engl. small interfering RNA</i>)
STIC	serozni tubarni intraepitelni karcinom (<i>engl. serous tubal intraepithelial carcinoma</i>)
TCF/LEF	transkripcijski faktori TCF/LEF (<i>engl. T cell factor / lymphoid-enhancer binding factor</i>)
TCGA	atlas genoma malignih tumora (<i>engl. the cancer genom atlas</i>)
TGF- β	transformacijski faktor rasta beta (<i>engl. Transforming growth factor beta</i>)

TNM	tumor, čvor, metastaze (<i>engl. Tumor, Node, Metastasis</i>)
TP53	tumor supresorski protein 53 ili p53
UICC	međunarodna unija za borbu protiv karcinoma (<i>engl. International Union Against Cancer</i>)
UKCTOCS	studija provedena u UK a vezana je uz probir na karcinom jajnika (<i>engl. UK colaborative Trial of Ovarian Cancer Screening</i>)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (<i>engl. Vascular endothelial growth factor</i>)
VVP	veliko vidno polje
WHO	svjetska zdravstvena organizacija (<i>engl. World health organisation</i>)
WIF	protein WIF, inhibitor Wnt signalnog puta (<i>engl. Wnt inhibitory protein</i>)
WISE/SOST	inhibitori Wnt signalnog puta WISE/SOST (<i>engl. Wnt modulator in surface ectoderm</i>)
Wnt	akronim skovan od gena vinske mušice <i>Wingless</i> i homolognog mišjeg gena <i>int-1</i>
Wnt 1/3a/8	ligandi signalnog puta Wnt
Wnt/Ca ²⁺	nekanonski krak signalnog puta Wnt, ovisan o kalciju
WT1	protein kodiran genom <i>WT1</i> na kromosomu 11p (<i>engl. Wilms tumor 1</i>)

1 UVOD

1.1 Molekularna genetika tumora

Razvoj i progresija tumora uzrokovani su stupnjevitim promjenama gena koji reguliraju stanični ciklus, a odgovorni su za umnožavanje, diferencijaciju i programiranu smrt stanica. Geni koji se povezuju s nastankom tumora dijele se u dvije skupine, proto-onkogene i tumor supresorske gene (1). Temeljni uzrok koji dovodi do malignog razvoja stanica je poremećaj ravnoteže između tih dvaju skupina gena. Nenormalna aktivacija proto-onkogeni uzrokuje karcinogenezu, a gubitak ili inaktivacija tumor supresorskih gena dovodi do neoplastične preobrazbe stanice (2).

Većina tumora nastaje sporadično dok je oko 10-15% tumora naslijeđeno, odnosno posljedica su nasljedne mutacije tumor supresor gena (3). S obzirom na to da je spektar ginekoloških tumora velik, isto rezultira širokim rasponom histoloških slika, sklonosti metastaziranju te odgovoru na terapiju. Heterogenost tumora prvenstveno proizlazi iz molekularnih, genetičkih i epigenetičkih razlika (4). Bolje razumijevanje molekularnih promjena koje se događaju u tumoru omogućit će kvalitetnije praćenje kliničkog ponašanja tumora i odgovora na terapiju što postaje osnova razvoja novih pristupa probiru, liječenju i prevenciji. Dosadašnje klasične klasifikacije tumora temeljene su na anatomskoj lokalizaciji, a u skorijoj budućnosti mogle bi biti zamijenjene molekularno/genetičkim klasifikacijama.

Značaj molekula signalnog puta Wnt (akronim skovan od gena vinske mušice *Wingless* i homolognog mišjeg gena *int-1*) dokazan je u brojnim biološkim procesima, počevši od embrionalnog razvoja, preko održavanja homeostaze u diferenciranim tkivima odraslih osoba (5). Danas se zna da mutacije gena koji kodiraju za aktere ovog signalnog puta imaju ulogu u razvoju mnogih malignih bolesti. Najpoznatiji primjer je obiteljska adenomatozna polipoza (*engl. Familial Adenomatous Polyposis, FAP*), autosomno dominantna bolest u kojoj pacijenti razvijaju brojne polipe kolona i rektuma. Bolest je najčešće uzrokovana mutacijom u genu za protein APC (*engl. Adenomatous-polypsis-coli*) (6, 7) koji potiče aberantnu aktivaciju Wnt signalnog puta što dovodi do porasta proliferacije stanica te do posljedičnog nastanka adenomatoznih lezija. Mutacije u genima za β -katenin i APC pronađene su u sporadičnom karcinomu kolona te u mnoštvu drugih tipova tumora (8) dok je mutacija gena za Axin povezana s gubitkom njegove funkcije u hepatocelularnom karcinomu (9). Smatra se da je

upravo gubitak normalne regulacije β -katenina izvan Wnt signalne kontrole važan događaj u razvoju mnogih malignih tumora.

Uloga signalnog puta Wnt u embrionalnom razvoju jajnika dokazana je kasnih 90-tih godina prošlog stoljeća kada je otkriven utjecaj liganada Wnt-4 (10) i Wnt-7 na diferencijaciju reproduktivnog sustava u sisavaca (11). Potom su Ricken i suradnici 2002. godine ukazali na ekspresiju još 3 Wnt liganda (Wnt-2b, Wnt-5a, Wnt-11) kako u razvoju jajnika sisavaca (štakora) tako i u staničnim linijama karcinoma jajnika (12). Rezultati studije su po prvi put aktualizirali pretpostavku da aberantna Wnt ekspresija može biti u podlozi razvoja karcinoma jajnika dok se do tada povezivala samo s nastankom karcinoma endometrija i dojke (13). Iako je otkriće mutacije u genu za β -katenin (CTNNB1 – *engl. catenin beta 1*) u početku dokazano kao jedini uzrok endometroidnog tipa karcinoma jajnika (14), Wu i suradnici su otkrili da poremećaj funkcije β -katenina može u manjem broju slučajeva biti i rezultat mutacije gena za APC, AXIN1 ili AXIN2 (15). Postojanje mutacije u genu za β -katenin u tkivu seroznih karcinoma jajnika prisutno je u rasponu od 3% do 59% (16, 17). Iako su mutacije u Wnt/ β -katenin signalnom putu rijetke u karcinomima jajnika, komponente puta su vrlo važne u molekularnim događajima koji prethode razvoju karcinoma (18).

Wnt ligandi su široko zastupljeni u jajnicima (12), te imaju ključnu ulogu u razvoju folikula i plodnosti (19) i pridonose nastanku tumora putem Wnt/ β -katenin signalnog puta (20). Promjene u Wnt signalnom putu, bilo da se radi o promjenama proteina na membrani, u citoplazmi ili u jezgri, igraju ključnu ulogu u razvoju malignih tumora jajnika.

1.2 Maligni epitelni tumori jajnika

1.2.1 Epidemiologija raka jajnika

Rak jajnika je šesti po učestalosti pojavnosti među ženama u Europi s 74.548 novih slučajeva godišnje, dobno standardizirana stopa, ASR - 9,1 (*engl. age-standardised rate*). Prema mortalitetu, 2018. godine bio je 5. najčešći uzrok smrti s 48.870 slučajeva (ASR - 5,0) čime zauzima prvo mjesto smrti od svih ginekoloških tumora (21). Incidencija malignih bolesti jajnika raste s dobi pacijentica, a najveća je u 6. i 7. desetljeću života s medijanom u 63. godini, kada više od 79% pacijentica već ima uznapredovali oblik bolesti i lošiju prognozu (22).

Prema podacima Registra za rak pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, a prema trenutno važećoj klasifikaciji, 2017. godine u Hrvatskoj je novootkriven rak jajnika, jajovoda i adneksa

u 449 žena (stopa incidencije 21; standardizirana stopa prema svjetskom pučanstvu 10,6) a najviše njih u dobi od 60 do 74 godine (23). To ga svrstava na sedmo najučestalije sijelo raka u žene, sa zastupljenošću od 4%. U Hrvatskoj su zabilježena 330 smrtna slučaja, čime je potvrđeno da je rak jajnika, jajovoda i adneksa najsmrtonosniji ginekološki tumor. Incidencija raka jajnika u zadnjem periodu stagnira, dok mortalitet bilježi lagani porast (23).

Smrtnost od raka jajnika u razvijenom svijetu je u laganom padu, međutim, taj pad je znatno sporiji od pada njegove incidencije. Razlog tome je nepostojanje učinkovitih metoda ranog otkrivanja raka jajnika. Petogodišnje preživljenje raka jajnika na svjetskoj razini iznosi između 30% i 40% i bilježi lagani porast, između 2-4% od 1995. godine (24), a ovisno je o stadiju bolesti u kojem je bolest dijagnosticirana, tako da je kod uznapredovanog stadija bolesti, gdje je bolest proširena na okolne organe, preživljenje nisko i iznosi oko 29% dok je u lokaliziranoj fazi bolesti preživljenje oko 92% (24). Podatci o smrtnosti za našu zemlju ne postoje.

1.2.2 Razvoj karcinoma jajnika

Patogenetski mehanizmi koji bi mogli objasniti povezanost čimbenika rizika i razvitka karcinoma jajnika još nisu utvrđeni. Povijesno gledano, ponuđene su dvije hipoteze nastanka karcinoma jajnika. Prema jednoj, smatralo se da se karcinomi jajnika razvijaju iz površinskog epitela kore jajnika i/ili postovulatornih inkluzijskih cista (25, 26). Prema toj teoriji, teoriji neprekidnih ovulacija, svaka ovulacija dovodi do ozljede kore jajnika, čime doprinosi reparaciji jajnika uz povećanje proliferacija, što povećava vjerojatnost za nastanak oštećenja DNA i karcinogenu mutaciju (27). Potpora teoriji polazi iz činjenice da žene sa smanjenim brojem ovulacija, bilo korisnice oralnih kontraceptiva, trudnice ili dojilje, imaju manju incidenciju razvoja karcinoma jajnika dok s druge strane, žene sa sindromom policističnih jajnika, za koji se zna da je vezan uz smanjen broj ovulacija, ipak imaju povećan rizik razvoja karcinoma jajnika (28). Prema drugoj, gonadotropinskoj teoriji, kontinuirana stimulacija jajnika gonadotropinima uz lokalni efekt endogenih hormona rezultira povećanom proliferacijom i mitotskom aktivnošću pokrovnog epitela (25, 29).

Do sada niti jedna teorija nije u potpunosti uskladila sve aspekte razvoja karcinoma jajnika. Svaka teorija nudi samo dio segmenta u objašnjenju razvitka karcinoma jajnika, ali ni jedna teorija nije cjelovita. Prema trenutnim shvaćanjima, većina primarnih karcinoma jajnika kao i primarnih karcinoma peritoneuma zapravo su metastatski tumori. Prema toj teoriji, serozni tumori potječu iz epitela jajovoda, prvenstveno iz fimbrijalnog dijela što je potvrđeno studijama

gdje prekursorska lezija jajovoda morfološki i molekularno odgovara seroznom karcinomu jajnika (30).

S obzirom na to da danas poznajemo raznovrsne malignome jajnika pretpostavlja se da u samom nastanku raka jajnika sudjeluje više čimbenika. Danas znamo da se oko 90% karcinoma jajnika razvija sporadično, što znači da rak nije povezan s naslijeđenim genetskim mutacijama.

1.2.3 Čimbenici rizika

Čimbenici rizika predstavljaju stanja, događaje ili pojave koji mogu pridonijeti razvoju karcinoma jajnika. Dokazano je da rizik za razvoj karcinoma jajnika raste s dobi, za oko 2% sa svakom narednom godinom života žene (31). Pušenje (32), prekomjerna tjelesna težina (33), izostanak fizičke aktivnosti i vježbanja (34), uporaba pudera za intimnu njegu (35), izlaganje azbestu (36) također mogu doprinijeti razvoju karcinoma jajnika. U žena koje su uzimale više zasićenih masnih kiselina uočena je viša incidencija, dok povezanost s konzumacijom mesa nije dokazana (37-39). Dvojben je porast incidencije karcinoma jajnika u žena liječenih od neplodnosti s obzirom na to da je neplodnost uzrokovana nizom drugih čimbenika koji na izravan i neizravan način mogu pogodovati nastanku karcinoma jajnika (25, 29, 40-42). Utjecaj čimbenika vezanih uz povećan broj ovulacija, poput odgođenog rađanja djeteta, rane menarhe (43) ili kasne menopauze (44) još uvijek je nedosljedan u svim studijama. Endometrioza od koje boluje oko 10-15% žena reproduktivne dobi (45) povezana je s povećanim rizikom razvoja karcinoma jajnika, posebice endometroidnog i klarocelularnog tipa (45-47).

Svakako, treba naglasiti i genetsku predispoziciju koja je odgovorna za 10% svih karcinoma jajnika. Većina genetski naslijeđenih karcinoma jajnika, njih 90% odnosi se na nasljedni sindrom raka dojke i jajnika, a dok se manji dio odnosi na prisustvo raka jajnika unutar obitelji (tzv. obiteljski rak jajnika) i nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (NHPCC - *engl. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, drugi naziv Lynch sindrom tip II).

Nasljedni rak dojke i jajnika je povezan s mutacijom u dva gena, *BRCA1* (*engl. Breast Cancer 1*) smješten na kromosomu 17q21 i *BRCA2* (*engl. Breast Cancer 2*) smješten na kromosomu 13q12.3, a koji su važni za popravak oštećenja molekule DNA i regulaciju transkripcije. Ukupni rizik za razvoj karcinoma jajnika vezanog uz *BRCA 1* mutaciju iznosi oko 50% (20% - 65%), dok za je *BRCA2* mutaciju niži i iznosi od 11% do 37% (48). Učestalost mutacije gena *BRCA 1* u općoj populaciji iznosi oko 1/4000. Nositeljice *BRCA1* ili *BRCA2* mutacije uz dijagnosticirani karcinom dojke imaju 10 puta veću vjerojatnost razvoja karcinoma jajnika (49).

Žene s mutacijom u genu *BRCA1* razvijaju karcinom jajnika u prosjeku oko 50. godine života, dok u 40-tima incidencija razvoja karcinoma jajnika iznosi svega 2-3% (50, 51). U vrijeme dijagnoze bolesti nositeljica *BRCA* mutacije, stadij bolesti je sličan stadiju bolesti opće populacije tj. dijagnosticiran je najčešće u uznapredovaloj fazi bolesti (52). Studije su dokazale da su tumori u nositeljica mutacije gena *BRCA* lošijeg gradusa u usporedbi sa ženama istih godišta te da je serozni adenokarcinom najčešći tip karcinoma jajnika (52, 53).

Lynch sindrom tip II je autosomno dominantna bolest za koju su karakteristične mutacije u genima za popravak krivo sparenih baza (*engl. mismatch repair, MMR*). Karakterizirana je razvojem kolorektalnog karcinoma, karcinoma endometrija u oko 70 % žena (54), a u manjem broju slučajeva dolazi i do razvoja karcinoma jajnika, prvenstveno endometroidnog ili klarocelularnog tipa. Ukupni rizik za razvoj karcinoma jajnika u sklopu Lynch sindroma iznosi 3-14% u komparaciji s 1,5% rizika opće populacije (55). Žene s Lynch sindromom razvijaju karcinom jajnika u prosjeku ranije, nego žene opće populacije, između 43. i 50. godine života (56, 57).

Kod prisustva raka jajnika unutar obitelji (tzv. obiteljski rak jajnika) dokazano je da prvi srodnik ima tri do četiri puta veću učestalost razvoja bolesti (49).

1.2.4 Zaštitni faktori

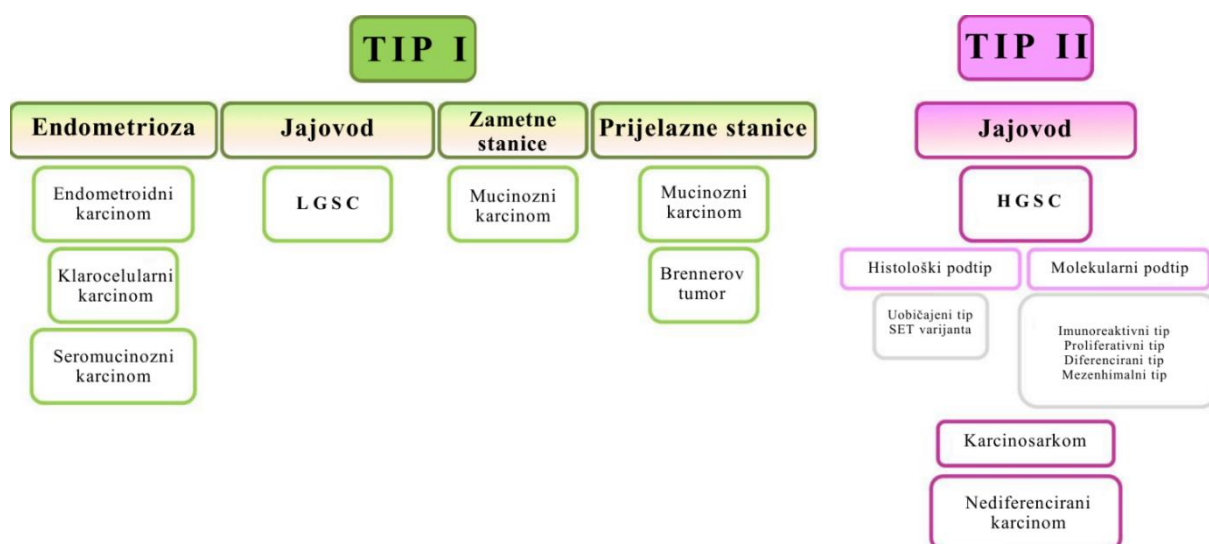
Za razliku od čimbenika rizika, zaštitni faktori smanjuju broj ovulacija i pridonose manjem riziku razvoja karcinoma jajnika. Trudnoća je dokazani zaštitni faktor, jer osim što uzrokuje anovulaciju, također suprimira i hipofiznu aktivnost lučenja gonadotropina. Rodilje imaju 30% do 60% niži rizik od žena koje nisu rađale (58-62), a svaka iduća donošena terminska trudnoća smanjuje rizik za oko 15% (59, 63). Dojenje smanjuje aktivnost hipofiznih gonadotropina prvenstveno u prvim mjesecima nakon poroda te također doprinosi smanjenoj mogućnosti razvoja karcinoma (58, 61-63) baš kao i rana menopauza koja na prirodan način smanjuje broj ovulacija te tako doprinosi smanjenju rizika (44). Dugotrajna uporaba oralne hormonske kontracepcije, mehanizmom odsustva ovulacije, značajno smanjuje mogućnost nastanka karcinoma jajnika za oko 20% za svakih 5 godina korištenja s tim da učinak traje još godinama nakon prekida terapije (63-65). Kirurškim odstranjenjem jajovoda također se smanjuje ukupni rizik razvoja karcinoma jajnika (27, 66).

1.2.5 Histološka klasifikacija i dvojni model nastanka karcinoma jajnika

Tumori jajnika su kroz povijest bili podložni brojim podjelama i klasifikacijama. Prema predzadnjoj histološkoj WHO (Svjetska zdravstvena organizacija; *engl. World Health Organization*) klasifikaciji tumora jajnika, a koja se temeljila na metaplastičnim promjenama pokrovnog epitela jajnika, tumori jajnika su se dijelili u 5 glavnih kategorija, redom: serozni, mucinozni, endometroidni, klarocelularni i tumori prijelaznog epitela.

Nove histopatološke, molekularne i genetske studije omogućile su razvoj boljih modela razvoja karcinoma jajnika. Prema trenutno aktualnoj klasifikaciji tumora jajnika, WHO iz 2014. godine, eliminiran je prijašnji fokus da je mezotel pokrova jajnika ishodišno mjesto nastanka svih tumora nego se dodatno uvodi i epitel jajovoda kao ishodište razvoja karcinoma visokog stupnja malignosti. Tumori su podijeljeni u dvije skupine, tumore tip I koji uključuju serozne karcinome niskog stupnja malignosti, endometroidne, mucinozne karcinome, klarocelularni karcinom i maligni Brennerov tumor, te tumore tip II koji uključuju serozni karcinom visokog stupnja malignosti, karcinosarkom te nediferencirani karcinom. Prema zadnjem ažuriranju, seromucinozni karcinom je dodan u tumore tip I (67, 68).

Tumori tip I se razvijaju iz benignih ekstraovarijalnih lezija koje se mogu implantirati na sam jajnik i posljedično mogu maligno alterirati, dok se tumori tip II razvijaju iz intraepitelne lezije jajovoda s posljedičnom diseminacijom na jajnik i druga ekstraovarijalna mjesta (30, 68, 69). Prema dopunjenom i revidiranom modelu, dvojne kancerogeneze jajnika, tumori su i dalje podijeljeni u dvije grupe, tumori tip I koji sada uključuju 3 podgrupe: grupa 1 - tumori povezani s endometriozom (endometroidni, klarocelularni i seromucinozni karcinom), grupa 2 - serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti i grupa 3 - mucinozni karcinom i Brennerov tumor. Tumori tip II prvenstveno uključuju serozne karcinome visokog stupnja malignosti, nediferencirani karcinom i karcinosarkom. HGSC se prema dopunjenom i revidiranom modelu dodatno dijele u dva morfološka podtipa, uobičajeni tip i varijanta SET (*engl. solid, pseudoendometroid, transitional*) te s obzirom na gensku ekspresiju na 4 molekularna podtipa: imunoreaktivni, diferencirani, proliferativni te mezenhimalni (30). Korelacija između pojedinih morfoloških i molekularnih podtipova još nije učinjena (Slika 1).



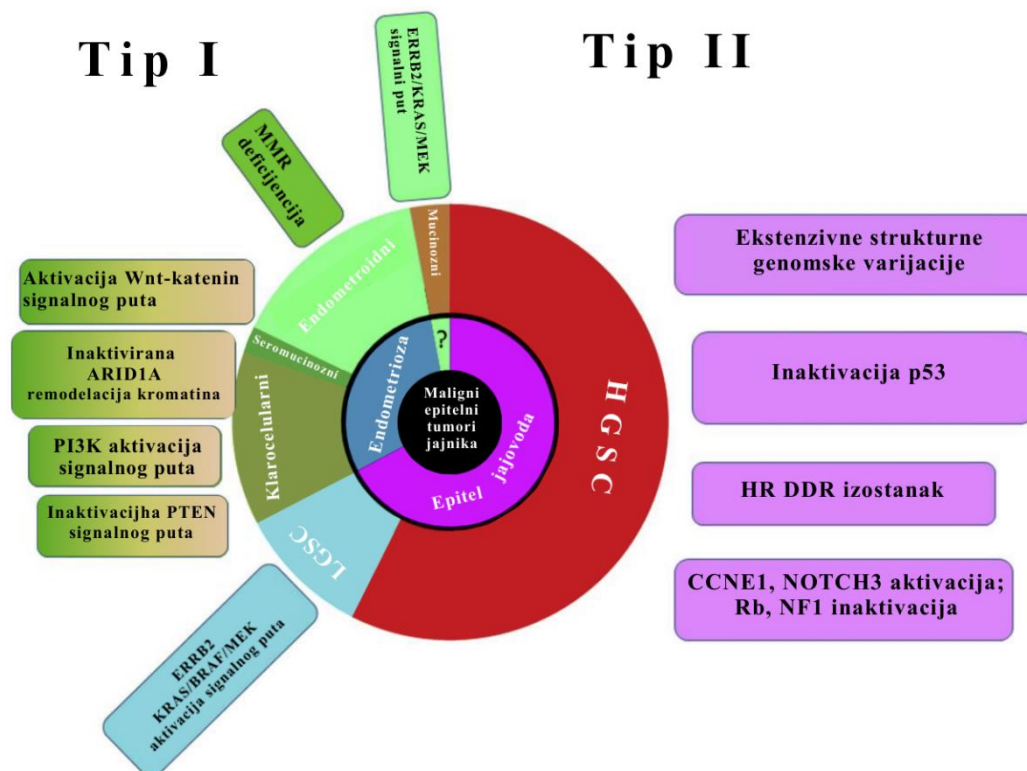
Slika 1 – Prošireni dvojni model kancerogeneze jajnika. Karcinomi jajnika nastaju iz endometralnog tkiva, tkiva jajovoda, zametnih stanica i prijelaznog epitela. Tumori tip I obuhvaćaju endometroidne, klarocelularne, LGSC i mucinozne karcinome. Seromucinozni i maligni Brennerov tumor su iznimno rijetki. Tumori tip II su većinom HGSC, a u manjem broju karcinosarkom i nediferencirani karcinom. LGSC – serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti (engl. low grade serous carcinoma); HGSC - serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti (engl. high grade serous carcinoma), SET (engl. solid, pseudoendometroid, transitional). Kurman RJ, 2016 (30).

Tumori tip I u vrijeme dijagnoze najčešće su u obliku unilateralnih, velikih cističnih tumora, niskog stupnja malignosti, uz izuzetak klarocelularnih karcinoma koji su visokog stupnja malignosti, a najčešće su indolentnog ponašanja. U lokaliziranoj fazi bolesti imaju relativno dobru prognozu, dok u uznapredovaloj fazi bolesti loše prognoze. Tumori tip I predstavljaju oko 10% smrti od karcinoma jajnika (30).

Tumori tip II su za razliku od tumora tip I u vrijeme dijagnoze u više od 75% slučajeva u uznapredovaloj fazi bolesti, agresivni su, loše diferencirani i brzog razvoja. Volumen same bolesti unutar jajnika, a obično zahvaća oba jajnika, je ipak nešto manji nego kod tumora tip I, dok je ekstraovarijski volumen bolesti značajno veći, uz masive presadnice po mezenteriju i omentumu. Ascites je često prateći u tumorima tip II dok je kod tumora tip I zastupljen u manjem postotku. Agresivnim kirurškim, kao i kemoterapijskim liječenjem, pristojno je produženo ukupno preživljenje, ali ipak većina pacijentica premine od same bolesti. Tumori tip II su odgovori za 90% smrti od karcinoma jajnika (30).

1.2.6 Morfološke i molekularne osobine tumora tip I i tumora tip II.

Glavna molekularna osobina je genetska stabilnost karakteristična za tumore tip I za razliku od kromosomske nestabilnosti i mutacije gena *TP53* u tumorima tip II. Razlike su i u čestim somatskim mutacijama kromatin remodelirajućih puteva u tumorima tip I poput PIK3CA/PTEN (*engl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α / phosphatase and tensin homolog*), katenin $\beta 1$, KRAS / BRAF proto-onkogen (*engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog / serine/threonine kinase*), BRAF / MAP (*engl. Mitogen - activated protein*), ERK (*engl. extracellular signal-related kinase*) i ARID1A (*engl. AT-rich interaction domain 1A*). U tumorima tipa II češći je poremećaj popravka dvolančanih oštećenja molekule DNA mehanizmom homologne rekombinacije u koji su uključeni akteri signalnih puteva vezanih uz retinoblastomski protein, ciklin E1, FOXM1 (*engl. forkhead box M1*) i Notch3 (Slika 2) (30). Slično tome, inaktivacija gena *TP53* kao i aktivacija ciklina E1 indirektno doprinosi kromosomskoj nestabilnosti što je značajno molekularno obilježje tumora tip II (30).



Slika 2 – revidiran dvojni model kancerogeneze jajnika. Tumori tip I obuhvaćaju endometrioidne, klarocelularne, LGSC i mucinozne karcinome. Seromucinozni i maligni Brennerov tumor nisu prikazani zbog male zastupljenosti. Tumori tip II su većinom HGSC, dok su karcinosarkom i nediferencirani karcinom relativno rijetki, stoga nisu prikazani. Unutrašnji krug prikazuje najvjerojatnije ishodište lezije. U kvadratima su opisane mutacije pojedinih signalnih puteva karakteristične za taj tumor. Kvadrati bojani višebojno označavaju da su alteracije signalnih puteva potvrđene u nekoliko karcinoma. Kurman RJ, 2016 (30).

1.2.6.1 Tumori tip I - serozni karcinom niskog stupnja malignosti (LGSC)

Morfološke i molekularne osobine tumora tip I

Prema dopunjenoj klasifikaciji LGSC tumori se dijele u dvije skupine, na neinvazivne serozne karcinome niskog stupnja malignosti (niLGSC – *engl. non invasive low grade serous tumor*) i invazivne serozne karcinome niskog stupnja malignosti (LGSC). WHO je 2014. godine u klasifikaciju uvrstila dva nova termina, atipično proliferativni serozni tumor (APST - *engl. Atypical Proliferative Serous Tumor*) koji je sinonim za *borderline* tumor te neinvazivni LGSC (niLGSC) koji je sinonim za *borderline* tumor – mikropapilarnog tipa (67). NiLGSC su

najčešće bilateralni tumori te u 30% slučajeva mogu imati implantate po peritoneumu (70). Molekularnom analizom invazivnih i neinvazivnih implantata dokazano je da su peritonealni implantati zapravo metastaze jer imaju iste vrste mutacija gena *BRAF* i *KRAS* kao i same tvorbe na jajniku (71). Progresija bolesti u LGSC je iznimno rijetka (72). Genomskim profiliranjem tumorskog tkiva otkriveno je da žene čiji tumori imaju mutacije gena *BRAF* imaju bolje preživljenje nego žene s mutacijama gena *KRAS* ili s nemutiranim *BRAF* i *KRAS* genima (73-75). Imunohistokemijske studije su pokazale smanjenu ekspresiju receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR), smanjenu ekspresiju proteina WT1 (*engl. Wilms tumor 1*) i Ki-67, a povećanu ekspresiju p16 u eozinofilnim stanicama (76). Ovi nalazi i njihova morfološka sličnost sa stanicama u kulturi koje prolaze kroz proces starenja ukazuju na to da su eozinofilne stanice senescentne, što je u skladu s vrlo povoljnim ishodom za žene čiji tumori pokazuju mikroinvaziju i/ili zahvaćenost limfnih čvorova karakteriziranu prisutnošću ovih stanica.

Morfološke i molekularne osobitosti prekursorskih lezija

Serozni karcinom niskog stupnja malignosti razvija se postepeno od atipično proliferativnog seroznog tumora, a karakteriziran je mutacijom gena *KRAS*, *BRAF* i *ERBB2* što dovodi do stimulacije mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK – *engl. mitogen-activated protein kinase*) (77,78). Prema trenutnim znanstvenim istraživanjima pretpostavlja se da je hiperplastična lezija jajovoda prekursorsko ishodište APSTa. Signalni put MAP kinaze igra kritičnu ulogu u prijenosu signala rasta u jezgru, i u konačnici doprinosi malignoj transformaciji. U trećini slučajeva APSTa i LGSCa analizom sekvence gena *KRAS* detektirane su mutacije u kodonima 12 i 13 dok je mutacija gena *BRAF* u kodonu 600 zastupljena u drugoj trećini ASPT i u nešto manje LGSCa. (77, 79-82). Mutacija gena *ERBB2* je prisutna u svega 5 % tumora (83). Mutacije u *KRAS*, *BRAF* i *ERBB2* su međusobno isključive i detektirane su u oko dvije trećine ASPTa i LGSCa. Mutacija gena *BRAF* s jedne strane vodi k starenju stanice, a s druge strane je potrebna za inicijaciju nastanka tumora i progresiju do LGSCa. Kurman i suradnici pretpostavljaju da je mutacija gena *BRAF*, kao i mutacija gena *KRAS*, potrebna kod inicijacije tumora jer mutacije u oba gena dovode do promocije nastanka tumora, uključujući i pojačanu aktivaciju glukoznog transportera-1 (*engl. glucose transporter 1*), potrebnog za tumorsku transformaciju stanice (84).

Obilježja tumora

Serozni karcinom niskog stupnja malignosti je invazivni karcinom, često karakterističnog obrasca s niskim gradusom citološke atipije. LGSC predstavlja genetski stabilne karcinome,

karakterizirane s malim brojem mutacija. Razvijaju se sporo, prvenstveno iz dobro poznatih prekursorskih lezija (85).

Udio seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti je 10% - 15% svih seroznih karcinoma, a ukupan udio između svih karcinoma jajnika iznosi manje od 5% (86, 87).

Dijagnoza LGSC se postavlja najčešće desetljeće ranije nego u pacijentica s HGSC (88). Masa na jajniku ili postane simptomatska ili se otkrije slučajno UZV pregledom. U većine pacijentica bolest se dijagnosticira u uznapredovaloj fazi. Iako je raširenost tumora manja nego u HGSC, u trenutku dijagnoze ascites može biti prisutan. Ultrazvučnim pregledom najčešće se potvrde cistične mase koje mogu sadržavati deblje septe ili imaju solidna žarišta s pojačanom vaskularizacijom.

Razvoj LGSC slijedi obrazac preko benignih cistadenoma, prema atipično proliferativnim tumorima te postepeno do razvoja seroznog karcinoma niskog stupnja malignosti tako da značajan udio karcinoma ima odgovarajući obrazac atipično proliferativnog tumora (89). Stanice LGSC pokazuju blagu do umjerenu atipiju jezgara i mogu sadržavati jednu upadljivu jezgricu (89, 90). LGSC se sastoji od uniformne populacije malih stanica s ograničenim nuklearnim pleomorfizmom. Nekroza je rijetko prisutna, psamomska tjelešca često, a broj mitozu je značajno malen (< od 10 mitozu u 10 VVP) (90).

Imunohistokemijski profil je identičan kao i u seroznih atipično proliferativnih tumora, osim različite progesteronske ekspresije koja je u 50 % slučajeva manja u LGSC (91). Ki-67 indeks je tipično niži nego u HGSC. U slučajevima gdje je patohistološki nalaz dvojben, može pomoći aberantna ekspresija proteina p53 koja definitivno govori u prilog HGSCa (92). Nedavno istraživanje, koje je obuhvatilo analizu cijelog egzoma seroznih karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti, utvrdilo je u prosjeku samo 10 somatskih mutacija po tumoru (93, 94). Suprotno tome, serozni karcinomi visokog stupnja malignosti uglavnom su aneuploidni, s visokom razinom promjene broja kopija (78). Ovi karcinomi obično imaju 50–70 somatskih mutacija, s *TP53* kao očitom pokretačkom mutacijom (95).

Prognoza za tumore, koji su ograničeni samo na jedan jajnik, je odlična uz samo kirurško liječenje. Pet i deset godišnje preživljene uznapredovalog stadija bolesti iznosi redom 85% i 50% (96, 97). Ostatna bolest veća od 2 cm nakon primarne operacije značajno skraćuje ukupno preživljenje (98). LGSC ne reagiraju dobro na kemoterapiju, ali nisu refraktorni na kemoterapiju platinom (99, 100).

1.2.6.2 Tumori tip II - serozni karcinom visokog stupnja malignosti (HGSC)

Morfološke i molekularne osobine tumora tip II

Istraživanjem mutacija gena *BRCA* ustanovljeno je da je HGSC puno heterogenija skupina nego se prvotno mislilo (101, 102). Uobičajeni tip HGSC sastoji se od solidnih nakupina stanica papilarnog, kribiformnog ili glandularnog uzorka često uz prateću nekrozu. Drugi tip je sastavljen od solidne nakupine stanica koje podsjećaju na endometroidni i karcinom prijelaznog epitela, a imaju identičan imunoprofil kao i klasični HSGC, uključujući mutaciju gena *TP53*, *PTEN*, *WT1* uz sličan uzorak mutacije za *TP53* čime se opravdava njihova klasifikacija u HGSC (30, 103). Kako bi ih se moglo razlikovati od klasičnih HGSC tumora klasificirani su kao *SET* varijanta (*engl. Solid, Pseudoendometroid, Transitional*) (101). Razlika je jedino u broju limfocita koji infiltriraju tumor te višem mitotskom indeksu kod *SET* varijante. Za razliku od klasičnih HGSC-a, *SET* tumori su češće povezani s mutacijom gena *BRCA1*, dok se navedena mutacija rjeđe pojavljuje kod *STIC*-a (*engl. seorus tubal intraepithelial carcinomas*). *SET* tumori se javljaju kod mlađih žena i imaju bolju prognozu (102) nego klasični HGSC što je prvenstveno vezano uz bolju osjetljivost na kemoterapiju (104). Studijom TCGA (*engl. The cancer genom atlas*) dokazana je prisutnost mutacije gena *TP53* u gotovo svim HGSC tumorima, a što su kasnije potvrdili i drugi znanstvenici ili što je kasnije potvrđeno drugim znanstvenim istraživanjima (105). Pored raznolikih promjena u broju kopija, koje odražavaju povijest genomskih izmjena, i sveprisutnih mutacija *TP53*, nalazimo amplifikaciju gena *CCNE1* i *BRCA1/2* mutacije u somatskim i spolnim stanicama, kao i aberacije u signalnim putevima koji reguliraju homolognu rekombinaciju tijekom popravaka oštećene DNA (106).

Morfološke i molekularne osobitosti prekursorskih lezija

Jedan od glavnih napredaka u našem razumijevanju patogeneze HGSC bilo je prihvaćanje hipoteze da većina HGSC nastaje iz prekursorske lezije u jajovodu. Piek i suradnici su tijekom 2001. godine potvrdili postojanje transformacijske zone na jajovodu u žena profilaktički operiranih, ili zbog pozitivne obiteljske anamneze za karcinom jajnika, ili su bile nositeljice mutacije gena *BRCA* (107-109). Ranije se pretpostavljalo da bi prekursorska lezija trebala biti na jajniku, ali studije, u zadnja 3 desetljeća, istu nisu potvrdile. Za detekciju lezije jajovoda možemo zahvaliti novoj metodi patohistološkog uzorkovanja jajovoda, gdje je posebna pažnja postavljena upravo na fimbrije jajovoda, *SEE-FIM* protokol (*engl. Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End*) (110). Promjene su pronađene u distalnom dijelu jajovoda u 57-100% slučajeva. U nositeljica mutacije gena *BRCA1* promjena unutar jajovoda

dijagnosticirana je u 4-17% slučajaja (109, 111-114). Displastične lezije unutar epitela jajovoda nazvane su STIC. Piek i suradnici su postavili hipotezu da nasljedni serozni karcinom može potjecati iz epitela jajovoda koji je proširen na površinu jajnika ili peritoneuma (108). Učestalost STIC u seroznim karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti iznosi oko 50-60% (113, 115). Brojnim raspravama pokušalo se nametnuti obrazloženje kako su STIC lezije zapravo metastaze s jajnika, ali molekularnom analizom dokazano je da STIC lezije imaju kromosome s kraćim telomerama nego u HGSC i da pokazuju pojačanu ekspresiju proteina gama-H2AX (*engl. H2A histone family member X*), što ukazuje na aktivan mehanizam popravka DNA u početnim promjenama (116). Malene regije STIC maligno alteriraju, te potom, s obzirom na sami položaj, metastaziraju lokalno na jajnik i zdjelični peritoneum. STIC lezije su otkrivene i u zdravih žena profilaktički operiranih zbog visokog rizika za nastanak samog karcinoma. U žena operiranih zbog HGSC, molekularnom analizom dokazana je ista mutacija gena *TP53* u HGSC i u STIC leziji (117). Zaključno, ako u modelu miša nokautiramo gen za *BRCA*, *TP53* i *PTEN*, dolazi do razvoja STICa i posljedično razvoja HGSCa.

Na temelju kliničko patoloških razlika uobičajenog HGSC i SET varijante te odnosa prema STIC i mutaciji gena *BRCA1*, istraživači su zaključili da HGSC može nastati dvojako (102, 118). Uobičajeni HGSC nastaje iz STIC lezije, a SET varijanta razvija se ili iz STIC lezije ili iz nekog drugog do sada neistraženog prekursora u jajovodu ili nekog trećeg mjesta (102). Vjerojatnost da su druga mjesta, poput epitela kore jajnika ili inkluzijskih kortikalnih cista, prekursori razvoja HGSC, za sada se još ne mogu potpuno odbaciti, ali do danas postoji samo ograničeni broj radova na tu temu (30, 102).

Obilježja tumora

Serozni karcinom visokog stupnja malignosti je maligni epitelni tumor sastavljen od epitelnih stanica s papilarnom, žljezdanom i solidnom komponentom. Predstavlja 85-90% seroznih karcinoma, a 70% svih karcinoma jajnika (87).

Godišnje u svijetu dijagnosticira se oko 225000 novih slučajeva karcinoma jajnika s oko 140000 smrti, od čega se većina odnosi na HGSC. Ukupni kumulativni životni rizik za žene u Sjedinjenim Američkim Državama iznosi 1,38 %, uz nešto veću prevalenciju kod bijele rase (119).

Dosadašnje studije identificirale su nekoliko zaštitnih faktora razvoja karcinoma jajnika, poput višeg pariteta, kasne menarhe, rane menopauze te su prepoznale dobrobit korištenja oralnih kontraceptiva (120-122). Teorija se temelji na principu smanjenog menstrualnog vijeka, iako

postoje i drugi mehanizmi koji pridonose zaštiti. Korištenje oralnih kontraceptiva značajno smanjuje rizik za nastanak HGSC, a direktno je povezano s duljinom korištenja (123).

HGSC se najčešće dijagnosticira u 63. godini života. Simptomi su nespecifični, prvenstveno gastrointestinalnog tipa uključujući mučninu, anoreksiju, sitost, distenziju abdomena, napuhanost, bol, konstipaciju, bol u leđima i učestalo mokrenje (124). Kašalj i otežano disanje idu uz maligni pleuralni izljev. Slikovnim metodama prikazu se velike, kompleksne, hipervaskularne zdjelične mase, ascites te čvorovi po omentumu i peritoneumu. Tumorski marker CA 125 je većinom povećan, s vrijednostima od 500-1000 U/ml u uznapredovaloj fazi bolesti (125).

Dvije trećine seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti dijagnosticiramo kao velike tvorbe dok u trećini slučajeva jajnici mogu biti i normalne veličine s egzofitom manjim od 1 cm. Tumori su najčešće bilateralni, egzofitični, sa solidnim i papilarnim komponentama i cistama ispunjenim tekućinom. Solidne komponente su uobičajeno nekrotične i sa žarištima krvarenja. Jajovodi su najčešće uklopljeni u samu bolest i teško ih je razlučiti iz mase (67).

Histološki, jezgre su obično velike, hiperkromatske i pleomorfne uz prominentne eozinofilne jezgrice. Mitoze su brojne i atipične, a psamomska tjelešca upadljiva (67).

Na molekularnoj razini ispoljuju mutaciju gena *TP53* u oko 80% slučajeva i imaju visoki proliferacijski indeks (126-129). *ERBB2* ekspresiju nalazimo u 20-67% slučajeva kao i aktivaciju proteina AKT (drugi naziv za protein kinazu B) u 12-30% slučajeva te inaktivaciju proteina p16 u 15% slučajeva. Postoji također prekomjerna ekspresija proteina HLA-G u 61 % slučajeva kao i ekspresija apolipoproteina E (apoE) u 66% slučajeva, a koji su rijetko potvrđeni u LGSC. Za 15% novo dijagnosticiranih karcinoma smatra se da su naslijeđeni (130) i to većinom zbog mutacije gena *BRCA1* i *BRCA2*.

Prognostički faktor bitan za cjelokupno preživljenje je svakako stadij u kojem je bolest dijagnosticirana, a u 75% - 80% slučajeva to je u uznapredovaloj fazi bolesti, a samo u manje od 25% pacijentica postignuta je remisija bolesti trenutnim protokolima liječenja (131). Ostatna rezidualna bolest nakon primarnog kirurškog liječenja je svakako najznačajniji faktor ukupnog preživljenja jer je dokazano da što je rezidualna bolest manja ukupno preživljenje je statistički značajno bolje (132). Do danas postoji svega par molekularnih markera koji za sada nisu ušli u standardnu praksu poput CD3+ ili CD8+ na T limfocitima kao markeri povoljnije prognoze u pacijentica s HGSCom (133). Također, prisutnost *BRCA1* i *BRCA2* mutacija povezana je s povoljnijim ishodom bolesti (134).

1.2.7 Određivanje proširenosti karcinoma jajnika

Određivanje proširenosti prema anatomske lokaciji glavni je i odlučujući faktor za odabir modaliteta liječenja i definiranje same prognoze. Pri tome je stadij bolesti iznimno važna komponenta ukupnog preživljenja i kontrole same bolesti. Karcinom jajnika je najčešće graduiran s dvije klasifikacije, FIGO (franc. *Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique*; engl. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) i TNM klasifikacijom (tumor, čvor, metastaze; engl. *Tumor, Node, Metastasis*) koje su predložile Međunarodna unija za borbu protiv karcinoma – UICC (engl. *International Union Against Cancer*) i Američko zajedničko udruženje za rak – AJCC (engl. *American Joint Committee on Cancer*).

Međunarodno udruženje ginekologa i opstetričara predložilo je FIGO klasifikaciju, koja je izmijenjena 2014. godine (135), a dijeli karcinom u 4 stadija temeljeno na informacijama prikupljenim nakon kirurškog liječenja. Usporedno s ovom klasifikacijom postoji i TNM klasifikacija koja je komparabilna s FIGO stadijima, a temeljena je na anatomske lokaciji primarnog tumora, odsustvu ili prisutnosti metastaza u regionalne limfne čvorove te odsustvu ili prisutnosti udaljenih metastaza. Zadnje izdanje TNM klasifikacije je izdanje 8, iz 2017. godine (136).

U nastavku se nalazi detaljna tablica koja pojašnjava stadije bolesti sukladno zadnjoj klasifikaciji FIGO-a iz 2014. godine i usuglašena TNM klasifikacija, edicija 8. (Tablica 1)

Tablica 1- Zadnja važeća TNM i FIGO klasifikacija tumora jajnika, jajovoda i primarnog peritonealnog karcinoma (136)

Primarni tumor (T)		
TNM	FIGO	
TX		Prisutnost primarnog tumora se ne može procijeniti
T0		Nema dokaza postojanja primarnog tumora
T1	I	Tumor ograničen na jajnike ili jajovode (jedan ili oba)
T1a	IA	Tumor ograničen na jedan jajnik (kapsula intaktna) ili jajovod; bez tumora na vanjskoj površini jajnika ili jajovoda; bez zloćudnih stanica u ascitesu ili ispirku;
T1b	IB	Tumor ograničen na oba jajnika (intaktne kapsule) ili jajovoda; bez tumora na vanjskoj površini jajnika ili jajovoda; bez zloćudnih stanica u ascitesu ili ispirku;
T1c	IC	Tumor jajnika ograničen na jedan ili oba jajnika ili jajovoda uz:
T1c1	IC1	Kirurško izljevanje sadržaja tumora
T1c2	IC2	Rupturirana kapsula tumora prije operacije ili tumor na vanjskoj površini jajnika ili jajovoda
T1c3	IC3	Prisutne maligne stanice u ascitesu ili ispirku
T2	II	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika ili jajovoda sa širenjem na tkivo zdjelice ali ispod zdjeličnog obruča ili primarni peritonealni tumor
T2a	IIA	Širenje tumora i/ili presadnice na uterus i/ili jajovod(e) i/ili jajnike
T2b	IIB	Širenje tumora i/ili presadnice na druga zdjelična tkiva
T3	III	Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika ili jajovoda ili primarni peritonealni karcinom s mikroskopski potvrđenim presadnicama izvan zdjeličnog obruča i/ili presadnice u retroperitonealne (zdjelične i/ili paraaortne) limfne čvorove.
T3a	IIIA2	Mikroskopske peritonealne presadnice izvan zdjelice sa/ili bez pozitivnih retroperitonealnih limfnih čvorova
T3b	IIIB	Makroskopski peritonealni implantati izvan zdjelice veličine do 2 cm u najvećem promjeru sa/ili bez presadnica u retroperitonealne limfne čvorove
T3c	IIIC	Makroskopski peritonealni implantati izvan zdjelice veličine iznad 2 cm u najvećem promjeru sa/ili bez presadnica u retroperitonealne limfne čvorove (uključuje proširenost tumora na kapsulu jetre i slezene ali bez zahvaćanja parenhima oba organa)

Regionalni limfni čvorovi (N)		
TNM	FIGO	
NX		Status limfnih čvorova se ne može procijeniti
N0		Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
N0(i+)		Izolirane tumorske stanice u regionalnom limfnom čvoru promjera manjeg od 0,2 mm
N1	IIIA1	Pozitivni retroperitonealni limfni čvorovi (histološka potvrda)
N1a	IIIA1i	Presadnice do 10 mm u najvećem promjeru
N1b	IIIA1ii	Presadnice preko 10 mm u najvećem promjeru

Udaljene presadnice (M)		
TNM	FIGO	
M1	IV	Udaljene presadnice, uključujući pleuralni izljev uz pozitivnu citologiju; parenhimske presadnice jetre ili slezene; presadnice u ekstra abdominalne organe (uključujući ingvinalne limfne čvorove i limfne čvorove van trbušne šupljine); transmuralna zahvaćenost crijevne stijenke
M1a	IVA	Pleuralni izljev uz pozitivnu citologiju
M1b	IVB	Parenhimske presadnice jetre ili slezene; presadnice u ekstra abdominalne organe (uključujući ingvinalne limfne čvorove i limfne čvorove van trbušne šupljine); transmuralna zahvaćenost crijevne stijenke

Grupiranje po stadijima			
Sdadij I	T1	N0	M0
Stadij IA	T1a	N0	M0
Stadij IB	T1b	N0	M0
Stadij IC	T1c	N0	M0
Stadij II	T2	N0	M0
Stadij IIA	T2a	N0	M0
Stadij IIB	T2b	N0	M0
Stadij IIIA1	T1/T2	N1	M0
Stadij IIIA2	T3a	NX/N0/N1	M0
Stadij IIIB	T3b	NX/N0/N1	M0
Stadij IIIC	T3c	NX/N0/N1	M0
Stadij IV	bilo koji T	bilo koji N	M1
Stadij IVA	bilo koji T	bilo koji N	M1a
Stadij IVB	bilo koji T	bilo koji N	M1b

1.2.8 Testovi probira

Idealni test probira imao bi zadaću otkriti karcinom jajnika u lokaliziranoj fazi bolesti, kada je ukupno preživljene oko 90% za razliku od ukupnog preživljenja od jedva 30% za uznapredovali oblik bolesti (137). S obzirom na samu lokalizaciju jajnika i ponašanje epitelnih karcinoma jajnika, otežana je njihova dijagnostika u ranim stadijima bolesti. Evaluacijom pacijentica s novo dijagnosticiranim karcinomom jajnika stvorene su preporuke s ciljem pokušaja ranijeg otkrivanja pacijentica koje imaju predispoziciju razvoja karcinoma (138, 139). Novonastali simptomi poput napuhanosti, zdjelične ili abdominalne boli, smanjenog apetita i poremećaja mokrenja (urgencije ili polakisurije) sugeriraju na razvoj karcinoma jajnika (138). Prilikom pregleda žena s ranije navedenim simptomima svakako je potrebno isključiti bolest jajnika kao mogući uzrok simptoma (140).

Trenutno dostupna literatura ne zagovara provođenje rutinskog probira populacije, tako da rutinski probir ne preporuča niti jedno ginekološko društvo (140-142). Žene opterećene pozitivnom obiteljskom anamnezom ili žene s pozitivnom mutacijom gena *BRCA*, pratimo redovnim ultrazvučnim pregledom i praćenjem tumorskog markera CA 125, iako provedena studija nije potvrdila opravdanost tih postupaka (143, 144).

Provedena studija Ujedinjenog Kraljevstva, UKCTOCS (*engl. UK collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*), proučavala je korištenje multimodalnog probira, ultrazvučnim pregledom i tumorskim markerom CA 125, naspram samo UZV pregleda komparirano sa ženama koje nisu praćene (145, 146). Preliminarni rezultati svakako govore u prilog multimodalnog probira, ali nakon praćenja od 11 godina, nije zabilježena značajna razlika ukupnog mortaliteta (147, 148). Druga velika randomizirana studija provedena u Americi, uključivala je 78.000 pacijenata, a pratila je probir za 4 karcinoma: prostata, pluća, kolon i jajnik (PLCO - Cancer Screening Trial). Dokazala je da probir transvaginalnim ultrazvukom i tumorskim markerom CA 125 nije smanjio mortalitet od karcinoma jajnika, a lažno pozitivni nalazi su doveli do značajnih komplikacija u nekih žena (0,20%) (149-151). Studija koja je uspoređivala odnose između tri grupe, probir učinjen samo s tumorskim markerom CA 125, probir učinjen kombiniranim ultrazvučnim pregledom i tumorskim markerom CA 125, i probir učinjen samo ultrazvučnim pregledom dokazala je da tumorski marker CA 125 ne podiže razinu detekcije karcinoma jajnika nasuprot ultrazvučnom pregledu i da je ultrazvučni pregled superiorniji u detekcije karcinoma jajnika nego samo tumorski marker CA 125 (152).

1.2.9 Dijagnostika

Ako posumnjamo u postojanje tumora u abdomenu ginekološkim pregledom i/ili uz slučajan nalaz ascitesa i abdominalne napuhanosti i/ili ako pacijentica ima simptome napuhanosti, zdjelice ili abdominalne boli, teškoće jela uz urinarnu urgenciju ili polakisuriju, ali bez drugih znakova postojanja maligniteta, postupak nalaže da je potrebno učiniti abdominalni i transvaginalni ultrazvuk za inicijalnu procjenu. Kompjuterizirana tomografija (CT) zdjelice i abdomena je korisna u dijagnostici metastaza (153), a magnetska rezonancija (MR) je od pomoći kod procjene malignog potencijala tvorbe u slučaju da ultrazvuk nije pouzdan (154). Svakako je u obradu potrebno uključiti i odgovarajuće laboratorijske pretrage (138, 154). Primarni tumor jajnika, jajovoda ili peritoneuma je najčešće dijagnosticiran postoperativno, a u manjem broju slučajeva preoperativno, no samo ako je ranije učinjena biopsija ili ako su prvom operacijom samo uzeti uzorci tkiva za analizu. Biopsije tumora tankom iglom za potvrdu karcinoma jajnika u pacijentica s vjerojatnošću da imaju rani stadij bolesti treba izbjegavati jer se tako sprječava ruptura ciste i izlivanje sadržaja po trbušnoj šupljini (155). Prema zadnjim preporukama, a koje je odobrila i Američka regulatorna agencija za hranu i lijekove, FDA (*engl. Food and drug administration*), specifični biomarkeri, HE4 (*engl. human epididymis protein 4*) i CA 125, uz izračunat ROMA (*engl. The Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) indeks, mogu biti od značajne pomoći u određivanju je li tvorba benigna ili maligna (156), iako NCCN (*engl. National Comprehensive Cancer Network*) odbor ne preporučuje korištenje bio markera za određivanje statusa nepoznate mase u zdjelici. Rendgen srca i pluća kao i CT prsnog koša dolaze u obzir u primarnoj evaluaciji samo ako je klinički indicirano. Pacijentice sa sumnjom na malignu bolest jajnika potrebno je uputiti u referentni klinički centar gdje je moguće učiniti odgovarajuće citoreduktivno kirurško liječenje.

1.2.10 Liječenje

Primarni tretman karcinoma jajnika obuhvaća određivanje proširenosti bolesti i optimalno kirurško citoreduktivno liječenje koje je u većini slučajeva praćeno kemoterapijskim liječenjem. Nakon operativnog liječenja potrebno je zabilježiti primarnu proširenost bolesti te je li i koliko je bolesti preostalo nakon kirurškog liječenja. Ovakve komplicirane zahvate i procjene trebao bi obavljati specijalizirani ginekološki onkolog, a koje u najvećem broju slučajeva podrazumijevaju histerektomiju, obostranu adnektomiju, te kompletnu citoredukciju tumorskih masa (157). Mladim pacijenticama, reproduktivne dobi, kojima je dijagnosticiran unilateralni karcinom jajnika stadija FIGO IA i IC i/ili nisko rizični tumori

jajnika (rani stadij malignog epitelnog tumora, tumor granične malignosti - *borderline* tumor, maligni tumori zametnog epitela, mucinozni tumori i maligni stromalni tumori), a koje žele sačuvati fertilnost, moguće je učiniti samo unilateralnu adnektomiju uz određivanje stadija (proširenosti) bolesti (158-160). Također, u pacijentica s bilateralnim tumorom, stadija FIGO IB, a željnih čuvanja fertilnosti, moguće je učiniti obostranu adnektomiju uz određivanje stadija bolesti te potom pacijenticu uputi u referentni centar za medicinski potpomognutu oplodnju, radi donacije jajne stanice. Značaj određivanja stadija bolesti je u prepoznavanju okultnog višeg stadija, jer je prema provedenim studijama, u 30% pacijentica kojima je učinjeno pravilno određivanje stadija bolesti dovelo do unaprjeđenja stadija bolesti (157, 161). Kompletno kirurško citoredukcijsko liječenje je preporučena terapija liječenja karcinoma jajnika iznad stadija FIGO II što uključuje histerektomiju i bilateralnu adnektomiju, kompletnu omentektomiju te odstranjivanja svih povećanih limfnih čvorova. Obostrana zdjelična i paraaortalna limfadenektomija se preporučuje za pacijentice stadija FIGO IIIB i niže. Za postizanje optimalne citoredukcije, u suradnji s abdominalnim kirurgom, u obzir dolazi i radikalna zdjelična disekcija, resekcija tankog i debelog crijeva, apendektomija, „stripping“ dijafragme i drugih peritonealnih površina, splenektomija, parcijalna hepatektomija, resekcija želuca, resekcija mokraćnog mjehura s ureterocistoneostomom, kolecistektomija i parcijalna resekcija pankreasa (162-164). Optimalnom citoredukcijom smatra se resekcija tumora do postizanja ostatne bolesti manje od 1 cm, iako treba težiti kompletnoj resekciji tumora ili „R0“ resekciji (165-167). U pacijentica s uznapredovalim oblikom karcinoma jajnika, u kojih je učinjena kompletna limfadenektomija, statistički je dokazano bolje preživljenje nego u pacijentica kod kojih ista nije učinjena (168). Preporuka je da se u operativni zahvat karcinoma jajnika kreće otvorenim pristupom, donjom medijalnom laparotomijom. Korištenje minimalno invazivnih tehnika nije zabranjeno, ali je preporuka da se prethodno procijeni je li moguće učiniti optimalnu citoredukciju, jer ako nije, zahvat treba konvertirati u otvoreni pristup.

U obzir dolazi i primjena neoadjuvantne terapije (169, 170) koju potom slijedi kirurško citoredukcijsko liječenje u drugom aktu. Neoadjuvantna terapija predstavlja modalitet liječenja, bilo lijekovima, zračenjem ili drugim načinima s ciljem smanjivanja volumena bolesti prije započinjanja operativnog liječenja. Terapijski benefit neoadjuvantne kemoterapije je još uvijek kontroverzan (166, 169, 171-173). Najbolji rezultati liječenja postignuti su u pacijentica u kojih je primarnim postupkom postignuta optimalna resekcija, „R0“ resekcija, te je potom provedena linija kemoterapijskog liječenja (174). Neoadjuvantna kemoterapija može se razmotriti u pacijentica stadija FIGO III ili IV u kojih ginekološki onkolog procijeni da neće moći učiniti

optimalnu citoredukciju ili u pacijentica koje imaju visok operativni rizik, ali za naglasiti je da to nije terapija izbora u pacijentica s lokaliziranom bolesti, koja je ograničena samo na jajnike. Prije započinjanja neoadjuvantnog liječenja, potrebno je učiniti histološku verifikaciju karcinoma jajnika bilo tankom iglenom aspiracijom, paracentezom ili biopsijom koja je svakako metoda izbora. Minimalno invazivne tehnike također dolaze u obzir za potvrdu dijagnoze. Lijekovi izbora u primjeni neoadjuvantne kemoterapije uključuju kombinaciju taksana i karboplatine ili dokskorubicina i karboplatine. Po završenom trećem ciklusu neoadjuvantne kemoterapije potrebno je procijeniti operabilnost, te potom završiti liniju od minimalno 6 ciklusa kemoterapije koju potom slijedi intervalna citoreduktivna kirurgija uz nastavak adjuvantne kemoterapije u trajanju od najmanje 3 ciklusa (175). Kirurško liječenje nakon neoadjuvantne kemoterapije provodi se po principima primarnog kirurškog liječenja.

U slučaju nepotpunog kirurškog liječenja uz ostatnu rezidualnu bolest za koju se procijenilo da je neresektabilna nakon primarne operacije, za stadije bolesti FIGO II do IV, započinje se adjuvantno kemoterapijsko liječenje. Po završetku trećeg ciklusa treba razmisliti o intervalnom citoreduktivnom liječenju s ciljem uklanjanja preostalog tumora. Po završenom kirurškom liječenju pacijentica s uznapredovalim oblikom bolesti treba pristupiti kemoterapijskom liječenju. Trenutno nema dokaza o tome da je potrebno provoditi više od 6 ciklusa kombinirane kemoterapije u inicijalnoj fazi liječenja (176). Preporučena kombinirana terapija sastoji se od režima paklitaksel + karboplatina po shemi svaka 3 tjedna kroz 6 ciklusa (177) ili po shemi svaki tjedan kroz 18 tjedana (178). Drugi protokoli uključuju docetaksel + karboplatina po shemi svaka 3 tjedna / 6 ciklusa (179), karboplatinu + pegilirani liposomalni doksorubicin svaka 4 tjedna kroz 6 ciklusa (177). Faza 3 randomizirane studije *GOG 0218* ispitala je korist antiangiogenih lijekova, bevacizumaba u kombinaciji uz paklitaksel i karboplatinu nasuprot samo paklitaksel + karboplatina te je dokazano da je vrijeme do pogoršanja bolesti nešto veće u skupini pacijentica koje su dodatno koristile i bevacizumab (14,1 vs. 10,3 mjeseci; $p < 0,001$) (180, 181) iako se kvaliteta života nije značajno popravila (182). U žena s ascitesom je dokazano bolje korištenje protokola uz bevacizumab jer je značajno produljeno vrijeme do pogoršanja bolesti (AHR *engl. adjusted hazard ratio* 0,71; 95% CI 0,62-0,81; $p < 0,001$) kao i ukupno preživljenje (AHR 0,82; 95% CI 0,70-0,96; $p = 0,014$) (183). Rezultati *ICON 7* studije koja je također gledala učinkovitost kombinirane kemoterapije uz bevacizumab nasuprot samo kombiniranoj kemoterapiji (paklitaksel/karboplatina) dokazala je da u žena s nepovoljnom prognozom ukupno preživljenje je bilo nešto bolje nego u žena koje su primale samo kombiniranu kemoterapiju, a iznosilo je 39,3 mjeseca (37-41,7) nasuprot 34,5 mjeseci (95% CI

32,0-37; $p=0,03$) (182). Terapija zračenjem cijelog abdomena nije u preporukama američkog NCCN društva, ali dolazi u obzir jedino kao palijativno lokalno zračenje rekurentne simptomatske bolesti (184, 185).

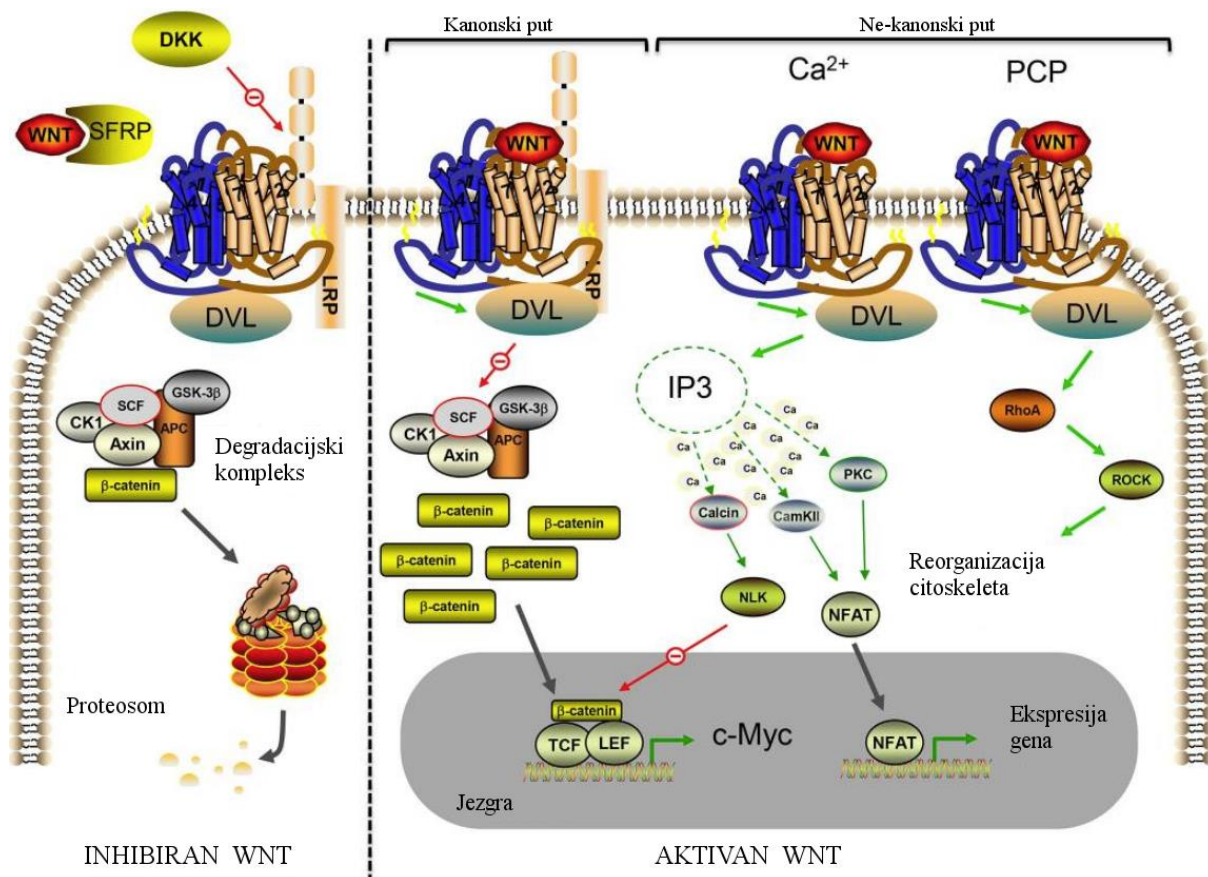
Po završenoj inicijalnoj liniji kemoterapije, potrebno je napraviti kliničku reevaluaciju jer u pacijentica u kojih dolazi do progresije bolesti ili uz perzistentnu bolest potrebno je nastaviti liječenje drugom linijom kemoterapije (186, 187). Prije započinjana druge linije svakako se preporučuje učiniti genetsko testiranje (188, 189). Povratna bolest može se dijagnosticirati ili klinički uz pojavu zdjelične boli i gubitka na težini ili laboratorijski uz porast razine CA 125 i/ili drugim raznim slikovnim metodama. Važnost genetskog testiranja je u prepoznavanju pacijentica s *BRCA* mutacijom jer kod takvih tumora nalazimo poremećaje popravka oštećenja DNA mehanizmom homologne rekombinacije. Takvi tumori su osjetljivi na primjenu monoterapije PARP inhibitorima (*engl. poly ADP- ribose polymerase*), poput olapariba, u pacijentica s uznapredovalim karcinomom jajnika, platina osjetljivih ili rezistentnih, a koji su primili 3 ili više linija kemoterapije i koji su nositelji *BRCA* mutacije (190, 191). Faza 3 randomizirane studije SOLO2/ENGOT-Ov21 proučavala je učinkovitost olapariba u terapiji održavanja, u platinom osjetljivih seroznih karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti s *BRCA* mutacijom, a koji su prethodno primili 2 linije kemoterapije. Rezultati su pokazali da je značajno duži period remisije u odnosu na žene koje su primale placebo; 19,1 mjesec (95% CI 16,3-25,7) nasuprot 5,5 (5,2-5,8) mjeseci, HR 0,30 (95% CI 0,22-0,41; $p < 0,001$) (192) iako su u 18% pacijentica zabilježene nepoželjne nuspojave u odnosu na 5% pacijentica koje su primale placebo, poput anemije, zamora i neutropenije. Prema zadnjim preporukama NCCNa, korištenje PARP inhibitora je preporučeno u terapiji održavanja za žene s karcinomom jajnika u kojih su provedene dvije linije kemoterapije (preporuka faze 3 randomizirane studije SOLO2/ENGOT-Ov21 kao i FDA preporukama) (192).

1.3 Signalni put Wnt

Wnt je visoko konzerviran signalni put kritičan za embrionalni razvoj (193). Tijekom embriogeneze utječe na diobu stanica i staničnu polarnost te kontrolira formiranje osovine tijela, razvoj udova i organogenezu pa kroz spomenute procese održava tkivnu homeostazu (194). U odraslom organizmu odgovoran je za regeneraciju tkiva, regulaciju održavanja matičnih stanica i njihovu diferencijaciju (193, 195).

Danas je poznato najmanje 19 različitih liganada i 10 različitih receptora koji mogu stvarati 190 različitih kombinacija, a one mogu biti dodatno stimulirane ili oslabljene pridruženim ko-receptorima i ko-aktivatorima, stoga kažemo da je signalni put Wnt pleiotropan što znači da ima razne fenotipske učinke na organizam pa se povezuje s etiopatogeneзом raka, osteoporoze i degenerativnim bolestima (193).

Razlikujemo dva osnovna signalna puta Wnt: do danas detaljnije istražen „kanonski“ Wnt/ β -katenin put, te „nekanonski“ signalni put (193, 195, 196). Aktivacija kanonskog Wnt signalnog puta vezana je uz malignu transformaciju, akumulaciju koštane mase, poticanje fibroze, neoangiogenezu i gubitak međustaničnih adhezija čime omogućava metastaziranje tumora (197-199). Nekanonski signalni put Wnt je slabije istražen dio puta, a do danas su bolje istražena njegova dva kraka, put stanične polarnosti (PCP – *engl. Planar cell polarity*) i regulacija unutar staničnog kalcija (Wnt/ Ca^{2+}). PCP je važan prilikom embrionalnog razvoja, a Wnt/ Ca^{2+} put utječe na razvoj dorzoventralne osovine embrija preko modulacije staničnih adhezija, migracije i diferencijacije stanica (200). Oba kraka signalnog puta Wnt sudjeluju u progresiji tumora i nastanku metastaza (201). (Slika 3)



Slika 3 – Kanonski i nekanonski Wnt signalni put. Crvene strelice predstavljaju inhibiciju, zelene aktivaciju, sive translokaciju, a isprekidane znače da postoji dodatni signalni glasnik. Prema Sherwood V., (2014), uz dopuštenje (202). APC (engl. Adenomatous-polypsis-coli), CK1 (engl. Casein-kinase-1), GSK3 (engl. Glycogen-synthase-kinase-3) i SCF kompleks (engl. SKP1-cullin-F-box), (PCP – engl. Planar cell polarity), PKC (engl Protein kinase C), CaM kinaze II (engl. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II), SFRPs (engl. Secreted frizzled receptor-related proteins), DKKs (engl. Dickkopf proteins), LRP-a 5/6 (engl. low density lipoprotein receptor related protein 5/6), DVLs (engl. Dishevelled), TCF/LEF (engl. T cell factor/lymphoid-enhancer binding factor), c-MYC (engl. cellular-Myelocytomatosis-oncogene), Calcineurin (engl. Calcineurin), NLK (engl. Nemo-like-kinase), ROCK (engl. Rho-associated kinase).

1.3.1 Kanonski signalni put

Najpoznatiji put djelovanja je kanonski put kojim se regulira stabilnost β -katenina i njegov prijenos u jezgru. Signalni put Wnt može biti inhibiran antagonistima poput obitelji proteina SFRPs (engl. Secreted frizzled receptor-related proteins) ili proteina WIF (engl. Wnt inhibitory protein) koji se vežu na Wnt molekule i remete interakciju između Wnt i Frizzeld receptora. Signalni put mogu inhibirati i proteini DKKs (engl. Dickkopf proteins) ili obitelj proteina WISE/SOST (engl. Wnt modulator in surface ectoderm) koji antagoniziraju signal vezanjem na LRP5/6 (engl. Low density lipoprotein receptor related protein 5/6), pa β -katenin ostaje vezan

unutarstaničnim proteinskim degradacijskim kompleksom. Degradacijski kompleks je građen od proteina aksina, APC, CK1 (*engl. Casein-kinase-1*), GSK3 (*engl. Glycogen-synthase-kinase-3*) i SCF kompleksa (*engl. SKP1-cullin-F-box*). Ovaj proteinski kompleks u uvjetima bez kanonske Wnt stimulacije drži vezanim β -katenin što dovodi do njegove fosforilacije, ubikvitinacije i razgradnje (202).

Wnt "kanonski put" aktivira se vezanjem jednog od Wnt faktora (Wnt1, Wnt3a, Wnt8) na cisteinom bogatu regiju *Frizzled* receptora (Fzd), građenog od sedam transmembranskih domena. On zajedno s koreceptorom LRP-a 5/6 formira membranski kompleks koji regrutira citoplazmatski protein DVLs (*engl. Dishevelled*) (203). Spoj DVL i *Frizzled* receptora dovodi do fosforilacije LPR5/6 koreceptora putem enzima GSK3 i CK1. Fosforilacija aktivira LPR5/6 koreceptor koji vezanjem proteina aksina na citoplazmatski rep inaktivira unutarstanični proteinski degradacijski kompleks čime posljedično dolazi do porasta razine β -katenina u citoplazmi stanice. β -katenin je ključni posrednik kanonskog Wnt signalnog puta, a nuklearni β -katenin je obilježje njegove aktivnosti (8, 204, 205). Akumuliran β -katenin u citoplazmi translocira se u jezgru gdje stvara kompleks s transkripcijskim faktorima TCF/LEF (*engl. T cell factor / lymphoid-enhancer binding factor*) koji inducira transkripciju ciljnih gena. β -katenin može inducirati ekspresiju gena uključenih u kontrolu staničnog ciklusa (c-myc [*engl. cellular-Myelocytomatosis-oncogene*] i ciklin-D1), procesa fibroze (kolagen1, TGF- β [*engl. transforming growth factor β*], endotelin1, CCN2/CTGF [*engl. Connective-tissue-growth-factor*]) i neoangiogeneze (IL8, VEGF) (206-208).

1.3.2 Nekanonski signalni put

Nekanonski signalni put je zajednički termin za β -katenin neovisne signalne puteve. Pokreće ih Wnt5a ili Wnt11 vezanjem na Frizzled receptor koji aktiviraju DVL neovisno o LRP5/6. Signali se prenose, ili putem porasta unutarstanične razine kalcija (Ca^{2+}), ili malenim GTP nosačima koji reguliraju remodelaciju citoskeleta. Wnt ligandi su u stanju potaknuti povećanje unutarstaničnog kalcija i aktivirati kinaze ovisne o kalciju poput kalcineurina, PKC (*engl. Protein kinase C*) i CaM KII (*engl. calmodulin dependent kinase II*) koji doprinose raznim promjenama u animalnom tkivu (209, 210). PKC i CaMKII, preko transkripcijskog faktora NFAT (*engl. Nuclear factor of activated T cell*) kontroliraju dorzoventralni razvoj struktura u zamecima modulacijom adhezije, migracije i diferencijacije stanica (211, 212). S druge strane kalcineurin aktivira NLK (*engl. Nemo-like kinase*) koje fosforiliraju transkripcijski faktor TCF te pri tome antagonizira utjecaj kanonskog Wnt signalnog puta (213).

Signalni put vezan uz modulaciju polarnosti stanica Wnt/PCP nije direktno uključen u regulaciju transkripcije, nego djeluje preko G-proteina Rac (*engl. Rho family of GTPases*), RhoA (*engl. Ras homolog gene family, member A*) i nizvodnih efektoru c-jun aminoterminalne kinaze (*engl. c-Jun N-terminal kinases; JNK*) kao i Rho-pridružene kinaze (*engl. Rho-associated protein kinase; ROCK*). Time dolazi do reorganizacije skeleta i promjena u polarnosti stanica koje su sklonije migraciji što doprinosi metastaziranju karcinoma (214-216).

1.3.3 Ekstracelularni antagonisti Wnt signalnog puta – obitelj SFRPa

Signalni put Wnt reguliraju i antagonisti od kojih je najpoznatija i najranije istraжена obitelj pet izvanstaničnih proteina povezanih s Frizzled receptorom (*engl. secreted frizzled related proteins; SFRP1-5*) (202, 217-219). To su proteini dugi oko 300 aminokiselina koji se slažu u dvije nezavisne domene, domenu bogatu cisteinom (*engl. N terminal cysteine-rich domain [CRD]*) i domenu sličnu netrinu (*engl. C-terminal netrin-like domain*) (220). S obzirom na molekularnu mimikriju N terminalne cisteinom bogate domene, a koja dijeli znatnu homolognost sekvence kao i Frizzled receptor, obitelj SFRP proteina je prepoznata po svom potencijalu da drži ligande Wnt dalje od Frizzled receptora te tako djeluje kao kompetitivni inhibitori signalnog puta Wnt (221). Inicijalno su označeni kao skupina tumor supresora što znači da predstavljaju negativne regulatore rasta stanice (202, 217, 222) iako prema zadnjim istraživanjima, obitelj SFRP proteina u određenim slučajevima može i promovirati tumorigenezu (223).

Istraživanjima je nađena smanjena ekspresija proteina SFRP1, 2, 4 i 5 u kolorektalnom karcinomu (224) i karcinomu cerviksa (225); smanjena ekspresija SFRP1,4,5 u malignom mezoteliomu (226) i karcinomu jednjaka (227, 228); smanjena ekspresija SFRP1 zbog hipermetilacije gena u karcinomu pluća (229), karcinomu mokraćnog mjehura (230) i karcinomu jajnika (231); smanjena ekspresija proteina SFRP2 u primarnom karcinomu želuca (232); smanjena ekspresija proteina SFRP 2,3 i 5 u karcinomu prostate (233) te smanjena ekspresija proteina SFRP1, 2 i 5 u karcinomu dojke (234-236). Smanjena aktivnost ekspresije SFRP3 proteina nađena je u malignom mezoteliomu kao i u osteogenom sarkomu (237, 238).

S druge strane, nađena je prekomjerna ekspresija proteina SFRP4 uz aktivan β -kateninski signalni put u karcinomima prostate (239), endometrija (240), endometralno stromalnom sarkomu (241) kao i kolorektalnom karcinomu (242) ali molekularni mehanizmi nisu detaljno istraženi. Također je nađena i prekomjerna ekspresija SFRP2 u karcinomu dojke u pasa, gdje

je SFRP2 bio prekomjerno eksprimiran inducirajući kancerogenu transformaciju epitelnih stanica dojke (243). Protein SFRP2 pokazuje i onkogeni potencijal u karcinomu bubrega, potičući rast stanica *in vitro* te rast tumora *in vivo* (244).

Istraživanja su pokazala da tumor supresorska funkcija nije konzistentna unutar cijele obitelji SFRP, te da se pojedini SFRP proteini ponašaju različito, ovisno o tipu karcinoma. Protein SFRP1 je jedini predstavnik obitelji čija je ekspresija dosljedno smanjena u primarnim uzorcima karcinoma u odnosu na kontrolna zdrava tkiva (223). Povećana ekspresija gena *SFRP1* u stanicama karcinoma ukazuje na bolju prognozu, dok smanjenje ekspresije, koje je najčešće posljedica hipermetilacije njihovog promotora, doprinosi progresiji i invazivnosti tumora (245, 246).

Kontradiktorni učinak uloge SFRPa može biti posredovan različitim Wnt ligandima u stanicama, tkivno specifičnim odgovorom na različite stimulanse ili bifazičnim odgovorom stanica na različite koncentracije SFRPa (247).

1.3.4 Unutarstanični posrednici Wnt signalnog puta – DVL obitelj

Dishevelled proteini smatraju se centralnim citoplazmatskim medijatorima koji igraju ključnu ulogu u prijenosu signala oba dijela signalnog puta Wnt. Kanonski put signalnog puta Wnt dokazano je aktivan u embrionalnim i matičnim stanicama odraslog organizma, ali je progresivno utišan u diferenciranim stanicama. Signalni put Wnt aktivan je i tijekom tumorigeneze u proliferaciji i migraciji stanica (248). Proteini DVL kroz nekanonski dio signalnog puta Wnt utječu na polarnost stanice i organizaciju citoskeleta (249).

Signalni putevi se aktiviraju vezivanjem izvanstaničnih liganada Wnt na *Frizzled* skupinu membranskih receptora koji potom aktiviraju obitelj citoplazmatskih proteina DVL (202). Danas se zna za tri različita DVL proteina (DVL1, DVL2 i DVL3). *DVL1* gen je lociran na kromosomu 1p36 i kodira za protein dugačak 695 aminokiselina; *DVL2* gen je lociran na kromosomu 17p13.1, a kodira za protein od 736 aminokiselina; i *DVL3* gen na kromosomu 3p27, a kodira za protein dugačak 716 aminokiselina (250, 251). DVL proteini djeluju kao regulatori destruktivnog kompleksa, a čija je uloga razgraditi β -katenin te mu onemogućiti aktivaciju gena neophodnih za postizanje invazivnog fenotipa. Protein Dishevelled ima tri interakcijska mjesta: aminoterminalnu DIX domenu (*engl. Dishevelled, Axin*) za vezu s Axinom, centralnu PDZ (*engl. Postsynaptic density 95, Discs Large, Zonula occludens-1*) domenu za vezu s kinazama, fosfatazama i proteinima, te karboksiterminalnu DEP (*engl. Dvl,*

Egl-10, *Pleckstrin*) domenu koja je odgovorna za poveznicu između DAAM1 (*engl. Dishevelled associated activator of morphogenesis 1*) proteinom odgovorim za polimerizaciju aktina i za vezanje DVL s membranskim lipidima u Wnt/PCP putu (252-254). Danas se smatra da je upravo Dishevelled skupina proteina centralni medijator koji regulira i usmjerava sve događaje nizvodno od *Frizzled* receptora jer primjena siRNA (*engl. small interfering RNA*) na Wnt mRNA nije utjecala na invazivnost stanica dok je siRNA za DVL mRNA ometala invazivni proces (202).

Dosadašnja istraživanja su potvrdila veću ekspresiju DVL proteina u uznapredovalim stadijima bolesti kao i u metastazama (DVL1 i DVL3) u komparaciji s primarnim tumorima (255). Ekspresija DVL1 proteina povećana je u hepatocelularnom karcinomu (256) i karcinomu prostate (257), dojke (258) i pločastom karcinomu cerviksa (259, 260). Prekomjerna ekspresija DVL2 je do sada istražena u karcinomu jednjaka (261) kao i u gliomima visokog stupnja malignosti (262). U primarnom karcinomu pluća jednakomjerno su zastupljena sva tri DVL proteina (263). Prekomjerna ekspresija DVL proteina povezana je sa slabijom diferencijacijom stanica i lošijom prognozom (222, 263, 264).

1.3.5 Signalni put Wnt u karcinomu jajnika

Dva podtipa *Frizzled* receptora su prekomjerno aktivna u karcinomima jajnika, Fzd1 i Fzd5. Dokazano je lošije šestogodišnje preživljenje u pacijentica s prekomjerno eksprimiranim Fzd5 receptorom (265). Metastatsko širenje karcinoma jajnika je vjerojatno vezano uz aberantnu regulaciju LRP6 koreceptora i β 1-integrina posredovanim vezanjem za mezotel i submezotelni matriks čime se promovira stvaranje metastaza drugih peritonealnih organa (266). Gubitak ekspresije proteina SFRP4 povezujemo s agresivnijim oblikom karcinoma jajnika i lošijom prognozom (267). Ekspresija proteina SFRP4 je najzastupljenija u epitelu jajovoda, smanjena je u maligno transformiranim stanicama dok je gubitak membranske ekspresije nezavisni pokazatelj lošijeg ishoda bolesti (233). Aberantna regulacija SFRP4 vjerojatno je posljedica DNA metilacije njegovog promotora (231). U karcinomima jajnika, prvenstveno mucinoznog tipa, nalazimo smanjenu aktivnost proteina SFRP1 (268). Ekspresija SFRP4 je izraženija u kemoosjetljivih tumora dok je u tumora rezistentnih na cisplatinu ekspresija značajno niža (269). Istom studijom je dokazano da smanjena ekspresija SFRP4 dovodi do kemorezistencije dok se povratom ekspresije postiže kemosenzitivnost (269).

Ekspresija proteina SFRP4 je generalno utišana u karcinomu jajnika iako postoje kontradiktorni radovi koji govore o pojačanoj ekspresiji u drugim karcinomima. Detektirana je pojačana ekspresija proteina SFRP4 u primarnom seroznom karcinomu jajnika (270), a njegova ekspresija obrnuto korelirala s ekspresijom β -katenina. Do sada nije istraženo kako niska razina β -katenina utječe na Wnt signalni put i tumorigenezu. Treći pripadnik *SFRP* obitelji, *SFRP5*, također je epigenetski stišan u karcinomima jajnika. Smanjena aktivnost *SFRP5* vodi do jače aktivacije Wnt signalnog puta, tumorigeneze kao i kemoosjetljivosti na cisplatinu (271).

Studija Zhang i suradnika po prvi put je definirala ulogu *DVL1* u karcinomima jajnika rezistentnima na paklitaksel. Pronašli su prekomjernu ekspresiju proteina *DVL1* uz akumulaciju β -katenina i posljedično ekspresiju proteina P-gp, BCRP i Bcl-2. Utišavanjem ekspresije *DVL1* vratili su osjetljivost tumora na paklitaksel (272).

Mutacija gena za β -katenin (*CTNNB1* gena) detektirana je u endometroidnom (16 - 54%) i mucinoznom (14%), ali ne u seroznom i klarocelularnom karcinomu. Međutim, u jezgri oba tipa karcinoma zabilježena je ekspresija β -katenina (16, 17). Protoonkogen *FRAT1* (engl. *Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas-1*), koji inhibira fosforilaciju β -katenina prekomjerno je aktivan u seroznom karcinomu jajnika (16).

Protein Pygo, koaktivator koji se veže na β -katenin, je nužna komponenta rasta tumorskih stanica i jako je eksprimiran u karcinomu jajnika, kako u staničnim linijama tako i u primarnom tumorskom tkivu. Koaktivator BCL9/LGS također je učestalo eksprimiran i u karcinomu jajnika i u normalnom tkivu jajnika (273). Pojačana ekspresija navedenih koaktivatora samo je daljnji dokaz da signalni put Wnt igra ključnu ulogu u tumorigenezi karcinoma jajnika (13).

Stanice koje podliježu epitelno-mezenhimskoj tranziciji (*EMT* – engl. *Epithelial to mesenchym transition*) gube ekspresiju E-kadherina, a povećavaju ekspresiju vimentina što dovodi do povećane invazivnosti stanica i metastaziranja (274). Karcinomi jajnika podliježu mezenhimsko epitelnoj tranziciji (MET) s obzirom na to da je površina jajnika mezenhimskog podrijetla. Dinamični proces pretvorbe je nazvan epitelno mezenhimska plastičnost (*EMP* – engl. *epithelial to mesenchymal plasticity*) (274). Metastatske stanice karcinoma jajnika priliježu putem integrina na intersticijski kolagen peritonealne šupljine. Prianjanje stanica je posredovano integrinima i E-kadherinima. Angažman integrina vezan je uz porast zastupljenosti E-kadherina. U malignim epitelnim tumorima jajnika dominira MET komponenta za razliku od drugih karcinoma deriviranih iz epitelnih stanica gdje dominira EMT komponenta. Maligna transformacija tumora jajnika vezana je uz porast E-kadherina. Stanični

spojevi (“adherens junction”) građeni od E-kadherina stabilizirani su β -keteninom, a gubitkom stabilnosti spoja može doći do povećanja količine β -katenina u citoplazmi i/ili jezgri. Integrini također inhibiraju GSK3 β čime doprinose porastu razine β -katenina te pojačavaju aktivaciju promotora posredovanu β -keteninom. Studija Burkhalter i suradnika dokazala je da se inhibicijom β -katenina ili TCF-4 smanjuje stanična invazija (266).

Većina poremećaja Wnt signalnog puta posredovana je promjenom količine β -katenina u jezgri ili blokadom vezanja nuklearnog β -katenina na transkripcijski faktor TCF/LEF čime je onemogućena apoptoza. No transkripcijska regulacija β -katenina regulirana je i drugim signalnim putevima, poput Wnt neovisne ekspresije E-kadherina važne za mezenhimsko epitelnu tranziciju (275).

Zbog izrazite kompleksnosti Wnt signalnog puta potrebno je provoditi daljnje studije kako bi se utvrdila klinička važnost inhibicije pojedinih aktera koji bi mogli biti ciljano mjesto djelovanja anti-tumorskih lijekova (13).

2 HIPOTEZA

U tkivu seroznog karcinoma jajnika očekujemo smanjenu ekspresiju negativnih regulatora (SFRP1 i SFRP3) dok istovremeno u istim uzorcima očekujemo jaču ekspresiju pozitivnih regulatora (DVL1, DVL2 i DVL3) signalnog puta Wnt te da će korelacija između ekspresije ove dvije vrste proteina biti recipročna (negativna).

3 CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Odrediti ekspresiju regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti uz poveznicu s kliničkim podacima o pacijenticama.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Istražiti ekspresiju negativnih regulatora signalnog puta Wnt (SFRP1 i SFRP3) u tkivu seroznog karcinoma jajnika (visokog i niskog stupnja malignosti).
2. Istražiti ekspresiju pozitivnih regulatora signalnog puta Wnt (DVL1, DVL2 i DVL3) u tkivu seroznog karcinoma jajnika (visokog i niskog stupnja malignosti).
3. Usporediti ekspresiju pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika (visokog i niskog stupnja malignosti).
4. Povezati kliničke podatke pacijentica (FIGO stadij, duljina preživljenja, vrijeme bez pojave bolesti [PFS - *engl. „progression free survival“*]) s ekspresijom pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika (visokog i niskog stupnja malignosti).

4 MATERIJAL I METODE

Uzorci korišteni u izradi doktorske disertacije su arhivski materijal Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur („KZPC“ KB Merkur), a prikupljeni su u periodu od 2000. do 2012. godine od pacijentica operiranih zbog seroznog karcinoma jajnika u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice Merkur. Pregledom medicinske dokumentacije, u istraživanje je uključeno 52 pacijentice sa seroznim karcinomom jajnika kao i 14 pacijentica za kontrolnu usporedbu, od kojih je 9 uzoraka zdravog tkiva jajnika, a 5 uzoraka zdravog jajovoda. Naknadno su u istraživanje uključene stanične linije seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti kao i stanična linija normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane TERT-om.

S obzirom na novu i trenutno važeću klasifikaciju tumora jajnika iz 2014. godine, patolozi „KZPC“ KB Merkur i prof.dr.sc. Semir Vranić dr.med ponovno su analizirali morfološke karakteristike seroznog karcinoma jajnika prema kriterijima klasifikacije SZO-e 2014. (67) te su prema tome definirali dvije skupine seroznog karcinoma jajnika: serozni karcinom niskog stupnja malignosti – LGSC i serozni karcinom visokog stupnja malignosti – HGSC.

Podatci o preživljenju pacijentica, zaključno i uključujući dan 31.12.2019. godine, dobiveni su službenim putem iz Registra za rak pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo.

Ovo istraživanje je u skladu sa zakonima Republike Hrvatske i provedeno je uz poštivanje etičkih, pravnih i moralnih principa rada s bolesnicama. Provedeno istraživanje je u skladu s dobrom kliničkom praksom, što je potvrdilo i Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Merkur Odlukom od 01.04.2015. godine (ur.br: 03/1-3579) i Središnje etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Odlukom od 24.11.2016. godine (ur.br: 380-59-10106-17-100/162, klasa: 641-01/17-02/01).

4.1 Arhivski materijal KZPC

Preparati su po uzimanju obrađeni standardnim postupkom za dobivanje patohistoloških preparata koji uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 4 μ m, deparafiniranje i bojanje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE).

S obzirom na trenutno važeću klasifikaciju tumora Svjetske zdravstvene organizacije iz 2014. godine, svi preparati su ponovno pregledani te su primjenjujući nove kriterije klasifikacije razvrstani u dvije grupe, 12 preparata seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) i 40 preparata seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC). Preparati koji su bili dvojbeni za razvrstavanje u kategorije, dodatno su imunohistokemijski obrađeni jednom od metoda (Ki-67, p53, CK7, CK20, CDX-2, WT-1, Napsin-A, CA 125, vimentin) kako bi se razjasnilo kojoj skupini pripadaju.

4.2 Stanične linije

U izradi doktorske disertacije korištene su stanične linije OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO, a kao kontrola korištena je FNE1 stanična linija.

Stanične linije OVCAR5 i OVCAR8 dobivene su od dr. Ernsta Lengyela sa Sveučilišta u Chicagu, stanična linija OVSAHO nabavljena je iz japanske banke stanica (Japanese Collection of Research Bioresources), a FNE1 stanična linija iz Sveučilišta u Miami-u, Sylvester Comprehensive Cancer Center, SAD (LTCC - *engl. Live Tumor Culture Core*).

OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO su stanične linije seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, a FNE1 je stanična linija normalnih epitelnih stanica jajovoda koje su imortalizirane TERT-om.

4.3 Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska analiza izraženosti proteina SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 i DVL3 provedena je na novo razvrstanim preparatima seroznog karcinoma jajnika kao i kontrolnim preparatima. Patolog je odredio reprezentativnu parafinsku kocku uzorka seroznog karcinoma jajnika te parafinsku kocku normalnog tkiva jajnika i jajovoda.

4.3.1 Priprema za imunohistokemiju

Formalinom fiksirani, u parafin uklopljeni uzorci tkiva rezani su na debljinu od 4µm. Nakon deparafinacije toplotom i ksilolom te rehidracije silaznim koncentracijama alkohola, otkrivanje ciljanih epitopa na uzorcima provedeno je kuhanjem preparata u citratnom puferu pH6 u mikrovalnoj pećnici 20 minuta na 600W. Za detekciju ciljanih antigena korišten je EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (K5007, Dako, Agilent Pathology Solutions), polimer bazirajuća metoda. Peroksidaza blokirajući reagens inkubiran je 5 minuta

na 22°C, a zatim je uslijedila inkubacija primarnog protutijela. Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju su mišja monoklonalna protutijela DVL-1 Antibody (klon: 3F12, sc-8025, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:50) i DVL-3 Antibody (klon: G-7, sc-271295, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:100) i zečja poliklonalna antitijela DVL-2 Antibody (klon: H-75, sc-13974, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:200), SFRP-1 (klon: sc – 13939, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:200) i SFRP-3 (klon: sc – 13941, Santa Cruz Biotechnology, razrjeđenje 1:100). Sva navedena protutijela inkubirana su na preparatima preko noći na 4°C osim protutijela SFRP-3 čija je inkubacija trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi. Kao sekundarno protutijelo korišten je EnVision reagens, peroksidazom konjugirana polimerna okosnica koja na sebi nosi i molekule sekundarnog protutijela usmjerene protiv mišjih i zečjih imunoglobulina. EnVision je na preparatima inkubiran 30 minuta na 22°C, a potom je cijeli proces vizualiziran supstrat-kromogen otopinom (DAB+) 10 minuta na 22°C što je rezultiralo stvaranjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu. Nakon kontrastiranja hematoksilinom preparati su dehidrirani uzlaznim koncentracijama alkohola, izbistreni ksilolom te pokriveni medijem za pokrivanje.

4.3.2 Imunohistokemijska analiza

Ekspresija proteina SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 i DVL3 u tkivu seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti kao i u kontrolnim uzorcima (jajnik i jajovod) očitana je od strane dva nezavisna iskusna patologa koji nisu imali pristup kliničkim podacima pacijentica. Ekspresija proteina je mjerena semikvantitativnom metodom prema bodovnom uzorku, opisanoj prema Rizzadi i suradnicima (276), i to na sljedeći način:

- 0** nema ekspresije
- 1** < 10% ekspresije
- 2** 10%-50% ekspresije
- 3** > 50% ekspresije

Gledana je ekspresija citoplazmatskih kao i membranskih proteina. Sve nedoumice u interpretaciji rezultata riješene su konsenzusom.

Za izradu statistike formirane su dvije grupe, grupa 1, koja uključuje negativnu ekspresiju i ekspresiju slabiju od 10% (bodovna tablica, grupa 0 i 1) te grupa 2 koja uključuje ekspresiju proteina iznad 10% (bodovna tablica, grupa 2 i 3).

4.4 Izolacija DNA

Metilacija DNA je biološki stanični proces koji igra ključnu ulogu u kontroli genske aktivnosti, a temelji na dodatku metilne skupine (-CH₃) na citozinski prsten u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu (CpG). CpG-otoci su najčešće promotorske i predpromotorske nemetilirane regije DNA duljine najmanje 200 parova baza u kojima je barem 50% citozina i gvanina. S obzirom da je to područje početka transkripcije, promjene u statusu metilacije mogu dovesti do promjena transkripcijske aktivnosti koje se mogu manifestirati na razne načine (277). Pojačana metilacija CpG-otoka je normalni mehanizam koji se koristi prilikom trajnog utišavanja aktivnosti određenih gena kao što su onkogeni, gena na jednom X-kromosomu kod žena te drugih gena koji se pojavljuju u formi monoalela (278). Međutim, ukoliko je metilacija DNA poremećena, dolazi do razvoja tumorskih stanica. Hipometilacija inače visokometiliranih CpG-a dovodi do pojačane aktivnosti gena koji su u osnovi slabo aktivni ili potpuno neaktivni, što može rezultirati promjenama velikog razmjera – od gotovo bezazlenih fenotipskih promjena pa sve do pojačanog dijeljenja tumorskih stanica, što posljedično dovodi do pojave malignih bolesti.

Metilaciju DNA u promotorima gena *SFRP1* analizirali smo PCR-om ovisnim o metilaciji (*engl. Methylation-specific PCR, MSP*). Korišteno je nasumično izabranih 13 uzoraka tkiva (formalin fiksiranih, parafin uklopljenih) seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, 8 uzoraka niskog stupnja malignosti te 5 uzoraka kontrolnih jajnika.

Prije MSP-a izolirana je DNA iz tkiva uklopljenog u parafin prema sljedećoj uputi. Prvi dan u Eppendorf tubici s parafinskim tkivom dodano je 1 ml supstitucije za ksilen i inkubirano je 30 min uz miješanje pri sobnoj temperaturi. Centrifugirano je kroz 5 min na 13.000 rpm (Eppendorf centrifuga) pri sobnoj temperaturi. Odstranjen je supernatant. Postupak je ponovljen. Dodano je 500 µl apsolutnog etanola i miješano je okretanjem tubice kroz 2 min. Centrifugirano je 5 min na 13.000 rpm pri sobnoj temperaturi. Ponovno je odstranjen supernatant. Postupak je ponovljen. Otpipetiran je sav supernatant i ostavljene su otvorene tubice kako bi etanol ispario. Na talog je dodano 100 µl digestijskog pufera (50 mM Tris – pH 8.5, 1mM EDTA, 0,5% Tween 20) i 4 µl proteinaze K (20 mg/ml). Tako dobiveni sadržaj inkubiran je preko noći u termobloku na 37 °C uz protresanje (300 rpm). Sljedeći dan spušten je talog kratkim centrifugiranjem tubica (13.000 rpm, 30 s). Inkubirano je 8 min na 95 °C radi inaktivacije proteinaze K. Talog je spušten kratkim centrifugiranjem (13.000 rpm, 30 s).

Određena je čistoća izolirane DNA pomoću NanoDrop-a. Paženo je da se ne uzima talog. Uzorak je pohranjen na +4 °C.

4.5 PCR ovisan o metilaciji (MSP)

Metilacija DNA u promotorima gena *SFRP1* analizirana je PCR-om ovisnim o metilaciji (*engl. Methylation-specific PCR, MSP*).

Izoliranu DNA bisulfitno konvertiramo pomoću kita MethylEdge Bisulfite Conversion System-a (Promega, Madison, Wisconsin, USA) koja je korištena za MSP. Za metiliranu reakciju korištene su početnice : F:5'-TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTCGCGC-3', R:5'-CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG-3' (126pb); a za nemetiliranu reakciju: F:5'-GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTTGTGT-3', R:5'-CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA-3' (135pb) prema dizajnu Guo i suradnika (Guo i sur. 2011). Za MSP se koristio kit TaKaRa EpiTaq HS (za bisulfitom tretiranu DNA) (TaKaRa Bio, USA). Reakcijska smjesa sastojala se od 1XEpiTaq PCR Buffer (Mg²⁺ free), 2.5 mM, MgCl₂, 0.3 mM dNTPs, 20 pmol od svake početnice (Sigma-Aldrich, USA), 50 ng od DNA, i 1.5 U TaKaRa EpiTaq HS DNA Polymerase u 50 µl konačnog reakcijskog volumena. PCR uvjeti su bili sljedeći: inicijalna denaturacija na 95°C kroz 30s, koju je pratilo 35 ciklusa sastavljenih od 3 koraka: 95°C kroz 30s, temperatura sparivanja početnica kroz 30s, 72°C kroz 30s, te završna elongacija na 72°C kroz 7 min. Za amplifikaciju metilirane promotorske regije gena *SFRP1* temperatura sparivanja početnica je iznosila 65,5°C, dok je za nemetiliranu promotorsku regiju gena *SFRP1* temperatura iznosila 63.1°C. MSP produkti elektroforeze razdvojeni su na 2%-tnom gelu obojanom bojom „GelStar nucleic acid stain“ (Lonza Rockland, Inc. Rockland, USA), a vizualizirani na UV transluminatoru. Metilirana humana kontrola (Promega, Madison, Wisconsin, USA) je korištena kao pozitivna kontrola za metiliranu reakciju, DNA ljudskih bijelih krvnih stanica korištena je kao pozitivna kontrola nemetilirane reakcije dok je voda korištena kao negativna kontrola. DNA iz humanih bijelih krvnih stanica je izolirana prema ranijem opisanom protokolu (279).

4.6 Stanična kultura

Stanične linije OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO uzgojene su u DMEM hranjivom mediju (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) s 4.5 g/L D-glukozom i L-glutaminom (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 10%-tnim FBS-om (Gibco, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, SAD), 1 mM natrijevim piruvatom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SADS), 1% MEM vitaminima (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 1% MEM neesencijalnim aminokiselinama (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 1% Penicilin-Streptomycinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Stanična linija FNE1 uzgojena je u FOMI mediju (LTCC, Sveučilište u Miami-u, Sylvester Comprehensive Cancer Center, SAD) uz dodatak 25 ng/mL kolera toksina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u “Corning® Primaria™” posudama za kulturu stanica (Corning, New York, SAD). Sve stanične linije kultivirane su na 37°C u vlažnoj atmosferi uz prisustvo 5%-tnog CO₂.

4.7 Izolacija proteina i Western blot

Hranjivi medij uklonjen je iz posude za kulturu stanica promjera 10 cm te su stanice lagano isprane s ledeno hladnim PBS puferom (*engl. Phosphate buffered saline*). Stanice su lizirane pomoću ledeno hladnog pufera za lizu [150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8), 1% Triton X-100, 0.5% natrijev deoksikolat, 0.1% SDS] u kojeg su, neposredno prije korištenja, dodani inhibitor proteaza (Roche, Basel, Švicarska) i 1 mM PMSF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Nakon lize, stanice su ostrugane hladnom plastičnom strugalicom, sakupljene u mikroepruvetu od 1,5 mL te su inkubirane 30 minuta na rotirajućoj miješalici nakon čega je slijedilo centrifugiranje 20 min na 16 000 x g. Koncentracija proteina određena je pomoću BCA metode (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Kod Western blot analize korišten je 10% gel za razdvajanje proteinskih uzoraka mase 10 µg. Nakon elektroforeze, proteini su transferirani na PVDF membranu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Membrana je blokirana u 5%-tnom mlijeku (Carl Roth, Karlsruhe, Mannheim, Njemačka) otopljenom u TBST-u (*engl. tris buffered saline with Tween 20*) 1 sat na sobnoj temperaturi nakon čega je inkubirana u primarnom protutijelu razrijeđenom u 5%-tnom BSA (Carl Roth, Karlsruhe, Mannheim, Njemačka) preko noći na 4°C. Primarna protutijela korištena u istraživanju su: zečje poliklonalno anti-DVL1 protutijelo (razrjeđenje 1:500, Cat No. ab170694, Abcam, Cambridge, UK), zečje poliklonalno anti-DVL2 protutijelo (razrjeđenje 1:500, Cat No. sc-13974, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD) i mišje monoklonalno anti-DVL3 protutijelo (razrjeđenje 1:500, Cat No. sc-271295, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD). Membrana je također inkubirana u zečjem poliklonalnom anti-GAPDH protutijelu (razrijeđene 1:2000, Cat No. IMG-5143A, IMGENEX, San Diego, SAD) koji je služio kao kontrola učitavanja. Za vizualizaciju proteina korištena su sekundarna protutijela konjugirana s peroksidazom (razrjeđenje 1:5000, kozje anti-zečje, Cat No. P0448, Dako, Carpinteria, CA,

SAD; razrjeđenje 1:12500, kozje anti-mišje, Cat No. 170-6516, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) i SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

4.8 Ekstrakcija RNA, reverzna transkripcija i RT PCR.

Ukupna RNA izolirana je iz OVCAR5, OVCAR8, OVSAHO i FNE1 staničnih linija pomoću TRIzol reagensa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prema uputama proizvođača. Čistoća i koncentracija RNA izmjerene su pomoću NanoDrop 2000 spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) te je 2 µg RNA od svakog uzorka potom reverzno transkripirano pomoću cDNA Reverse Transcription kita (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prema uputama proizvođača. Ekspresija gena *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* kvantificirana je pomoću CFX-96 RT PCR detekcijskog sustava koristeći C100 termalni cikler (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Sve qPCR reakcije rađene su u triplikatu koristeći TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus PCR master mix, Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japan). Reakcijska smjesa inkubirana je 30 s pri 95 °C nakon čega je slijedilo 40 ciklusa u sljedećim uvjetima: 5s pri 95 °C i 30s pri 60 °C. Ct vrijednosti (*engl. Cycle threshold*) dobivene su pomoću CFX96 softvera, a rezultati su analizirani 2- $\Delta\Delta$ CT metodom. Relativna ekspresija ciljanih gena normalizirana je prema genu β -actin (ACTB) koji je služio kao endogena kontrola. Specifičnost qPCR amplifikacije potvrđena analizom „krivulja topljenja“, (*engl. melt curve analysis*). Sekvence početnica korištenih u istraživanju su: *DVL1* FW: 5'-CCCCTCCTTCCACCCAAATG-3', RW: 5'-GTGACTGACCATGGACTCCG-3' (Accession: NM_001330311.2); *DVL2* FW: 5'-TGAGCAACGATGACGCTGTG-3', RW: 5'-GCAGGGTCAATTGGCTGGA-3' (Accession: NM_004422.3); *DVL3* FW: 5'-ACAATGCCAAGCTACCATGCTTC-3', RW: 5'-AGCTCCGATGGGTTATCAGCAC-3' (Accession NM_004423.4); ACTB FW: 5'-GGGCATGGGTCAGAAGGATT-3', RW: 5'-AGTTGGTGACGATGCCGTG-3' (Accession: NM_001101).

4.9 Stereološka i kvantitativna analiza

Za stereološku analizu korišten je binokularni svjetlosni mikroskop “Nikon Alphaphot”. Rezovi su analizirani pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sustava s 42 točke za testiranje (280), pri povećanju od 400x, te je ukupna duljina testnih linija (Lt) iznosila 1,008 mm, a testna površina (At) 0,0837 mm² za svako analizirano mikroskopsko polje.

Veličina uzorka, tj. broj vidnih polja na kojima smo proveli mjerenje određena je nakon analize uzorka na 10 polja i uz 95%-tni interval povjerenja prema, formuli:

$$„n“ = (200/y \cdot s/x)^2$$

gdje je „n“ broj polja koje treba analizirati, x je aritmetička sredina orijentacijskog uzorka, s je standardna devijacija orijentacijskog uzorka i y je dopušteno odstupanje od rezultata aritmetičke sredine (280). Izračunati broj „n“ predstavlja broj testnih polja koje treba stereološki analizirati pri 95% intervalu povjerenja da rezultat ne bi odstupao od vrijednosti prosjeka za više od 10%.

Pomoću Weibelovog mnogonamjenskoga testnoga sistema brojala se ekspresija proteina SFRP1 i SFRP3 u seroznim karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti kao i u kontrolnim jajnicima, a nakon čega je slijedilo izračunavanje volumenske gustoće. Volumenska gustoća (V_v) je relativna stereološka varijabla koja pokazuje koliki dio sveukupnog prostora zauzima proučavana faza ili koliki je postotak proučavane faze u jedinici volumena (280). Volumenska gustoća je bez dimenzije. Volumenska gustoća (V_v) je izračunata prema formuli: $V_v = P_f/P_t$; (P_f = broj pogodaka testnih točaka na proučavanu fazu; P_t = broj svih testnih točaka unutar testnog polja).

Za analizu ekspresije proteina *SFRP1* i *SFRP3*, u izradi disertacije koristili smo obje metode, imunohistokemijsko bodovanje i kvantitativnu stereološku analizu te smo te rezultate publicirali u radu (281). Dokazali smo da su metode komplementarne, što također potvrđuje i rad Rizzadi i suradnika (276), tako da smo za analizu ekspresije proteina DVL koristili samo imunohistokemijsko bodovanje.

4.10 Statističke metode

Statistička obrada podataka uključivala je deskriptivnu statistiku s određivanjem minimalnih i maksimalnih vrijednosti, srednje vrijednosti i medijana s 95% intervalom pouzdanosti te Fischer egzaktni test ili Mann Whitney test za određene varijable. Distribucija podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnova testa. Spermanov test za neparametrijske varijable je korišten za usporedbu histokliničkih podataka i ekspresije proteina. Razlike u ekspresiji SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 i DVL3 u istraživanim skupinama analizirane su Kruskal Wallis ANOVA testom s post hoc Dunn-ovim testom.

Ukupno preživljenje definirano je kao vrijeme proteklo od dana dijagnoze bolesti do smrti pacijenta ili do dana zadnjeg praćenja (isključivanja iz studije). Preživljavanje bez napredovanja bolesti (PFS) definirano je kao vrijeme proteklo od dana dijagnoze do pojave recidiva bolesti, smrti ili dana zadnjeg praćenja. Univarijatna analiza varijabli koje zahvaćaju ukupno preživljenje i preživljavanje bez napredovanja bolesti je učinjeno korištenjem log Rank testa kojim smo identificirali preliminarnu listu signifikantnih faktora. Faktori koji su univarijatnom analizom pokazali signifikantnost ili su pokazali da imaju trend prema signifikantnosti ($p < 0,1$) uključeni su u multivarijatnu analizu. Multivarijatna analiza ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez pojave bolesti (PFS) učinjena je Cox proporcionalnim regresijskim modelom, korištenjem povratne stepenaste metode (*engl. Cox proportional-hazards regression - backward stepwise method*). Medijan i tablice preživljenja su izračunate korištenjem Kaplan Meier procjene preživljenja, a log Rank test je korišten za iskazati signifikantnost rezultata. Priznata je kao značajna razlika na razini stupnja vjerojatnosti od $p < 0,05$. Za statističku analizu korišten je program IBM SPSS Statistics, Version 21

5 REZULTATI

U istraživanje su uključene 52 pacijentice operirane u Klinici za Ženske bolesti i porode u periodu od 2000. do 2012. godine radi karcinoma jajnika, seroznog tipa. Pacijentice su praćene do 31.12.2019. godine. Primjenjujući nove kriterije Svjetske zdravstvene organizacije, formirane su dvije grupe pacijentica; 40 pacijentica sa seroznim karcinomom jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC) i 12 pacijentica sa seroznim karcinomom jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC). Za usporedbu formirana je kontrolna grupa, 9 pacijentica sa zdravim jajnicima, a koje su operirane radi druge nemaligne ginekološke bolesti, te je dodatno uključeno još 5 pacijentica sa zdravim tkivom jajovoda koje je također korišteno kao kontrolna skupina, a prema trenutnim saznanjima o podrijetlu seroznog karcinoma jajnika.

Prosječna starost pacijentica operiranih od seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti je iznosila 58 godina, raspon od 37. do 81. godine (95% CI 56,02 - 62,71) dok je u pacijentica operiranih od karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti prosječna starost bila viša, 64 godine, s rasponom od 48. do 86. godine (95% CI 55,74 - 72,35). Prosječna starost žena u kontrolnim skupinama iznosila je 62 godine za skupinu sa zdravim jajnikom raspona od 52. do 81. godine (95% CI 57,92 - 72,31) te 53 godine za kontrolnu skupinu s urednim tkivom jajovoda, raspona od 50. do 68. godine (95% CI 47,50 - 67,08), a koje je u istraživanje naknadno uključeno. Raspon godina unutar pojedine grupe slijedio je pravila normalne distribucije (Shapiro-Wilk test $p=0,231$ za HGSC, $p=0,321$ za LGSC, $p=0,677$ za kontrolnu grupu – zdravi jajnik; $p=0,246$ za kontrolnu grupu – jajovod). (Tablica 2)

Tablica 2 – Godine dijagnoze kod uključenja u istraživanje. Vrijednosti su izražene u godinama; SD standardna devijacija; p vrijednost je izražena Shapiro-Wilk testom.

	HGSC (n=40)	LGSC (n=12)	Kontrola	
			Jajnik (n=9)	Jajovod (n=5)
Aritmetička sredina ± SD (god)	59,36 ± 10,45	64,05 ± 13,07	65,15 ± 9,40	57,30 ± 7,87
Medijan (god) (min – max)	58,17 (36,92 – 81,00)	64,10 (48,35 – 86,21)	61,68 (51,51 – 80,63)	52,87 (50,06 – 68,28)
Distribucija unutar skupine	p=0,231	p=0,321	p=0,677	p=0,246

Serozni karcinomi jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC) u 2/3 slučajeva su bili dobro diferencirani, a koji su u više od 50% slučajeva dijagnosticirani u početnoj fazi bolesti (5 pacijentica [41,67%] u stadiju FIGO I i 2 pacijentice [16,67%] u stadiju FIGO II) (p=0,007 Chi-Square test). Za razliku od HGSC tumora koji su u 77,5% slučajeva bili slabo diferencirani (p<0,001 Fisher exact test) te su prilikom dijagnoze u 85% slučajeva bili u uznapredovaloj fazi bolesti s prisutnim udaljenim metastazama (30 pacijentica [75%] u stadiju FIGO III i 4 pacijentice [10%] u stadiju FIGO IV) (p=0,007 Chi-Square test). Recidiv bolesti, bilo klinički ili laboratorijski, zabilježen je jedino u HGSC grupi pacijentica u 67,50% slučajeva (p<0,001 Fisher exact) s medijanom pojave od godinu dana nakon primarne operacije (raspon od 0,11 – 4,64 godine). Po završetku praćenja, s danom 31.12.2019. godine u skupini žena operiranih od seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti 17,5% pacijenata je preživjelo od dana operacije, dok je u LGSC skupini bilo 50% živih ispitanica. (p=0,032 Fisher exact test). (Tablica 3)

Tablica 3 - Promatrani klinički parametri pacijentica liječenih od seroznog karcinoma visokog i niskog stupnja malignosti. Vrijednosti su iskazane brojčano (n) i u postotku (%), p vrijednost je iskazana chi-square ili Fisher exact testom.

	HGSC (n=40)	LGSC (n=12)	p vrijednost
Gradus tumora (n/%)			
I	0	8 (66,7 %)	p<0,001 Fisher exact test
II	9 (22,5%)	4 (33,3 %)	
III	31 (77,5 %)	0	
FIGO stadij (n/%)			
I	2 (5%)	5 (41,67%)	p=0,007 Chi-Square test
II	4 (10%)	2 (16,67%)	
III	30 (75%)	4 (33,33%)	
IV	4 (10%)	1 (8,33%)	
Recidiv bolesti (n/%)			
“Second look” operacija (n)	27 (67,50%)	0	p<0,001 Fisher exact
Aritmetička sredina ± SD (god)	1,30 ± 1,08		
Medijan (god) (min – max)	1,00 (0,11 – 4,64)		
Vitalni status (granica 31.12.2019) (n/%)			
Živi (n)	7 (17,5%)	6 (50%)	p=0,032 Fisher exact test
Premинуli (n)	33 (82,5%)	6 (50%)	

Medijan preživljena bez bolesti (PFS) iznosio je 1,46 godina u skupini HGSC tumora (srednja vrijednost 3,292; 95% CI 1,815-4,770) dok je u LGSC skupini iznosio 9,080 godina (srednja vrijednost 11,013; 95% CI 5,877-16,150) (p=0,033; log Rank test) (Tablica 4)

Medijan ukupnog preživljenja (OS) žena operiranih od HGSC je iznosio 3,81 godinu (srednja vrijednost 5,870; 95% CI 4,200-7,540) dok je u LGSC skupini iznosio 9,080 godina (srednja vrijednost 11,013; 95% CI 5,877-16,150). (p=0,119; log Rank test) (Tablica 4)

Ukupno 5 godišnje preživljenje za HGSC skupinu iznosi 37,5%, a za LGSC skupinu 58,33% (p=0,009 log Rank test). (Tablica 4)

Pet godišnje preživljenje unutar FIGO skupine za HGSC skupinu ispitanica iznosilo je redom 100% za FIGO I; 75% za FIGO II; 33,33% za FIGO III i bez petogodišnjeg preživljenja za FIGO IV ($p=0,044$ log Rank test). Kod LGSC tumora preživljenje je bilo 100% za FIGO I; 50% za FIGO II, 25% za FIGO III i također bez preživljenja za FIGO IV ($p=0,025$ log Rank test). (Tablica 4)

Tablica 4 – Ukupno preživljenje (OS) i period bez progresije bolesti (PFS) za serozni karcinom jajnika visokog i niskog stupnja malignosti. Vrijednosti su iskazane kao postotak (%) ili kao godine (godina); SE – standard greška; CI – interval pouzdanosti; p vrijednost je iskazana s log Rank testom

	HGSC (n=40)	LGSC (n=12)	p vrijednost
5-godišnje preživljenje (%)			
%	37,50	58,33	p=0,009
5-godišnje preživljenje po FIGO skupinama (%)			
I	100	100	p=0,044 HGSC p=0,025 LGSC
II	75	50	
III	33,33	25	
IV	0	0	
Ukupno preživljenje - OS (godina)			
Aritmetička sredina ± SE (god)	5,870 ± 0,852	11,013± 2,621	0,119
95% CI	4,200 – 7,450	5,877 – 16,150	
Medijan (god)	3,810	9,080	
Preživljenje bez progresije bolesti - PFS (godina)			
Aritmetička sredina ± SD (god)	3,292 ± 0,754	11,013 ± 2,621	0,033
95% CI	1,815 - 4,770	5,877 - 16,150	
Medijan (god)	1,460	9,080	

5.1 Negativni regulatori signalnog puta Wnt - SFRP1 i SFRP3

Ekspresija proteina SFRP1 i SFRP3 istraživana je u seroznom karcinomu jajnika visokog i niskog stupnja malignosti te je uspoređivana s ekspresijom proteina u urednim jajnicima. Ekspresija proteina je iskazana na dva načina, semikvantitativnom metodom prema Rizzadu i suradnicima (276) te kvantitativnom metodom, metodom stereologije (280). Rezultati ekspresije iskazani su u Tablica 5.

Tablica 5 – Ekspresija proteina SFRP1 i SFRP3 iskazana kvantitativnom stereološkom metodom i semikvantitativnom metodom. Vrijednosti su iskazane kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija. p vrijednost je izračunata pomoću Kruskal Wallis ANOVA testa s post hoc Dunnovim testom.

	HGSC	LGSC	Kontrola	p vrijednost
SFRP1 – kvantitativno	0,029 $\pm$ 0,029	0,041 $\pm$ 0,044	0,616 $\pm$ 0,128	<0,001
SFRP1 - semikvantitativno	0,950 $\pm$ 1,012	1,500 $\pm$ 1,168	3,00 $\pm$ 0,000	<0,001
SFRP3 – kvantitativno	0,057 $\pm$ 0,060	0,087 $\pm$ 0,096	0,889 $\pm$ 0,168	<0,001
SFRP3 - semikvantitativno	1,650 $\pm$ 1,075	1,750 $\pm$ 1,055	3,000 $\pm$ 0,000	0,001

Spermanovim korelacijskim testom usporedili smo obje metode, te smo dokazali čvrstu pozitivnu korelaciju između obje metode, $p < 0,001$. (Tablica 6)

Tablica 6 – Spermanov korelacijski test usporedbe ekspresije proteina SFRP1 i SFRP3 iskazan semikvantitativnom i kvantitativnom metodom, cjelokupni uzorak, X – analiza nije rađena

		SFRP1 semikvantitativno	SFRP3 semikvantitativno
SFRP1 kvantitativno	rho test (ρ)	0,666	X
	p vrijednost	<0,001	
SFRP3 kvantitativno	rho test (ρ)	X	0,585
	p vrijednost		<0,001

Svi uzorci urednog tkiva jajnika (strome i krvnih žila), kao i uredno tkivo jajnika uz maligno promijenjen jajnik, imaju zastupljenu ekspresiju proteina SFRP1 i SFRP3 u više od 50% uzoraka. (Slika 5B, Tablica 7) Ekspresija proteina SFRP1 u HGSC uzorcima u 45% slučajeva nije prisutna, 22,5% je imalo ekspresiju manju od 10%, 25% imalo je ekspresiju između 10 i 50% a 7,5% je imalo ekspresiju iznad 50%. Ekspresija proteina SFRP3 u LGSC uzorcima je bila ravnomjerno zastupljena s 25 % za sva 4 razreda (negativna ekspresija, <10%, 10-50% i >50%) (Tablica 7). Ekspresija proteina SFRP3 u HGSC uzorcima u 22,5% nije iskazana, 12,5% je imalo ekspresiju <10%; 42,5% je imalo ekspresiju 10-50% dok je u 22,5% slučajeva ekspresija bila >50%. U LGSC uzorcima 16,7 % uzoraka nije ekspresiralo SFRP3, 16,7% je imalo ekspresiju <10%, 41,7% uzoraka je imalo ekspresiju 10-50% a 25% uzoraka je imalo ekspresiju >50%. (Tablica 7, Slika 5)

Tablica 7 – Ekspresija proteina SFRP1 i SFRP3 u seroznom karcinomu jajnika visokog i niskog stupnja malignosti i kontrolnim uzorcima, urednom tkivu jajnika. Vrijednosti su iskazane brojčano (n) i u postotku (%)

	* SFRP1 n/(%)				* SFRP3 n/(%)			
	>50%	10-50%	<10%	0%	>50%	10-50%	<10%	0%
HGSC (n=40)	3 (7,5%)	10 (25%)	9 (22,5%)	18 (45%)	9 (22,5%)	17 (42,5%)	5 (12,5%)	9 (22,5%)
LGSC (n=12)	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)
Kontrola jajnik (n=9)	9 (100%)	0	0	0	9 (100%)	0	0	0

% tumorskih stanica (epitelnih stanica u tkivu zdravog jajnika)

Kada usporedimo HGSC i LGSC s kontrolama, dobijemo da je ekspresija proteina i SFRP1 i SFRP3 u HGSC i LGSC tumorima statistički značajno niža nego u kontrolama (SFRP1 $p < 0,001$ HGSC - kontrola; $p = 0,034$ LGSC - kontrola; SFRP3 $p = 0,001$ za HGSC - kontrola; $p = 0,015$ za LGSC - kontrole, Kruskal Wallis test). Nismo našli statističku značajnu razliku između ekspresije SFRP1 i SFRP3 unutar grupe HGSC i LGSC (Tablica 8, Tablica 9)

Tablica 8 – Odnos ekspresije proteina SFRP1. Vrijednosti izračunate Kruskal Wallis ANOVA testom s post hoc Dunnovim testom.

SFRP1	Srednji rang	Vrijednost testa	Standardna pogreška	p vrijednost
HGSC-LGSC	25,19	-7,9380	5,627	0,950
HGSC-kontrola	33,12	-28,812	6,307	<0,001
LGSC-kontrola	54,00	-20,875	7,538	0,034

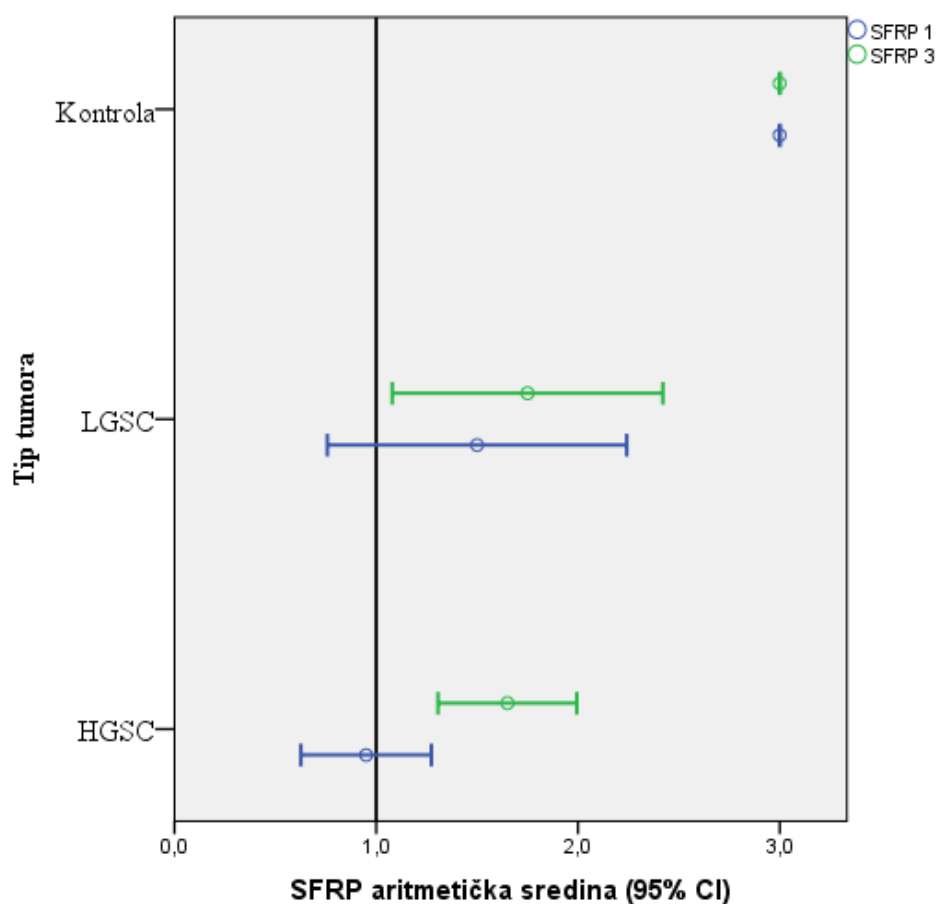
Tablica 9 – Odnos ekspresije proteina SFRP3. Vrijednosti izračunate Kruskal Wallis ANOVA testom s post hoc Dunnovim testom.

SFRP3	Srednji rang	Vrijednost testa	Standardna pogreška	p vrijednost
HGSC-LGSC	27,24	-1,304	-0,235	1,000
HGSC-kontrola	28,54	-23,762	-3,813	0,001
LGSC-kontrola	51,00	-22,458	-3,015	0,015

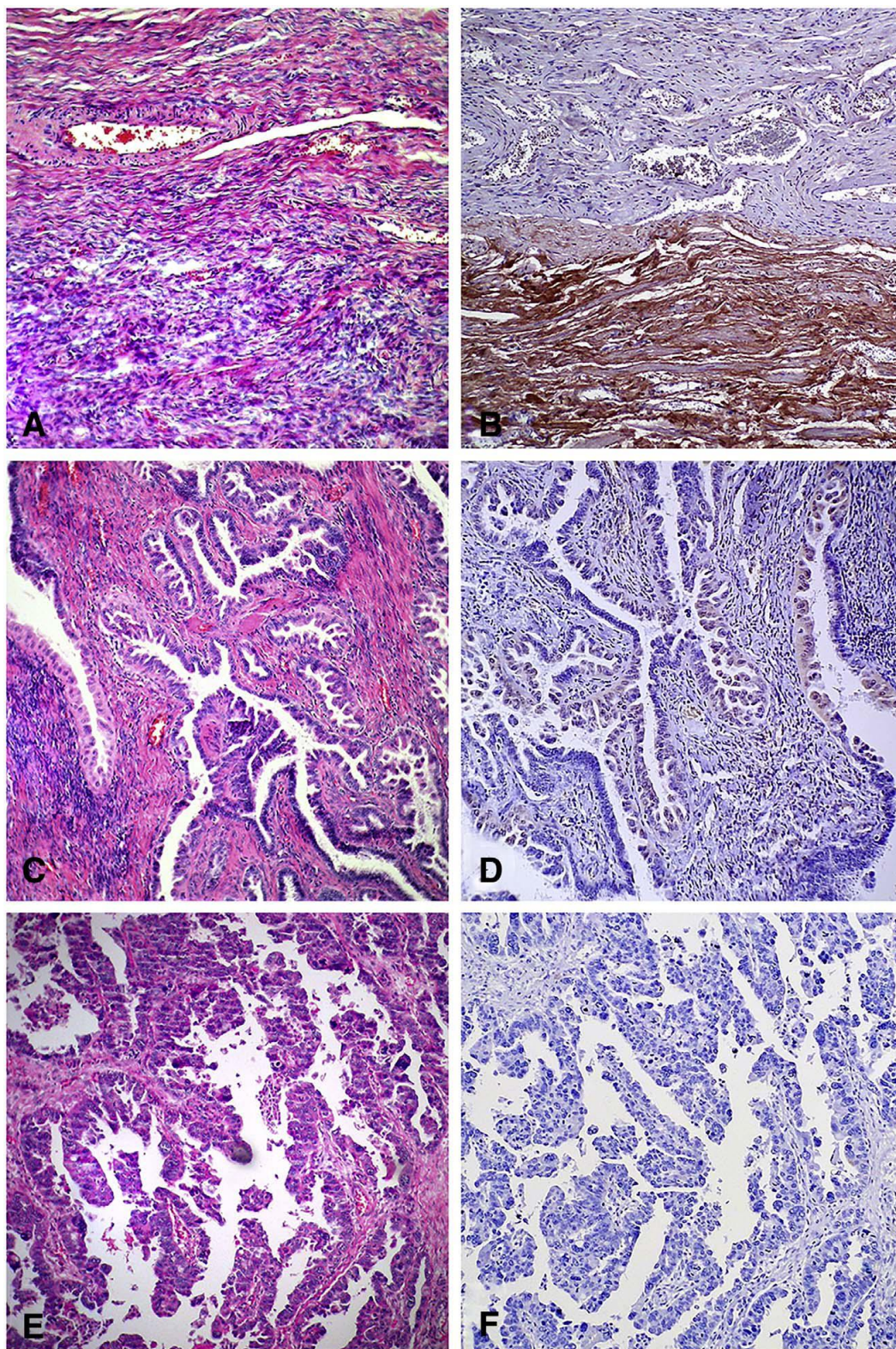
U skupini HGSC tumora statistički je značajno manja ekspresija SFRP1 proteina nego ekspresija SFRP3 proteina ($p=0,004$ Mann - Whitney U test). (Tablica 10, Slika 4) Između LGSC i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike između ekspresije SFRP1 i SFRP3.

Tablica 10 – Ekspresija proteina SFRP1 i SFRP3 unutar ispitivane grupe. Vrijednosti su izražene kao srednji rang, Mann Whitney U test.

	SFRP1	SFRP3	p vrijednost
HGSC	33,40	47,60	0,004
LGSC	11,75	13,25	0,630
Kontrola	9,50	9,50	1,0



Slika 4 – Ekspresija proteina SFRP1 i SFRP3 u HGSC, LGSC i kontrolama, zdravom tkivu jajnika. o - aritmetička sredina; | - 95% interval pouzdanosti



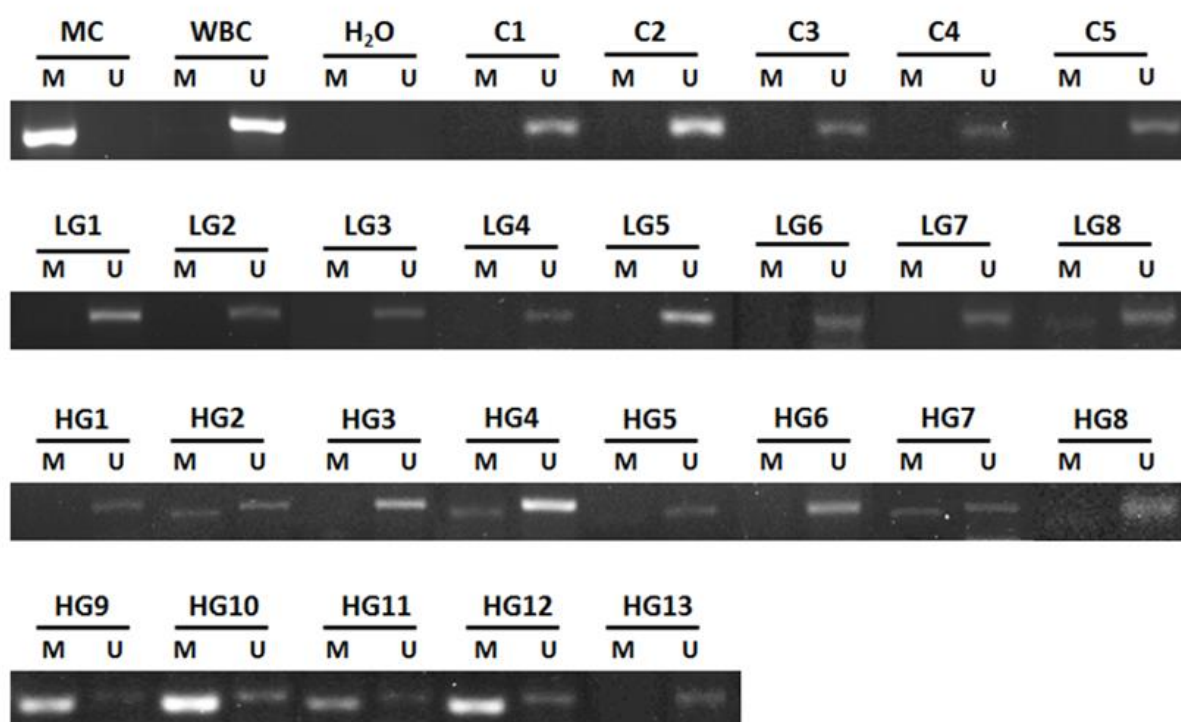
Slika 5 –Imunohistokemijsko bojanje proteina SFRP1, povećanje 100x, ekspresija u normalnim uzorcima jajnika pokazuje zadržanu ekspresiju proteina (B), LGSC pokazuju difuznu ekspresiju proteina (D) i HGSC pokazuju kompletno odsustvo ekspresije proteina (F). Hemalaun eozin bojanje normalnog jajnika (A), LGSC (C) i HGSC (E). LGSC, serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti ; HGSC, serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti

5.1.1 MSP – PCR ovisan o metilaciji

Metilacija DNA u promotorima gena *SFRP1* analizirana je PCR-om ovisnim o metilaciji (*engl. Methylation-specific PCR, MSP*). Nasumično je izabrano 13 uzoraka tkiva (formalin fiksiranih, parafin uklopljenih) seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, 8 uzoraka seroznog karcinoma niskog stupnja malignosti te 5 uzoraka kontrolnih jajnika.

Niti jedan uzorak kontrolnog tkiva jajnika nema metilirani promotor gena *SFRP1* te zadržava proteinsku ekspresiju SFRP1 u >50% stanica. (Slika 5B, Slika 6)

Slično kao i zdravi jajnici, 7/8 (87.5%) LGSC tumora nemaju metilirani promotor gena *SFRP1*, dok je u samo jednom uzorku LGSCa (12.5%) detektirana izrazito slaba metilacija gena *SFRP1*. (Slika 6). 7 od 13 (54%) nasumično izabranih uzoraka seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti pokazalo je metilaciju gena za *SFRP1*. (Slika 6)



Slika 6 – PCR ovisan o metilaciji za promotor *SFRP1*. Normalni jajnici (kontrola C1-C5); serozni karcinom jajnika niskog stupnja malignosti (LGSC, LG1-LG8 i serozni karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSC, HG1-HG13). Prisutnost vidljivog PCR banda u polju U predstavlja nemetilirani promotor, a prisutnost PCR banda u polju M predstavlja prisutnost metiliranog promotora. Metilirana humana kontrola (MC) je korištena kao pozitivna kontrola za metiliranu reakciju, ljudska DNA bijelih krvnih zrnaca je korištena kao pozitivna reakcija za nemetiliranu reakciju, a voda je korištena kao negativna kontrola.

5.2 Pozitivni regulatori signalnog puta Wnt

Ekspresija proteina DVL1, DVL2, DVL3 istraživana je u seroznom karcinomu jajnika visokog i niskog stupnja malignosti te je uspoređivana s ekspresijom proteina u urednim jajnicima, a naknadno je u istraživanje uključena kontrolna skupina urednog tkiva jajovoda za usporedbu sa seroznim karcinomom visokog stupnja malignosti. Ekspresija proteina iskazana je semikvantitativnom metodom prema Rizzadu i suradnicima (276).

Ekspresija proteina DVL1 u HGSC uzorcima u 75% slučajeva je bila manja od 10 % (67,5% negativna; 7,5% <10%), 20% uzoraka je imalo ekspresiju 10-50%, a 5% veću od 50%, za razliku od LGSC uzoraka gdje je u 50 % slučajeva ekspresija DVL1 bila manja od 10% (33,3% negativna ekspresija; 16,7% <10%). 25% uzoraka je imalo ekspresiju 10-50% kao i 25% uzoraka ekspresiju veću od 50%. Ekspresija DVL1 proteina nije eksprimirana u kontrolnim uzorcima, zdravim jajnicima i epitelu jajovoda. (Tablica 11)

Ekspresija proteina DVL2 u HGSC uzorcima je manja od 10% u 30% slučajeva, (25% negativna ekspresija, 5% manja od 10%), 35% je imalo ekspresiju 10-50%, a 35% ekspresiju veću od 50%. LGSC tumori su imali negativnu ekspresiju u 16,7% slučajeva, 25% slučajeva je imalo ekspresiju između 10 i 50% dok je 58,3% imalo ekspresiju veću od 50%. U kontrolnim uzorcima jajnika, ekspresija proteina DVL2 u 44,5% slučajeva je bila negativna, 33,3% je imalo ekspresiju između 10 i 50% a 22,2% je imalo ekspresiju DVL2 proteina veću od 50%. Kontrolni uzorci jajovoda su imali negativnu ekspresiju u 20% slučajeva. 60% uzoraka je imalo ekspresiju između 10 i 50% dok je 20% imalo ekspresiju veću od 50%. (Tablica 11)

Ekspresija proteina DVL3 u HGSC uzorcima je manja od 10% u 40% slučajeva (25% negativna ekspresija, 15% ekspresija <10%) 37,5 % je imalo ekspresiju 10-50%, a 22,5% ekspresiju veću od 50%. Ekspresija DVL3 u LGSC uzorcima je u 33,4% uzoraka bila manja od 10% (16,7% negativna, 16,7% manja od 10%), 33,3% 10-50% a u 33,3% veća od 50%. U kontrolni uzorcima jajnika 88,9% je imalo ekspresiju slabiju od 10% (66,6% negativna ekspresija, 22,2% manja od 10%), a 11,1% je bilo ekspresije između 10 i 50%. Kontrolni uzorci jajovoda su imali slabiju ekspresiju od 10% u svim uzorcima (80% bez ekspresije, 20% slabija od 10%). (Tablica 11)

Tablica 11 – Ekspresija proteina DVL1, DVL2, DVL3 u seroznom karcinomu jajnika visokog i niskog stupnja malignosti, kontrolnim zdravim jajnicima i kontrolnom zdravom tkivu jajovoda. Vrijednosti su iskazane brojčano (n) i u postotku (%)

	* DVL1 n/(%)				* DVL2 n/(%)				* DVL3 n/(%)			
	> 50%	10-50%	< 10%	0%	> 50%	10-50%	< 10%	0%	> 50%	10-50%	< 10%	0%
Kontrola - jajnik (n=9)	-	-	-	9 (100%)	2 (22.2%)	3 (33.3%)	-	4 (44.5%)	-	1 (11.1%)	2 (22.2%)	6 (66.7%)
LGSC (n=12)	3 (25%)	3 (25%)	2 (16.7%)	4 (33.3%)	7 (58.3)	3 (25%)	-	2 (16.7%)	4 (33.3%)	4 (33.3%)	2 (16.7%)	2 (16.7%)
Kontrola - jajovod (n=5)	-	-	-	5 (100%)	1 (20%)	3 (60%)	-	1 (20%)	-	-	1 (20%)	4 (80%)
HGSC (n=40)	2 (5%)	8 (20%)	3 (7.5%)	27 (67.5%)	14 (35%)	14 (35%)	2 (5%)	10 (25%)	9 (22.5%)	15 (37.5%)	6 (15%)	10 (25%)

% tumorskih stanica (epitelnih stanica u tkivu zdravog jajnika ili jajovoda)

Postoji statistički značajna razlika između ekspresije proteina DVL1 i DVL3 u tkivu seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti u usporedbi s kontrolnim uzorcima. (DVL1 - $p=0,004$; DVL3 - $p=0,003$; Kruskal Wallis test). (Tablica 12)

Tablica 12 - Ekspresija DVL1, DVL2, i DVL3 semikvantitativna metoda. Vrijednosti su iskazane kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija. p vrijednosti je izračunata pomoću Kruskal Wallis ANOVA testa s post hoc Dunnovim testom.

	HGSC	LGSC	kontrola		p vrijednost
			jajnik	jajovod	
DVL1	0,625 $\pm$ 0,978	1,417 $\pm$ 1,240	0	0	0,004
DVL2	1,800 $\pm$ 1,181	2,250 $\pm$ 1,138	1,333 $\pm$ 1,323	1,800 $\pm$ 1,095	0,317
DVL3	1,575 $\pm$ 1,107	1,833 $\pm$ 1,115	0,444 $\pm$ 0,727	0,200 $\pm$ 0,447	0,003

Ekspresija DVL1 proteina bila je statistički značajno veća u LGSC tumorima nego u kontrolnoj skupini, zdravom tkivu jajnika i urednom epitelu jajovoda ($p=0,007$; $p=0,042$ Kruskal Wallis test). Nismo našli statistički značajnu razliku između ekspresije proteina DVL1 u HGSC uzorcima i kontrolnim uzorcima zdravog jajnika ($p=0,426$; Kruskal Wallis test) niti u epitelu jajovoda ($p=0,962$; Kruskal Wallis test). (Tablica 13, Slika 8A, D, G i J)

Tablica 13 – Odnos ekspresije proteina DVL1, Kruskal Wallis ANOVA test s post hoc Dunnovim testom.

DVL1	Vrijednost testa	Standardna pogriješka	p vrijednost
HGSC-LGSC	-12,142	5,201	0,117
HGSC-kontrola (jajnik)	10,525	5,830	0,426
HGSC-kontrola (jajovod)	10,525	7,496	0,962
LGSC-kontrola (jajnik)	22,667	6,968	0,007
LGSC-kontrola (jajovod)	22,667	8,412	0,042

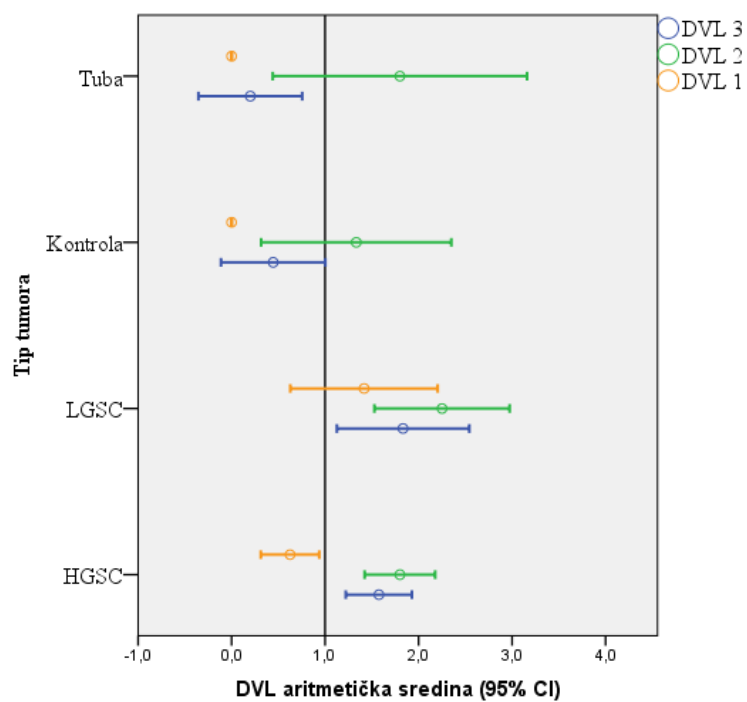
Nismo dokazali statistički značajnu razliku ekspresije proteina DVL2 između seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti kao ni u kontrolnim uzorcima ($p=0,317$ Kruskal Wallis test). Slika 8B, E, H i K.

Ekspresija proteina DVL3 je bila statistički značajno veća u LGSC uzorcima u usporedbi s kontrolnim zdravim jajnikom i urednim epitelom jajovoda ($p=0,036$; $p=0,045$ Kruskal Wallis test) dok je ekspresija proteina DVL3 u HGSC uzorcima bila statistički značajno veća nego u kontrolnom zdravom tkivu jajnika ($p=0,046$ Kruskal Wallis test) te granično signifikantna u kontrolnom zdravom epitelu jajovoda ($p=0,069$ Kruskal Wallis test). Nije pronađena statistički značajna razlika između ekspresije DVL3 proteina u HGSC i LGSC uzorcima ($p=1,000$; Kruskal Wallis test). (

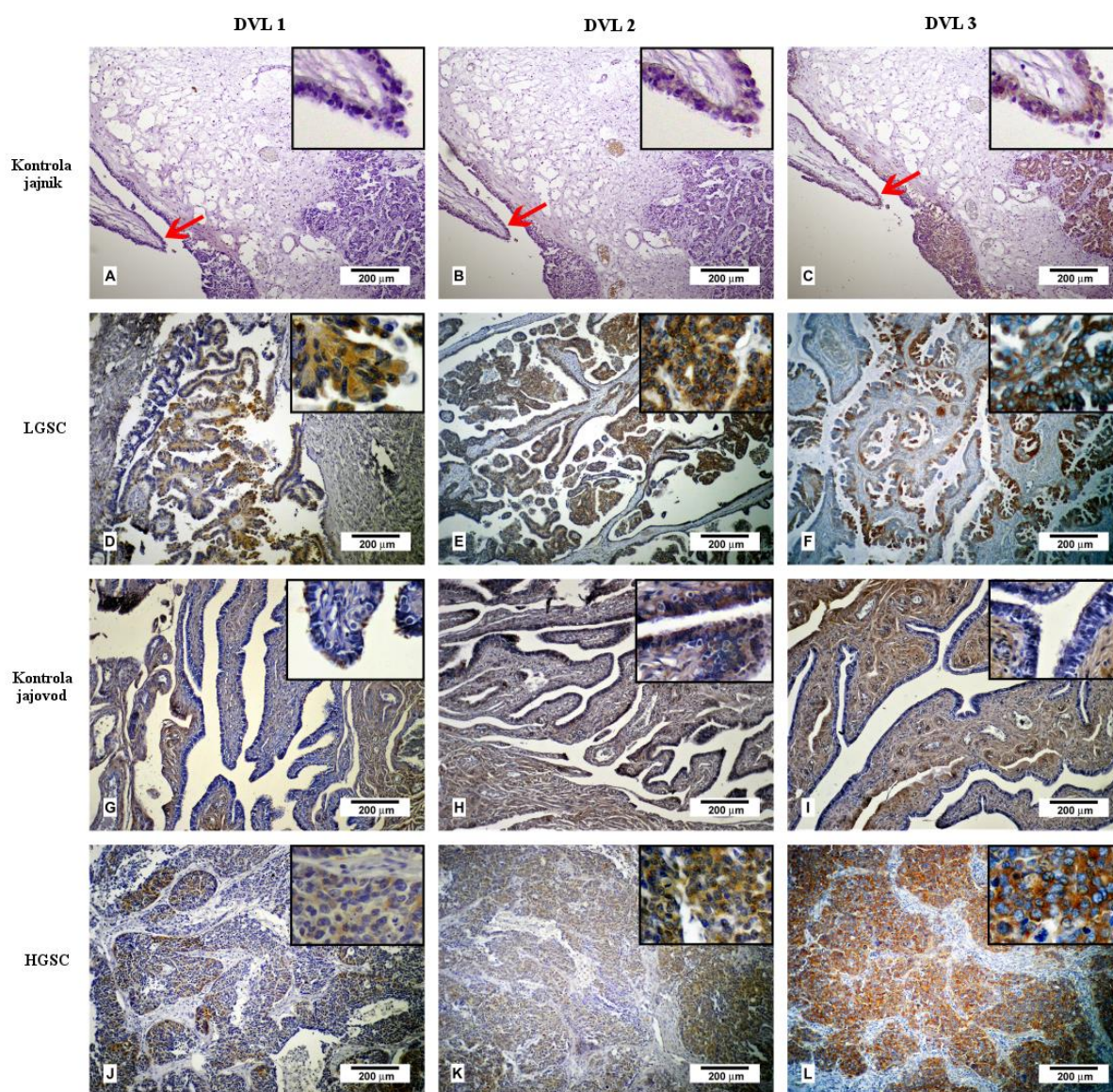
Tablica 14, Slika 8C, F, I i L)

Tablica 14 - Odnos ekspresije proteina DVL3, Kruskal Wallis ANOVA test s post hoc Dunnovim testom.

DVL3	Vrijednost testa	Standardna pogreška	p vrijednost
HGSC-LGSC	-4,196	6,070	1,000
HGSC-kontrola (jajnik)	18,165	6,804	0,046
HGSC-kontrola (jajovod)	22,088	8,748	0,069
LGSC-kontrola (jajnik)	22,361	8,133	0,036
LGSC-kontrola (jajovod)	26,283	9,817	0,045



Slika 7 – Ekspresija DVL1, DVL2 i DVL3 u HGSC, LGSC i kontrolama, zdravom tkivu jajnika i epitelu jajovoda. o - aritmetička sredina; | - 95% interval pouzdanosti



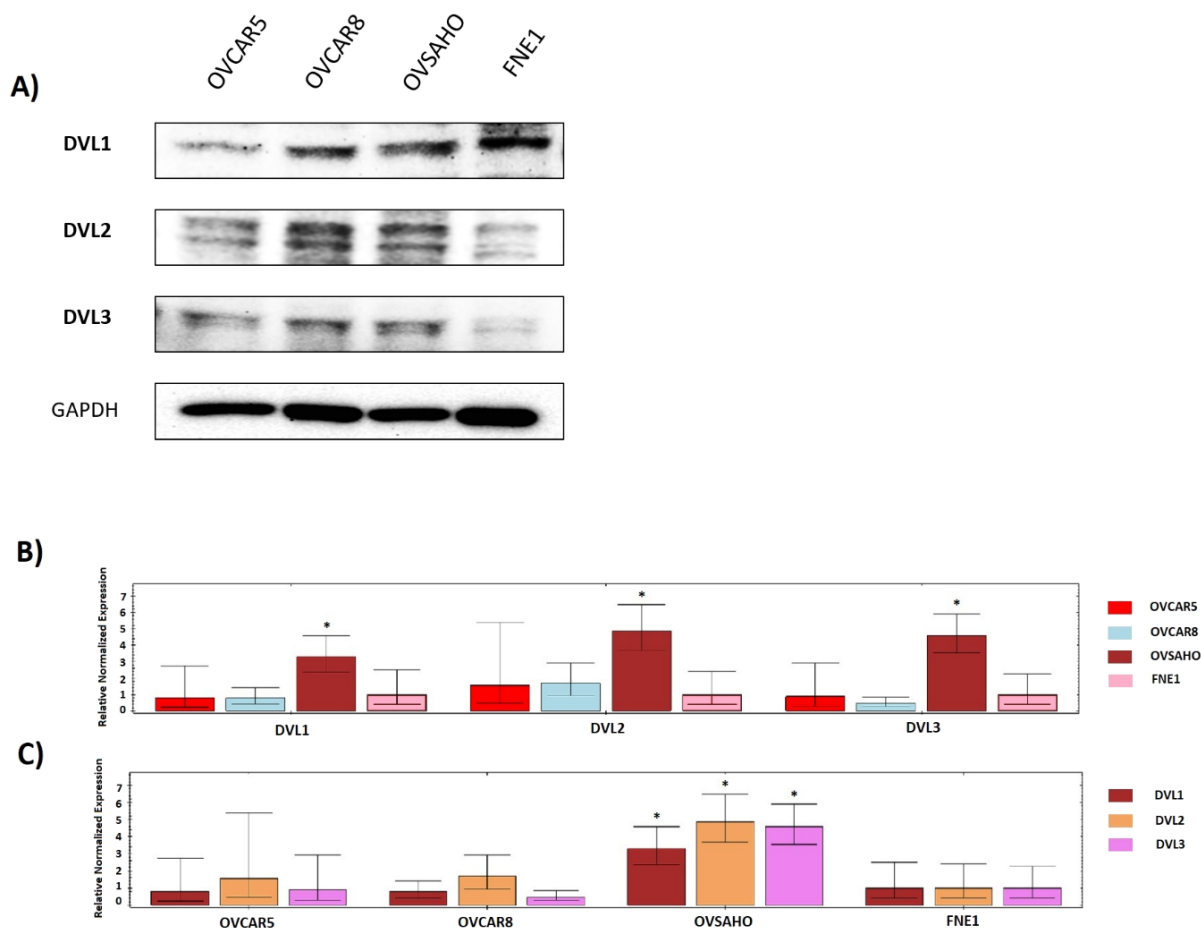
Slika 8 – Ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u normalnom celomskom epitelu (crvene strelice) i tranzicija u serozni karcinom visokog stupnja malignosti (A, B, C), serozni karcinom niskog stupnja malignosti (D, E, F), jajovod (G, H, I) i serozni karcinom visokog stupnja malignosti (J, K, L).

U grupi HGSC, LGSC, zdravom tkivu jajovoda i zdravom tkivu jajnika ekspresija DVL proteina je slijedila sljedeći obrazac $DVL1 < DVL3 < DVL2$ (Tablica 12). Statistički značajna razlika uočena je između DVL1 i DVL2 kod HGSC uzoraka ($p < 0,001$ Kruskal Wallis test), kod zdravog tkiva jajovoda ($p = 0,02$ Kruskal Wallis test) i zdravog tkiva jajnika ($p = 0,02$ Kruskal Wallis test). Statistički značajna razlika također je uočena u HGSC uzorcima između DVL1 i DVL3 ($p = 0,001$ Kruskal Wall test).

5.2.1 Ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u staničnim linijama

S obzirom na transkripcijsku aktivnost gena *DVL1*, *DVL2*, i *DVL3* u OVCAR5, OVCAR8 i OVASHO staničnim linijama, u komparaciji s FNE1 staničnom linijom, statistički značajna razlika nađena je samo za up-regulaciju mRNA ekspresije DVL1 (fold change = 3,30; $p=0,005$, DVL2 (fold change = 4,9; $p<0,001$) i DVL3 (fold change = 4,6; $p<0,001$) u OVASHO staničnoj liniji. (Slika 9B, C) DVL1, DVL2 i DVL3 su također statistički značajno up-regulirani u OVASHO staničnoj liniji u usporedbi s OVCAR5 i OVCAR8 staničnim linijama dok razina ekspresije mRNA između OVCAR5 i OVCAR8 nije bila statistički značajna. (Slika 9 B,C)

Rezultati Western blot analize pokazali su da je ekspresija sva 3 DVL proteina izražena u svim HGSC staničnim linijama kao i staničnoj liniji kontrole. Razina ekspresije proteina DVL2 i DVL3 je bila viša u HGSC staničnim linijama OVCAR5, OVCAR8 i OVASHO u usporedbi sa staničnom linijom normalnih epitelnih stanica jajovoda FNE1. (Slika 9A) Nije bilo razlike u ekspresiji proteina DVL1 između HGSC staničnih linija i kontrole. (Slika 9A) Dvostruki proteinski band vjerojatno predstavlja fosforiliranu (gornji dio banda) i nefosforiliranu (donji dio banda) formu DVL2 i DVL3 proteina (282). (Slika 9A)



Slika 9 – Ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u staničnim linijama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO) i staničnom linijom normalnih epitelnih stanica jajovoda imortalizirane TERT-om (FNE1) detektirana s Western blot tehnikom. Protutijelo na GAPDH je korišteno kao kontrola (A). Relativna vs. normalizirana vrijednost mRNA ekspresije DVL1, DVL2 i DVL3 u HGSC staničnim linijama OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO nasuprot stanična linija normalnih epitelnih stanica jajovoda imortalizirana TERT-om - FNE1 (B) i njihova ekspresija unutar stanične linije (C). Zvezdica označava statistički značajnu razliku razine ekspresije mRNA DVL u HGSC staničnim linijama u usporedbi s kontrolom. FNE1 staničnom linijom.

5.3 Usporedba ekspresije pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt

Spermanovim korelacijskim testom pokazana je pozitivna korelacija u HGSC tumorima između proteina SFRP1 i DVL2 ($\rho=0,440$; $p=0,005$ Sperman's rho test) te DVL3 ($\rho=0,338$; $p=0,033$ Sperman's rho test). Negativna korelacija dokazana je između proteina DVL1 i SFRP1 te SFRP3, ali nije bila statistički značajna (SFRP1: $\rho= -0,214$; $p=0,185$; SFRP3: $\rho= -0,136$; $p=0,404$ Sperman's rho test). (Tablica 15)

Tablica 15 – Spermanov korelacijski test za HGSC skupinu tumora

HGSC		DVL1	DVL2	DVL3
SFRP1	rho test (ρ)	-0,214	0,440	0,338
	p vrijednsot	0,185	0,005	0,033
SFRP3	rho test (ρ)	-0,136	0,033	0,230
	p vrijednsot	0,404	0,838	0,154

U LGSC skupini Spermanovim korelacijskim testom dokazana je pozitivna korelacija između SFRP1 i DVL1 ($\rho=0,603$; $p=0,038$ Sperman's rho test) te DVL3 ($\rho=0,719$; $p=0,008$ Sperman's rho test) i granično pozitivna korelacija između DVL2 i DVL3 ($\rho=0,574$; $p=0,051$ Sperman's rho test). Negativna korelacija između SFRP i DVL nije dokazana u istraživanoj skupini LGSC tumora. (Tablica 16)

Tablica 16 - Spermanov korelacijski test za LGSC skupinu tumora

LGSC		DVL1	DVL2	DVL3
SFRP1	rho test (ρ)	0,603	0,426	0,719
	p vrijednsot	0,038	0,167	0,008
SFRP3	rho test (ρ)	0,235	0,155	0,382
	p vrijednsot	0,462	0,630	0,221
DVL2	rho test (ρ)			0,574
	p vrijednsot			0,051

5.4 Klinički podatci i odnos prema ekspresiji proteina

Za evaluaciju utjecaja analiziranih proteina na kliničke varijable upotrijebljena je univarijatna analiza. Analizom smo utvrdili prognostičke faktore bitne za ukupno preživljenje (OS) i za period bez bolesti (PFS). U multivarijatnu analizu uključili smo sve značajnosti do $p=0,1$. (Tablica 17, Tablica 18, Tablica 19)

Prognostički faktori bitni za ukupno preživljenje (OS) u HGSC skupini tumora su godine kod postavljanja dijagnoze bolesti, prije 65 godina ili nakon 65 godina ($p=0,003$; log Rank test), FIGO grupa (lokalizirana nasuprot uznapredovalo bolesti) ($p=0,046$; log Rank test), ali i ekspresija proteina DVL3 koja je pokazala trend prema signifikantnosti ($p=0,081$; log Rank test). (Tablica 17)

Multivarijatnom analizom pokazali smo da su godine postavljanja dijagnoze neovisan prognostički pokazatelj za ukupno preživljenje (HR 3,406; 95% CI 1,580-7,341; $p=0,002$) kao i ekspresija DVL3 proteina (HR 0,462; 95% CI 0,225-0,952; $p=0,036$). FIGO stadij također pokazuje trend prema signifikantnom prognostičkom faktoru (HR 2,947; 95% CI 0,886-9,808; $p=0,078$). (Tablica 17)

Univarijatnom analizom perioda bez bolesti (PFS) u HGSC skupini izdvojeni su prognostički faktori: godine kod postavljanja dijagnoze, prije 65 godina ili nakon 65 godina ($p=0,010$; log Rank test), FIGO stadij bolesti, lokalizirana nasuprot uznapredovala bolest ($p=0,010$; log Rank test) te pojava recidiva bolesti ($p=0,001$; log Rank test). (Tablica 18)

Multivarijatnom analizom potvrdili smo sva 3 prognostička pokazatelja; godine dijagnoze (HR 2,482; 95% CI (1,175 – 5,244); $p=0,017$); FIGO stadij (HR 4,210; 95% CI 1,259-14,071; $p=0,020$) te pojava recidiva bolesti (HR 3,070; 95% CI 1,275-7,393; $p=0,012$). (Tablica 18)

S obzirom na to kako u LGSC skupini nije zabilježen recidiv bolesti (bilo klinički, bilo laboratorijski) skupa su analizirani i ukupno preživljenje kao i period bez bolesti. Bitni prognostički faktori su također godina kod dijagnoze bolesti (prije ili nakon 65 godina) ($p=0,050$; log Rank test), FIGO grupa (lokalizirana nasuprot uznapredovala) ($p=0,004$; log Rank test) te prisustvo abdominalnog kirurga na primarnoj operaciji ($p=0,010$; log Rank test). (Tablica 19)

Multivarijatnom analizom nismo potvrdili nezavisne prognostičke faktore za LGSC skupinu bolesnica. (Tablica 19)

Tablica 17 - Univarijatna i multivarijatna analiza za HGSC – **OS** (ukupno preživljenje), Vrijednosti su iskazane brojčano (n), postotkom (%); medijan u godinama, p vrijednost univarijatne analize log Rank testom, HR – od engl. - hazard ratio)

Klinički parametar	Univarijatna analiza			Multivarijatna analiza	
	N(%)	Medijan (godina)	p vrijednost	HR(95% CI)	p vrijednost
Godine dijagnoze					
< 65	27 (67,50%)	4,830	0,003	3,406 (1,580 - 7,341)	0,002
≥ 65	13 (32,50%)	2,090			
Gradus tumora					
G2	9 (22,50%)	3,748	0,781		
G3	31 (77,50%)	3,840			
FIGO stadij					
I + II	6 (15,00%)	6,345	0,046	2,947 (0,886 - 9,808)	0,078
III + IV	34 (85,00%)	3,390			
Recidiv bolesti					
Da	27 (67,50%)	3,840	0,308		
Ne	13 (32,50%)	2,890			
Abd. kirurg na op.					
Da	16 (40,00 %)	4,120	0,533		
Ne	24 (60,00%)	3,390			
SFRP1					
< 10 %	27 (67,50 %)	3,390	0,332		
≥ 10 %	13 (32,50 %)	4,120			
SFRP3					
< 10 %	14 (35,00 %)	3,840	0,364		
≥ 10 %	26 (65,00 %)	3,748			
DVL1					
< 10 %	30 (75,00 %)	3,810	0,903		
≥ 10 %	10 (25,00 %)	2,970			
DVL2					
< 10 %	12 (30,00 %)	4,830	0,896		
≥ 10 %	28 (70,00 %)	3,390			
DVL3					
< 10 %	16 (40,00 %)	2,890	0,081	0,462 (0,225 - 0,952)	0,036
≥ 10 %	24 (60,00%)	4,120			

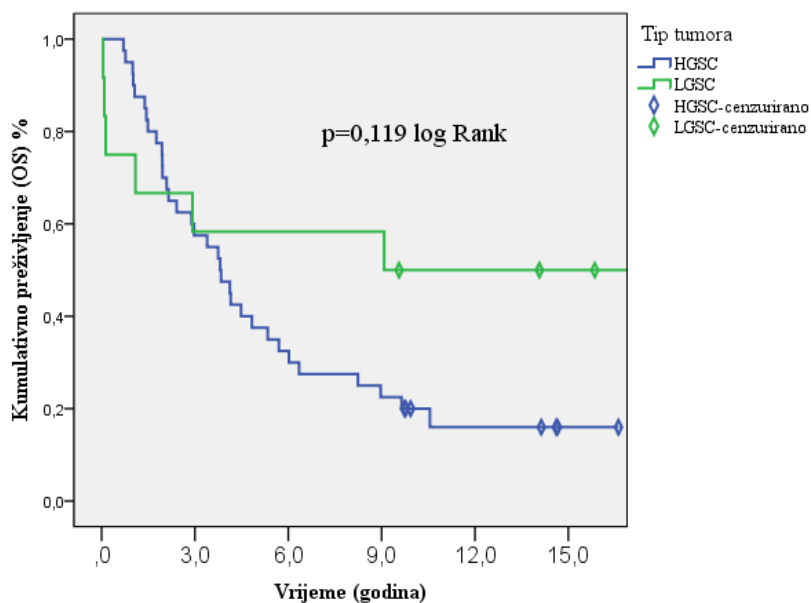
*Tablica 18 - Univarijatna i multivarijatna analiza za HGSC – **PFS** (period bez pojave bolesti)
Vrijednosti su iskazane brojčano (n), postotkom (%); medijan u godinama, p vrijednost univarijatne analize log Rank testom, HR – od engl. - hazard ratio)*

Klinički parametar	Univarijatna analiza			Multivarijatna analiza	
	N(%)	Medijan (godina)	p vrijednost	HR(95% CI)	p vrijednost
Godine dijagnoze					
< 65	27 (67,50%)	1,780	0,010	2,482 (1,175 – 5,244)	0,017
≥ 65	13 (32,50%)	0,820			
Gradus tumora					
G2	9 (22,50%)	1,323	0,686		
G3	31 (77,50%)	1,620			
FIGO stadij					
I + II	6 (15,00%)	3,001	0,010	4,210 (1,259 – 14,071)	0,020
III + IV	34 (85,00%)	1,090			
Recidiv bolesti					
Da	27 (67,50%)	1,090	0,001	3,070 (1,275 – 7,393)	0,012
Ne	13 (32,50%)	2,890			
Abd. kirurg na op.					
Da	16 (40,00 %)	1,323	0,534		
Ne	24 (60,00%)	1,460			
SFRP1					
< 10 %	27 (67,50 %)	1,620	0,413		
≥ 10 %	13 (32,50 %)	1,323			
SFRP3					
< 10 %	14 (35,00 %)	2,070	0,363		
≥ 10 %	26 (65,00 %)	1,130			
DVL1					
< 10 %	30 (75,00 %)	1,490	0,421		
≥ 10 %	10 (25,00 %)	0,700			
DVL2					
< 10 %	12 (30,00 %)	1,780	0,959		
≥ 10 %	28 (70,00 %)	1,090			
DVL3					
< 10 %	16 (40,00 %)	1,000	0,321		
≥ 10 %	24 (60,00%)	1,490			

Tablica 19 - Univarijatna i multivarijatna analiza za LGSC – OS i PFS. Vrijednosti su iskazane brojčano (n), postotkom (%); medijan u godinama, p vrijednost univarijatne analize log Rank testom, HR – od engl. - hazard ratio); *procijenjeno preživljenje nikad nije doseglo 50%, X nema usporedbe

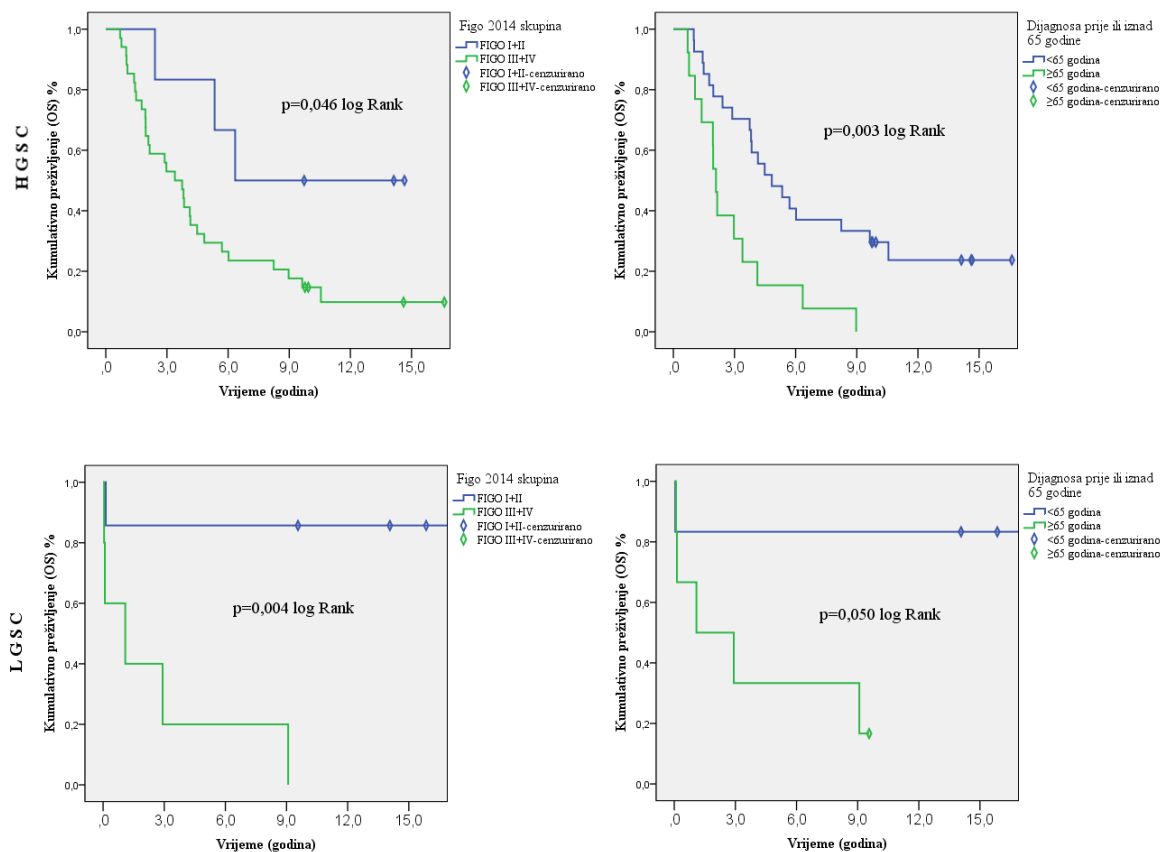
Klinički parametar	Univarijatna analiza			Multivarijatna analiza	
	N(%)	Medijan (godina)	P vrijednost	HR(95% CI)	P vrijednost
Godine dijagnoze					
< 65	6 (50%)	*			
≥ 65	6 (50%)	1,090	0,050	0,308 (0,014 - 6,902)	0,458
Gradus tumora					
G1	8 (66,67%)	*			
G2	4 (33,33%)	2,920	0,333		
FIGO stadij					
I + II	7 (58,33%)	*			
III + IV	5 (41,67%)	1,090	0,004	10,255 (0,855 – 123,044)	0,066
Recidiv bolesti					
Da	0				
Ne	12 (100 %)	X	X		
Abd. kirurg na op.					
Da	6 (50,00 %)	0,130			
Ne	6 (50,00 %)	*	0,010	8,842 (0,643 - 121,588)	0,103
SFRP1					
< 10 %	6 (50,00 %)	9,080			
≥ 10 %	6 (50,00 %)	1,090	0,865		
SFRP3					
< 10 %	4 (33,33 %)	2,920			
≥ 10 %	8 (66,67%)	*	0,497		
DVL1					
< 10 %	6 (50,00 %)	*			
≥ 10 %	6 (50,00 %)	1,090	0,248		
DVL2					
< 10 %	2 (16,67 %)	9,080			
≥ 10 %	10 (83,33 %)	2,920	0,761		
DVL3					
< 10 %	4 (33,33 %)	2,920			
≥ 10 %	8 (66,67%)	*	0,333		

Između 52 pacijentice koje su uključene u istraživanje, po završetku istraživanja u HGSC skupini, imali smo 17% živih ispitanica, dok je u LGSC skupini ukupno preživljenje iznosilo 50% ($p=0,119$ log Rank test). (Slika 10, Tablica 4) Ukupno preživljenje u našoj disertaciji nije dostiglo razinu statističke značajnosti s obzirom na relativno mali uzorak LGSC skupine, ali svakako pokazuje pravilni trend.



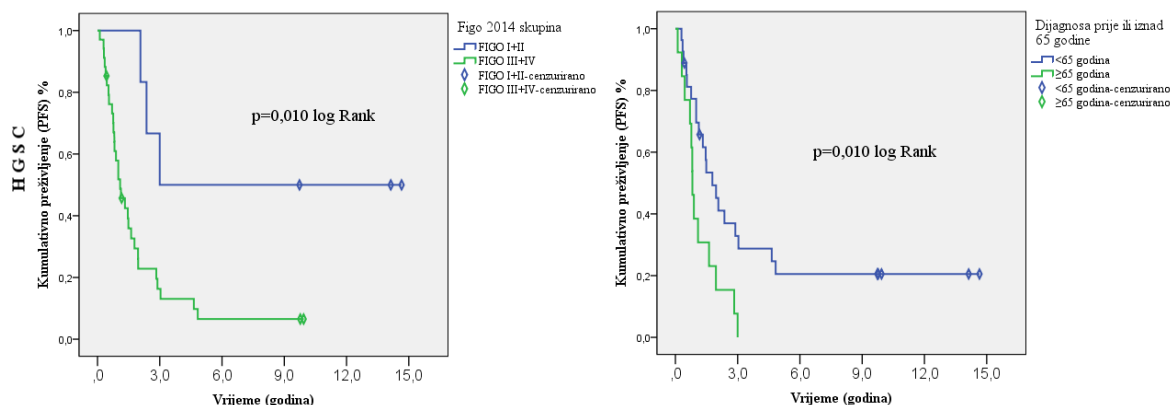
Slika 10 – Kaplan Meier krivulja ukupnog preživljenja (OS) između HGSC i LGSC skupine pacijentica.

U disertaciji smo potvrdili činjenicu da ukupno preživljenje bolesnica oboljelih od seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti uvelike ovisi o rasprostranjenosti bolesti prilikom postavljanja dijagnoze, tako da je i ukupno preživljenje statistički značajno bolje u skupini s dijagnosticiranom lokaliziranom bolesti (FIGO I i II) nasuprot postavljanju dijagnoze u uznapredovalim stadijima bolesti (FIGO III i IV) (HGSC $p=0,046$ log Rank; LGSC $p=0,004$ log Rank). (Slika 11) Drugi prognostički faktor bitan za ukupno preživljenje bolesti je svakako dob kod postavljanja dijagnoze gdje je iz Kaplan-Meier krivulja vidljivo da je bolest dijagnosticirana prije 65 godina prognostički povoljniji faktor (HGSC $p=0,003$ log Rank; LGSC $p=0,050$ log Rank). (Slika 11)



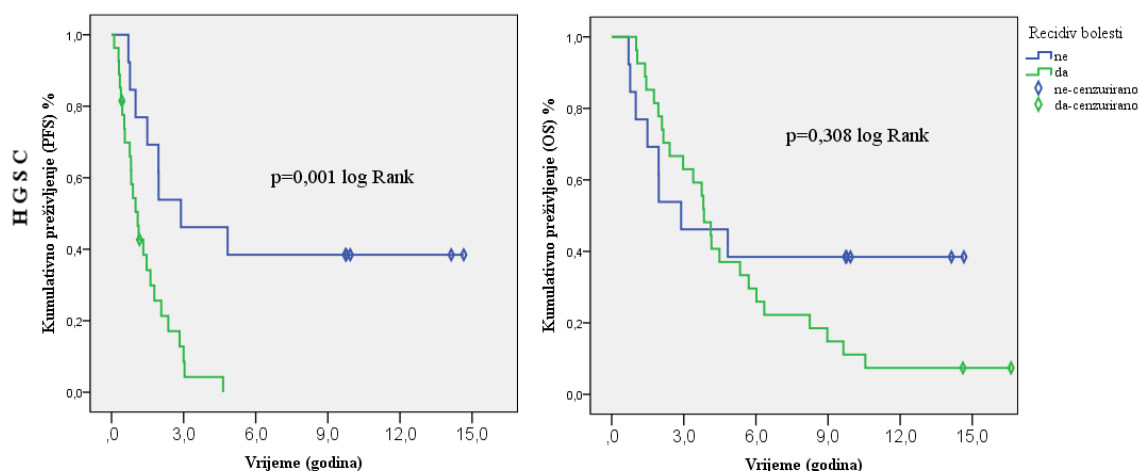
Slika 11 - Prognostički faktori, FIGO stadij (lijevi grafikoni) i dob kod postavljanja dijagnoze (desni grafikoni), te njihov utjecaj na ukupno preživljenje (OS) u HGSC i LGSC skupini.

Iz analize krivulja preživljenja vezane uz period bez bolesti (PFS) potvrdili smo statistički značajnije preživljenje u bolesnicima s lokaliziranom bolesti (FIGO I+II) u odnosu na bolesnice s uznapredovalom bolesti FIGO (III+IV) ($p=0,010$ log Rank test) kao i za bolesnice mlađe od 65 godina ($p=0,010$ log Rank test). (Slika 12)



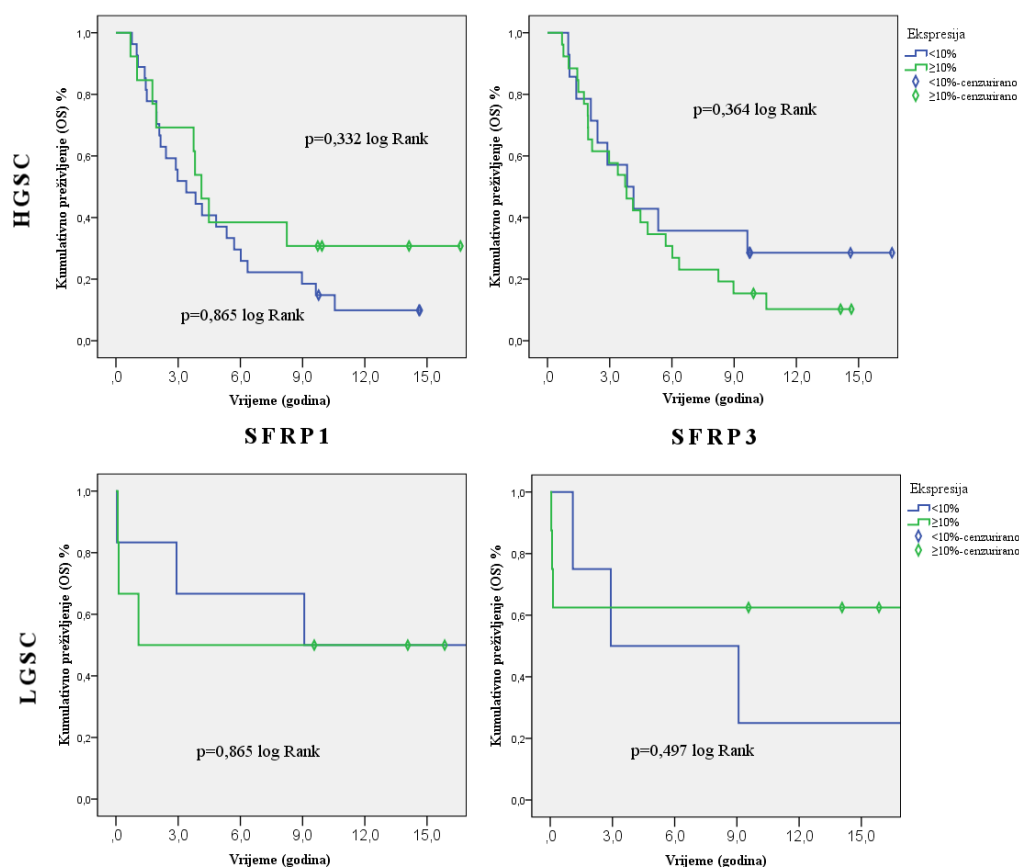
Slika 12 – Prognostički faktori, FIGO stadij i dob kod postavljanja dijagnoze, te njihov utjecaj na preživljenje bez pojave bolesti (PFS) u HGSC skupini. LGSC nije analizirana jer nismo zabilježili recidiv bolesti.

Univarijatna analiza istaknula je dodatni prognostički faktor u HGSC skupini tumora, a to je pojava recidiva bolesti koji direktno djeluje na ukupni PFS ($p=0,001$ log Rank) dok nismo dokazali statističku značajnost na ukupno preživljenje (OS) ($p=0,308$ log Rank test), ali trend krivulje svakako govori u prilog dosadašnjim saznanjima. (Slika 13)

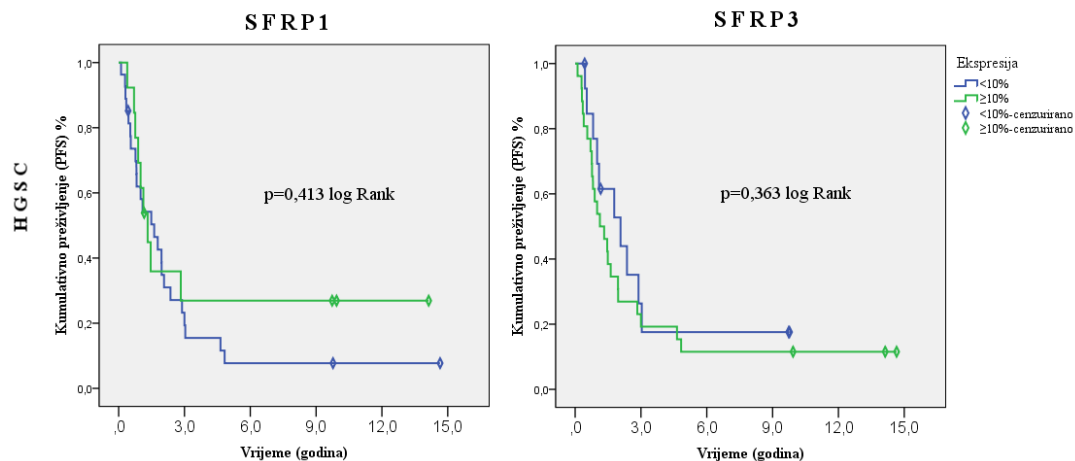


Slika 13 – Kaplan Meier krivulje preživljenja bez bolesti (PFS) i ukupnog preživljenja (OS) za HGSC skupinu u odnosu na prognostički faktor, pojavu recidiva bolesti.

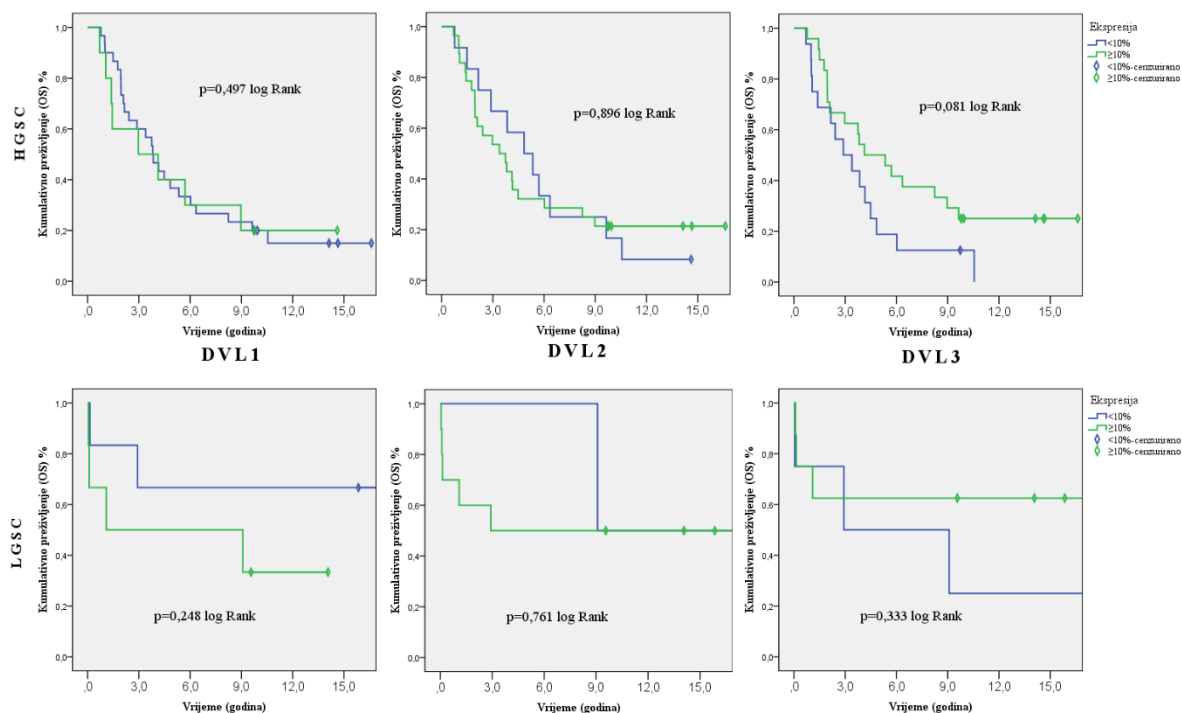
Usporedbom kliničkih podataka, ukupnog preživljenja (OS) i perioda bez pojave bolesti (PFS) s ekspresijom istraživanih proteina, nismo dokazali statistički značajnu razliku između pojedine ekspresije i utjecaja na preživljenje. (Slika 14, Slika 15, Slika 16, Slika 17)



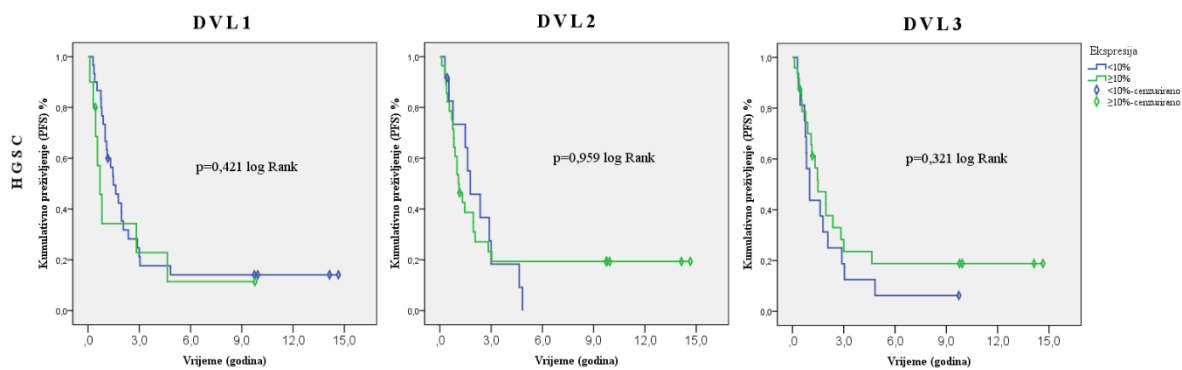
Slika 14 – Kaplan Meier krivulje ukupnog preživljenja (OS) u odnosu na grupu ekspresije proteina SFRP1 i SFRP3 (grupa 1 <10%; grupa 2 ≥10%).



Slika 15 - Kaplan Meier krivulje preživljena bez bolesti (PFS) za HGSC u odnosu na grupu ekspresije proteina SFRP1 i SFRP3 (grupa 1 <10%; grupa 2 ≥10%). LGSC grupa nije iskazana, obzirom da nije bilo zabilježenog recidiva (bilo kliničkog bilo laboratorijskog) bolesti, tako da je izgled krivulje isti kao i kod OS krivulje.



Slika 16 - Kaplan Meier krivulje ukupnog preživljena (OS) u odnosu na grupu ekspresije proteina DVL1, DVL2 i DVL3 (grupa 1 <10%; grupa 2 ≥10%).



Slika 17 - Kaplan Meier krivulje preživljenja bez pojave bolesti (PFS) u odnosu na grupu ekspresije proteina DVL1, DVL2 i DVL3 (grupa 1 <10%; grupa 2 ≥10%). LGSC grupa nije iskazana, obzirom da nije bilo zabilježenog recidiva (bilo kliničkog bilo laboratorijskog) bolesti, tako da je izgled krivulje isti kao i kod OS krivulje.

6 RASPRAVA

Doktorskom disertacijom istraživali smo ekspresiju pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti. Serozni karcinom jajnika je sve veći javnozdravstveni problem te zauzima prvo mjesto po smrtnosti od svih ginekološki tumora (21). Incidencija malignih bolesti jajnika raste s dobi pacijentica, s medijanom u 63. godini kada više od 2/3 pacijentica ima uznapredovali oblik bolesti i lošiju prognozu (22).

Trenutni postupak liječenja karcinoma jajnika uključuje radikalno kirurško i kemoterapijsko liječenje kojim se zapravo uklanja posljedica, a ne liječi se uzrok nastanka bolesti. Modaliteti liječenja su skupi, a rezultati se nisu značajno popravili zadnjih 50 godina. Zbog toga je bitno uvođenje novih modaliteta liječenja s osvrtnom na razumijevanje molekularne patogeneze karcinoma jajnika. Pristup bi trebalo temeljiti s posebnim naglaskom na prevenciju i testove probira, jer to su metode koje su do sada pokazale uspješne rezultate, poput cjepiva za zarazne bolesti, promjenom životnih navika za prevenciju kardiovaskularnih bolesti te programe probira i cjepiva za prevenciju cervikalnog karcinoma. Metode su jeftine, provodljive i puno uspješnije nego metode liječenja potvrđene bolesti.

6.1 Negativni regulatori signalnog puta Wnt

6.1.1 SFRP1

Rezultate ekspresije proteina SFRP1 i ekspresije gena *SFRP1* u kohorti seroznog karcinoma jajnika visokog (HGSC) i niskog (LGSC) stupnja malignosti komparirali smo sa zdravim tkivom jajnika. Protein SFRP1, koji pripada obitelji SFRP inhibitora proteina signalnog puta Wnt, ima dokazanu tumor supresorsku aktivnost u većini do sada analiziranih tumora i jedini je pripadnik SFRP obitelji koji ima konzistentno nisku ekspresiju u brojnim karcinomima (223) poput karcinoma prostate, debelog crijeva, bubrega, pluća, intrahepatalnog kolangiokarcinoma, hepatocelularnog karcinoma i testikularnog tumora spolnih stanica (283-287). Protein SFRP3, kao i SFRP2 i SFRP 4 mogu ostati nepromijenjeni u tkivu tumora, ili biti čak i povišeni što bi nam govorilo da ne slijede obrazac utišavanja ekspresije poput SFRP1 (223).

Ekspresija gena *SFRP1* među ostalim načinima, regulirana je i metilacijom DNA koja je pojačana u brojnim tumorima i tumorskim staničnim linijama prema trenutno dostupnim istraživanjima (288).

Naši rezultati pokazuju da zdravo tkivo jajnika zadržava ekspresiju SFRP1 proteina uz nemetiliran gen *SFRP1*. Očekivano, više od 50% testiranih HGSC uzoraka pokazuje metilaciju promotora gena *SFRP1* uz posljedični gubitak ekspresije istoimenog proteina. Naši rezultati slažu se s ranije objavljenim rezultatima dobivenima na staničnim linijama karcinoma jajnika (231). Takada i suradnici su dokazali da dodatkom demetilacijskog agensa 5-aza-2'-deoksicitidina rezultira demetilacijom promotora te posljedičnom re-ekspresijom proteina SFRP1. Ostali testirani HGSC uzorci nisu pokazivali metilaciju gena *SFRP1* što bi mogli objasniti postojanjem drugih epigenetskih mehanizama regulacije njihove ekspresije. U slučaju SFRP1 govorili bi o trimetilaciji na lizinu 27 u histonu H3 (H3K27me3), posttranslacijskoj histonskoj modifikaciji povezanoj s utišavanjem transkripcije (289).

Navedenim mehanizmom bi također mogli objasniti i sniženu ekspresiju proteina SFRP1 u LGSC i HGSC u usporedbi sa zdravim tkivom jajnika. Gen *SFRP1* je u većini testiranih uzoraka bio nemetiliran. Niska ekspresija gena uz istovremeni izostanak metilacije u grupi LGSC tumora može se objasniti akumulacijom mutacija u tumorima, pogotovo u vidu trenutno važeće hipoteze da se LGSC tumori razvijaju iz prekursorskih lezija postepenom akumulacijom mutacija za razliku od HGSC tumora koji najčešće nastaju iz „*de novo*“ mutacija (88). Manjak statistički značajne razlike ekspresije proteina SFRP1 između HGSC i LGSC skupine uzroka može biti posljedica testiranja malenog uzorka što je i glavno ograničenje ovog istraživanja.

Potrebno je istaknuti da postoje i drugi mehanizmi koji mogu pridonijeti stišavanju gena *SFRP1* (posljedično i ekspresiji proteina SFRP1) poput brojnih miRNAs. Naime, istraživanje Wu i suradnika (290) je pokazalo da u stanicama karcinoma jajnika, miR-27a igra vitalnu ulogu u poticanju fenotipa koji nalikuje matičnim stanicama i to tako da djeluje protivno različitim komponentama signalnog puta Wnt uključujući i SFRP1 protein. Slični su mehanizmi zamijećeni i u drugim podtipovima karcinoma, poput karcinoma pankreasa, želuca, dojke i oralnog karcinoma (287, 290-292)

U zaključku, ekspresija SFRP1 proteina je snižena u grupi HGSC tumora što se može povezati s hipermetilacijom promotora gena *SFRP1* dok je za smanjenu ekspresiju SFRP1 u LGSC skupini tumora odgovoran neki drugi genetski i epigenetski mehanizam. Dobiveni rezultati

ukazuju da su za rasvjetljavanje kliničke i terapijske značajnosti promatranih promjena neophodne daljnje studije na većem broju uzoraka i uz dodatne molekularno-biološke metode.

6.1.2 SFRP3

Protein SFRP3 je do sada slabije istražen dio signalnog puta Wnt. Pripada obitelji pet izvanstaničnih proteina čije je obilježje da imaju sekvencu homolognu s *Frizzled* receptorom čime su prepoznati kao antagonisti liganda Wnt, a posljedično tome i kao blokatori signalnog puta Wnt. Poremećaj pridruženih Wnt puteva ključni je događaj razvoja mnogih karcinoma.

Dosadašnja istraživanja dokazala su ulogu proteina SFRP3 u fiziološkim procesima poput formiranja kosti, ali je također dokazano da sudjeluju u formiranju, razvoju i progresiji raznih tumora. Međutim još uvijek postoji kontroverzan stav oko uloge SFRP3 u tumorigenezi. Hirata i suradnici su opisali onkogeni potencijal SFRP3 gdje je njegova pojačana ekspresija u testovima „*in vitro*“ vodila porastu broja staničnih kolonija i pojave invazije kao i rastu i formiranju stanica u „*in vivo*“ uvjetima (293).

S druge strane, u hepatocelularnom karcinomu, gdje je SFRP3 utišan hipermetilacijom promotorske regije i prvog egzona, ponaša se kao tumor supresor. Protein SFRP3 smanjuje rast, invaziju stanica kao i formiranje kolonija u karcinomu želuca i prostate putem aktivacije degradacijskog kompleksa i redukcije unutarstaničnog β -katenina te posljedično smanjivanja TCF aktivnosti (294, 295).

Smanjena mRNA ekspresija u melanomu, primarnom karcinomu bubrega te u karcinomu pluća nemalih stanica, potvrđena je i u genskom atlasu raka (TCGA) gdje je protein SFRP3 reduciran tijekom progresije tumora (296).

Ekspresija proteina SFRP3 nije do sada istražena u seroznom karcinomu jajnika kao ni i u normalnom tkivu jajnika. Stoga smo u sklopu izrade doktorske disertacije ispitali imunohistokemijsku ekspresiju proteina SFRP3.

Protein SFRP3 u skupini HGSC tumora eksprimiran je u 65% slučajeva (22,5% ima ekspresiju veću od 50%, dok 42,5% uzoraka ima ekspresiju između 10 i 50%) dok je ekspresija proteina SFRP1 u više od 50% slučajeva utišana. U komparaciji sa zdravim tkivom jajnika koje je imalo uniformno pozitivnu ekspresiju (ekspresija u svim uzorcima je bila veća od 50%), ekspresija proteina SFRP3 je bila statistički značajno manja nego u kontrolnoj skupini, zdravom tkivu jajnika, ali je bila statistički značajno viša nego ekspresija proteina SFRP1.

Ekspresija proteina SFRP3 u LGSC skupini je bila statistički značajno manja nego u kontrolnom, zdravom tkivu jajnika, ali nije dokazana statistički značajni razlika između SFRP1 i SFRP3.

Prema našim saznanjima, do sada nije bilo istraživanja koje je uspoređivalo ekspresiju proteina SFRP3 u seroznim karcinomima jajnika. Razlozi utišavanja ekspresije proteina svakako će biti tema nekih narednih istraživanja. Prema dosadašnjim istraživanjima, utišana ekspresija SFRP3 u drugim karcinomima posljedica je hipermetilacije regije promotora kao u hepatocelularnom karcinomu, karcinomu bubrega i mokraćnog mjehura, malignom mezoteliomu, meduloblastomu, melanomu, osteosarkomu i kroničnoj limfocitnoj leukemiji (297-299).

Naši rezultati pokazuju utišanu ekspresiju SFRP 3 u seroznom karcinomu jajnika i visokog i niskog stupnja malignosti u odnosu na zdravo tkivo jajnika čime možemo zaključiti da se SFRP3 također ponaša kao tumor supresor djelujući izravno na signalni put Wnt.

6.2 Pozitivni regulatori signalnog puta Wnt

6.2.1 DVL1, DVL2, DVL3

U seroznom karcinomu jajnika visokog i niskog stupnja malignosti istraživali smo ekspresiju proteina iz skupine Dishevelled koji se smatraju centralnim citoplazmatskim medijatorima u prijenosu signala signalnog puta Wnt. Kanonski put signalnog puta Wnt dokazano je aktivan u embrionalnim i matičnim stanicama odraslog organizma, ali je progresivno utišan u diferenciranim stanicama. Signalni put Wnt aktivan je i tijekom tumorigeneze u procesima proliferacije i migracije stanica (248). Poremećaj regulacije signalnog puta Wnt do sada je potvrđen u kolorektalnom karcinomu (300) melanomu (301), hepatoblastomu (256), adenokarcinomu prostate (302), karcinomu uterusa (303), te karcinomu jajnika (14, 15, 285, 304).

Aktivnost signalnog puta Wnt potiče vezanje Wnt liganda na *Frizzled* receptor inducirajući fosforilaciju obitelji DVL proteina koji tada mogu aktivirati signalne proteine bitne za proliferaciju i preživljenje stanice (254). Evidentno je da sva tri homologa DVL proteina igraju centralnu ulogu u širenju signalnog puta Wnt utječući na razne procese staničnog razvoja, služeći kao glavni integrator kompleksnih signala (249).

Dosadašnjim istraživanjima potvrđena je ekspresija proteina DVL u karcinomu pluća nemalih stanica (NSCLC – *engl. Non-small-cell lung carcinoma*) (263), kolorektalnom karcinomu

(305), karcinomu dojke (306), prostate (257) i cerviksa (259). Istraživanja upućuju da povećavanje kao i pojačana ekspresija gena za *DVL* aktivno sudjeluje u razvoju dijela humanih karcinoma i to preko promjene signalnog puta Wnt.

Takva saznanja su nam od posebnog značaja za proučavanje i planiranje novih terapijskih mogućnosti u liječenju malignih bolesti s obzirom na to da znamo da je aktivacija kateninskog signalnog puta Wnt povezana s rezistencijom na platinu u nekoliko „in vivo“ i „in vitro“ modela te da se ciljanom inhibicijom β -katenina snažno senzibiliziraju tumorske stanice na cisplatinu (307). Vrlo česti razvoj rezistencije na paklitaksel (orig. Taxol), jedan od kemoterapeutika prve linije korišten u liječenju raznih karcinoma, a među kojima je i karcinom jajnika (308, 309), predstavlja veliku prepreku uspješnom liječenju (310, 311).

Preliminarni podatci pokazuju prekomjernu ekspresiju proteina DVL1 u paklitaksel rezistentnim staničnim linijama dobivenim iz stanica karcinoma jajnika. Korištenjem DVL1 specifičnog inhibitora, utišava se ekspresija proteina DVL1, te se vraća osjetljivost staničnoj liniji (A2780/Taxol) na paklitaksel pri tome pružajući novu strategiju kemosenzitacije karcinoma jajnika na citotoksičnost izazvanu paklitakselom (272).

Naši rezultati prikazani u doktoratu za sada su prvi rezultati u kojima smo istraživali sva tri DVL proteina, DVL1, DVL2 i DVL3 u stanicama karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti kao i u staničnim linijama karcinoma jajnika (OVCAR5, OVCAR8 i OVSAHO). Prema dopunjenom i revidiranom modelu, dvojne kancerogeneze jajnika (30, 67, 108, 129) odlučili smo usporediti obrazac ekspresije DVL proteina u tumorskom tkivu te ga usporediti s urednim tkivom jajnika i s urednim epitelom jajovoda.

Obradom podataka dobili smo statistički značajno veću ekspresiju proteina DVL1 i DVL3 u LGSC tumorima u usporedbi sa zdravim tkivom jajnika i urednim epitelom jajovoda. Obradom HGSC uzoraka dokazali smo da je statistički značajnija ekspresiju proteina DVL3 u komparaciji sa zdravim tkivom jajnika i granično signifikantna u odnosu na uredan epitel jajovoda. Ekspresija proteina DVL2 i DVL3 je bila viša u svim staničnim linijama karcinoma jajnika u usporedbi sa staničnom linijom FNE1 kontrole, dok je ekspresija mRNA za DVL1, DVL2 i DVL3 statistički značajno bila veća jedino u OVASHO staničnoj liniji. Razlike u razini mRNA gena *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* te njihove proteinske ekspresije mogle bi biti posljedica post-translacijske regulacije DVL proteina. Sharma i suradnici (249) proveli su TCGA (*engl. The Cancer Genome Atlas*) analizu ekspresije DVL1, DVL2 i DVL3 u glioblastomima i karcinomima pluća, dojke i jetre, te pokazali da u većini tih tumora ne postoji disregulacija u

ekspresiji DVL mRNA, čak i kada je postojala razlika na razini proteina. Ova diskrepancija između ekspresije mRNA i proteina zabilježena je i u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva i dojke (312).

Uzimajući u obzir dosadašnja istraživanja, naši rezultati upućuju da su proteini DVL1 i DVL3 aktivno involvirani u patogenezu LGSC tumora, a DVL3 protein u patogenezu HGSC tumora. Naši su rezultati u suglasnosti s ranijim istraživanjima u kojima je nađena povećana ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 kod pacijenata s kroničnom limfatičnom leukemijom pri čemu je ekspresija DVL1 i DVL3 proteina bila značajno izraženija u progresivnom obliku bolesti nego u blažim oblicima (313). Također, DVL1 i DVL3 pridonose invaziji stanica putem aktivacije kanonskog i nekanonskog signalnog puta Wnt u karcinomu pluća nemalih stanica (264). Naši rezultati ukazuju da promijenjena ekspresija proteina DVL1 i DVL3 u seroznom karcinomu jajnika može utjecati na signalnu kaskadu Wnt te na invazivni potencijal malignih stanica. Iz skupa podataka Genomskog atlasa raka (*engl. The Cancer Genome Atlas, TCGA*), klaster analizom (*engl. cluster analysis*) genske ekspresije u tumorima jajnika utvrđena je promijenjena ekspresija komponenti signalnog puta Wnt/ β -katenin u tumorima s lošom prognozom što također upućuje na moguću regulatornu ulogu signalnog puta Wnt/ β -katenin u tumorima jajnika (314). Nekolicina drugih studija izvijestila je o povezanosti lošeg kliničkog ishoda u pacijentica s izmijenjenim komponentama β -kateninskog signalnog puta Wnt u HGSC skupini (314-316). Rezultati dobiveni izradom ove doktorske disertacije potkrepljuju ulogu pojedinih komponenti signalnog puta Wnt poput proteina DVL u promociji tumorigeneze seroznog karcinoma jajnika.

Važno je naglasiti ulogu proteina DVL u regulaciji ekspresije aromataza i produkcije estrogena s obzirom na to da su ini zaduženi za proliferaciju i rast stanica. Castro-Piedras i suradnici izvijestili su o novoj vezi između DVL proteina i njihove uloge kao regulatora transkripcije aromataznih promotora. Pokazali su da DVL1 i DVL3 imaju različite uloge u regulaciji gena *CYP19A1*, koji kodira za aromatazu. Naime, dok je redukcija ekspresije gena *DVL3* smanjila razinu ukupnih transkripata aromataze u MCF7 stanicama, redukcija ekspresije gena *DVL1* dovela je do povećane razine ekspresije ukupnih transkripata aromataze u istim stanicama (317).

Njihovo istraživanje je u skladu s našim rezultatima gdje smo evidentirali prekomjernu ekspresiju DVL3 proteina u HGSC i LGSC tumorima što upućuje na mogućnost da je DVL3

odgovoran za regulaciju lokalne aromataze, a koja može promovirati proliferaciju kao i invazivnost tumorskih stanica.

U zaključku, izradom disertacije prikazali smo aktivnu ulogu proteina DVL u patogenezi seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti. Potrebno je provoditi daljnja istraživanja kako bi se potvrdila klinička važnost uočenih promjena.

6.3 Usporedba ekspresije pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika (visokog i niskog stupnja malignosti)

Dobiveni rezultati ukazuju da postoji negativna (recipročna) korelacija između negativnih (SFRP1, SFRP3) i pozitivnih (DVL1) regulatora signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti, ali s obzirom na maleni uzorak razlika nije statistički značajna. Dokazali smo statistički značajnu pozitivnu korelaciju između SFRP1 nasuprot DVL2 i DVL3 u HGSC uzorcima.

U seroznim karcinomima jajnika niskog stupnja malignosti nije dokazan negativna, recipročna korelacija između pozitivnih i negativnih regulatora signalnog puta Wnt. Dokazan je statistički značajna pozitivna korelacija između pozitivnih (DVL1, DVL3) i negativnih (SFRP1) regulatora signalnog puta Wnt.

Naši rezultati su u suglasnosti s ranijim istraživanjima drugih znanstvenika koji su proučavali aktivnost signalnog puta Wnt u tumorskom tkivu. Mi smo potvrdili da postoji smanjena ekspresija negativnih regulatora signalnog puta Wnt (SFRP1, SFRP3), čime smo još jednom dokazali njihovu tumor supresorsku ulogu, a također smo potvrdili i povišenu aktivnost pozitivnih regulatora signalnog puta Wnt (DVL1, DVL2, DVL3) u tkivu seroznog karcinoma jajnika (222, 224, 225, 229-238, 255, 257-264). Izostanak negativne korelacije u našem istraživanju možemo pripisati relativno malenom uzorku.

Wu i suradnici su istraživali odnos inhibitora Wnt signalnog puta SFRP2 i aktivaciju Wnt kanonskog signalnog puta, mjereći akumulaciju β -katenin i prekomjernu ekspresiju proteina DVL3, c-Myc i ciklin D1(318). Njihovi rezultati ukazuju na postojanje negativne korelacije između ispitivanih skupina što su dobile i druge znanstvene skupine (320,321).

6.4 Ekspresija proteina i klinički pokazatelji

Srednja dob pacijentica s dijagnosticiranim seroznim karcinomom visokog stupnja malignosti odgovara podacima koji se mogu naći u literaturi (22), dok je dob pacijentica s dijagnosticiranim seroznim karcinomom jajnika niskog stupnja malignosti postavljena u nešto starijih žena u usporedni sa ženama operiranim od HGSC što nije u skladu s dosadašnjim saznanjima o pojavi LGSCa (88). To bi se moglo objasniti relativno malenim brojem uzoraka u LGSC skupini pacijentica.

Podjela tumora po stupnju diferencijacije odgovara dosadašnjim saznanjima da su HGSC tumori prvenstveno loše diferencirani dok su LGSC tumori prvenstveno dobro diferencirani tumori (85).

Prema trenutno važećoj FIGO klasifikaciji tumora pacijentice oboljele od HGSCa su više od 2/3 slučajeva dijagnosticirane u uznapredovaloj fazi bolesti i s recidivom bolesti unutar 1,5 godine (131) dok su pacijentice oboljele od LGSC tumora prvenstveno dijagnosticirane u početnim fazama bolesti, a recidiv bolesti nismo zabilježili (85). Ukupno 5 godišnje preživljenje za HGSC skupinu odgovara svjetskom prosjeku i iznosi 37,50% dok nam je preživljenje u LGSC skupini bilo niže od svjetskog prosjeka, s 58,33% [svjetski prosjek pet godišnjeg preživljenja LGSC tumora iznosi oko 85%; (96, 97, 131)]. Naši podatci potvrdili su bolje preživljenje LGSC skupine pacijentica u odnosu na HGSC skupinu, iako razlika nije statistički značajna. Razlog leži u tome da smo u skupini LGSC tumora imali 3 pacijentice (25%) s vrlo nepovoljnim postoperativnom tijekom i da se radi o relativno malenom broju pacijentica u LGSC grupi. Potvrdili smo dosadašnju činjenicu da je statistički značajnije ukupno preživljenje povoljnije u lokaliziranim oblicima bolesti u obje skupine tumora kao i da je mlađa dob prilikom postavljanja dijagnoze prognostički povoljniji čimbenik (96, 97, 131, 132).

Multivarijatnom analizom omjera ugroženosti (HR – *engl. Hazard ratio*) u HGSC skupini tumora potvrdili smo da su godine dijagnoze signifikantan prognostički faktor. Analizom naših podataka također smo dobili zanimljiv podatak da je veća ekspresija proteina DVL3 pokazana kao signifikantan prognostički faktor u HGSC skupini bolesnica ($p=0,036$). Ekspresija ostalih istraživanih proteina nije pokazala utjecaj na ukupno preživljenje (OS) kao ni na period života bez bolesti (PFS) i u HGSC i u LGSC skupini tumora. Ranijim istraživanjem Liu i suradnika dokazano je da je razina ekspresije proteina DVL2 bila udružena s ukupnim preživljenjem pacijentica s karcinomom jajnika (309), ali uz napomenu da su također obrađivali relativno

maleni uzorak. Razliku u rezultatima treba sagledati iz perspektive korištenja relativno malenog uzorka u oba istraživanja za pacijentice oboljele od karcinoma jajnika, a i time da studija Liu i suradnika nije razvrstavala serozni karcinom u dvije skupine, niskog i visokog stupnja malignosti. S druge strane LGSC tumori predstavljaju svega 5% svih seroznih karcinoma jajnika (87).

Komparirajući naše rezultate s rezultatima atlasa humanih proteina (*engl. human protein atlas*), a koja obrađuje distribuciju proteina u normalnim i karcinomskim stanicama, u njihovoj bazi podataka nije dokazana statistički značajan razlika ukupnog preživljenja u odnosu na ekspresiju proteina DVL3 u tkivu seroznog karcinoma jajnika ($p=0,25$) (319). Kaplan Meier krivulje ukupnog preživljenja (na 374 obrađena slučaja) pokazivale su isti trend kao i naše krivulje preživljenja, ali multivarijatnom analizom nisu dokazali prognostički faktor niti jednog DVL proteina kao niti analiziranih SFRP proteina. Rezultate je također potvrdio i program GEPIA, novi interaktivni web server za analizu ekspresije RNA sekvenci korištenjem projekta TCGA i GTEx (320).

Promatrajući ekspresiju proteina SFRP1 i SFRP3 nismo dokazali poveznicu između ekspresije proteina s ukupnim preživljenjem (OS), FIGO stadijem ili vremenom bez pojave recidiva bolesti (PFS).

7 ZAKLJUČAK

Analizirajući pozitivne i negativne regulatore signalnog puta Wnt u tkivu seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti došli smo do sljedećih zaključaka.

1. Ekspresija SFRP1 je statistički značajno manja i u HGSC i u LGSC uzorcima u usporedbi sa zdravim tkivom jajnika
2. U zdravom tkivu jajnika postoji ekspresija proteina SFRP1, a promotor gena *SFRP1* je nemetiliran.
3. Uzrok smanjene ekspresije proteina SFRP1 u grupi HGSC tumora je DNA metilacija promotora gena *SFRP1*.
4. Ekspresija proteina SFRP3 je statistički značajno manja i u HGSC i u LGSC uzorcima u usporedbi sa zdravim tkivom jajnika.
5. Ekspresija SFRP1 je statistički značajno manja od ekspresije SFRP3 u HGSC skupini tumora.
6. Ekspresija proteina DVL1 i DVL3 statistički je značajno veća u LGSC skupini tumora nego u kontrolnim zdravim uzorcima jajnika i urednom epitelu jajovoda.
7. Ekspresija DVL3 statistički je značajno veća u HGSC skupini tumora nego u kontrolnom zdravom tkivu jajnika, a granično je veća u odnosu na uredan epitel jajovoda.
8. Ekspresija proteina DVL2 i DVL3 je bila viša u staničnim linijama karcinoma jajnika u usporedbi sa staničnom linijom FNE1 kontrole.
9. Ekspresija mRNA za *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* je značajno veća u OVASHO staničnoj liniji.
10. Dokazana je aktivna uloga proteina DVL u patogenezi seroznog karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti
11. Dokazana je statistički značajna pozitivna korelaciju između SFRP1 nasuprot DVL2 i DVL3 u HGSC skupini tumora.
12. Dokazana je statistički značajna pozitivna korelacija SFRP1 nasuprot DVL1 i DVL3 u LGSC skupini tumora.

8 SAŽETAK

Uvod: Maligni epitelni tumori jajnika najsmrtonosniji su ginekološki tumori koji se, u najvećem broju slučajeva, dijagnosticiraju u uznapređovalom stadiju bolesti s lošom prognoznom preživljenja. Smrtnost od raka jajnika u razvijenom svijetu je u laganom padu, međutim taj pad je znatno sporiji od pada njegove incidencije. Još uvijek ne postoji učinkovita metoda primarnoga probira bolesnica, kao ni osjetljiva klinička ili laboratorijska dijagnostika ranoga stadija bolesti. U ovoj disertaciji obrađivane su komponente signalnog puta Wnt; SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 i DVL3. Aberantna aktivacija ovog signalnog puta dokazana je u brojnim tumorima.

Materijal i metode: Provedeno je retrospektivno istraživanje na arhiviranim uzorcima seroznih karcinoma jajnika (52) prikupljenih u KB Merkur između 2000. i 2012. godine. Ekspresija proteina u tumorskom tkivu uspoređivana je s ekspresijom proteina u urednom tkivu jajnika (9) i/ili jajovoda (5) prikupljenih prilikom operativnih zahvata zbog neke druge nemaligne ginekološke bolesti. Provedena je imunohistokemijska analiza ekspresije proteina SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 i DVL3 signalnog puta Wnt, te je određena njihova međusobna korelacija i korelacija s kliničkim parametrima bolesti. DNA je izolirana iz zdravog i tumorskog tkiva, nakon čega je analizirana metilacija DNA u promotorima gena *SFRP1* uz pomoć PCR-a ovisnog o metilaciji. Ekspresija proteina DVL1, DVL2 i DVL3 analizirana je i na staničnim linijama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti i na normalnim imortaliziranim epitelnim stanicama jajovoda uz pomoć Western blot-a.

Rezultati: Disertacijom smo dokazali statistički značajno manju ekspresiju proteina SFRP1 i SFRP3 u tumorskom tkivu. Uzrok smanjene ekspresije proteina SFRP1 u HGSC skupini tumora je metilacija promotora gena *SFRP1*. Ekspresija proteina DVL1 i DVL3 statistički je značajno veća u LGSC skupini tumora nego u kontrolnim zdravim uzorcima jajnika i jajovoda, dok je ekspresija proteina DVL3 statistički značajno veća u HGSC skupini tumora nego u kontrolnom zdravom tkivu jajnika. Ekspresija proteina DVL2 i DVL3 je bila viša u staničnim linijama karcinoma jajnika u usporedbi sa staničnom linijom FNE1 kontrole. mRNA za *DVL1*, *DVL2* i *DVL3* je značajno veća u OVASHO staničnoj liniji.

Zaključak: Dokazali smo da je ekspresija proteina SFRP1 smanjena u većini HGSC tumora te da je smanjena ekspresija ovog proteina posljedica metilacije promotora gena *SFRP1*. Protein SFRP1 i SFRP3 dokazano djeluju kao tumor supresori u seroznom karcinomu jajnika visokog i niskog stupnja malignosti. Naši rezultati također upućuju i na aktivnu ulogu proteina iz obitelji Dishevelled u seroznim karcinomima jajnika.

9 SUMMARY

Expression of Wnt signaling pathway proteins SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 and DVL3 in serous ovarian cancer

Introduction: Ovarian cancer is the most lethal gynaecologic malignancy usually diagnosed in the advanced stage with a poor prognosis. The mortality rate is slightly declining but much slower than its incidence. We still do not have an effective primary screening method nor is there a sensitive clinical or laboratory test for detecting ovarian cancer in its early stage. In this study, we explored the components of the Wnt signalling pathway, SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 and DVL3. Their aberrant activation has been proven in many other tumors.

Materials and methods: We performed a retrospective study on archived samples of serous ovarian cancer (52) collected at the University hospital Merkur between 2000 and 2012. Protein expression in tumor specimen was compared with protein expression in normal ovarian tissue (9) and/or fallopian tube (5) collected during surgery for other non-malignant gynaecological diseases. We explored SFRP1, SFRP3, DVL1, DVL2 and DVL3 protein expression using immunohistochemistry, their mutual correlation and correlation with clinical parameters of the disease. DNA was isolated from healthy and tumor tissue and *SFRP1* gene methylation was analysed by methylation-specific PCR. The expression of DVL1, DVL2 and DVL3 proteins was analysed both on serous ovarian carcinoma cell lines as well as on TERT-immortalised epithelial fallopian tube using Western blot.

Results: We statistically demonstrated lower protein expression of SFRP1 and SFRP3 in tumor tissue. Loss of SFRP1 protein expression was caused by the SFRP1 promoter hypermethylation in a subset of HGSC. DVL1 and DVL3 protein expression was statistically higher in LGSC compared to normal ovaries and fallopian tubes, while DVL3 was statistically higher in HGSC compared to normal ovaries. DVL2 and DVL3 protein expression was higher in HGSC cell lines when compared with normal control cell line FNE1. DVL1, DVL2 and DVL3 mRNA expression was significantly increased only in OVASHO cell line.

Conclusion: We have shown that the SFRP1 protein was silenced in most HGSC tumors and the silencing was due to methylation of *SFRP1* gene promoter. SFRP1 and SFRP3 protein have been shown to act as tumor suppressors in both, high and low grade, serous ovarian carcinoma. Our data show an active involvement of Dishevelled family proteins in serous ovarian carcinomas.

10 POPIS LITERATURE

1. Caldas C. Molecular assessment of cancer. *BMJ*. 1998;316(7141):1360-3.
2. Brody J, Rudel R. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect*. 2003;111(8):1007-19.
3. Palmirotta R, Silvestris E, D'Oronzio S, Cardascia A, Silvestris F. Ovarian cancer: Novel molecular aspects for clinical assessment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;117:12-29.
4. Jönsson J, Johansson I, Dominguez-Valentin M, Kimbung S, Jönsson M, Bonde J, i sur. Molecular subtyping of serous ovarian tumors reveals multiple connections to intrinsic breast cancer subtypes. *PLoS One*. 2014;9(9):e107643.
5. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO*. 2012;31:2670–84.
6. Kinzler K, Nilbert M, Su L, i sur. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991;253:661-5.
7. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, i sur. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 1991;253:665-9.
8. Giles R, van Es J, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653(1):1-24.
9. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, i sur. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*. 2000;24:245-50.
10. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon A. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 1999;397:405-9.
11. Parr B, McMahon A. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*. 1998;395:707-10.
12. Ricken A, Lochhead P, Kontogiannina M, Farookhi R. Wnt Signaling in the Ovary: Identification and Compartmentalized Expression of wnt-2, wnt-2b, and Frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology*. 2002;143(7):2741-49.
13. Arend R, Londoño-Joshi A, Straughn Jr J, Buchsbaum D. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecol Oncol*. 2013;131(3):772-9.
14. Saegusa M, Okayasu I. Frequent nuclear β -catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *J Pathol*. 2001;194(1):59-67.
15. Wu R, Zhai Y, Fearon E, Cho K. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2001;61:8247-55.
16. Wang Y, Hewitt S, Liu S, Zhou X, Zhu H, Zhou C, i sur. Tissue microarray analysis of human FRAT1 expression and its correlation with the subcellular localisation of β -catenin in ovarian tumours. *Br J Cancer*. 2006;94:686-91.
17. Lee C, Shvartsman H, Deavers M, Wang S, Xia W, Schmandt R, i sur. beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2003;88(3):363-8.
18. Gatliffe T, Monk B, Planutis K, Holcombe R. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18:954-62.
19. Boyer A, Lapointe E, Zheng X, Cowan R, Li H, Quirk S, i sur. Wnt4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEBJ*. 2010;24:3010-25.
20. Yoshioka S, King M, Ran S, Okuda H, MacLean J, McAsey M, i sur. Wnt7A Regulates Tumor Growth and Progression in Ovarian Cancer through the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Mol Cancer Res*. 2012;10:469-82.

21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):294-424.
22. National cancer institute. Surveillance, Epidemiology and end results program. *Cancer Stat Facts: Ovarian Cancer* 2020.
23. Sekerija M, Bubanović L, Novak P, Veltruski J, Glibo M, Stavinoha M, i sur. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017.
24. Reid B, Permuth J, Sellers T. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017;9-32.
25. Mok S, Kwong J, Welch W, Samimi G, Ozbun L, Bonome T, i sur. Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Dis Markers.* 2007;23(5-6):367-76.
26. Landen Jr C, Birrer M, Sood A. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(6):995-1005.
27. Tortolero L, Mitchell M. The epidemiology of ovarian cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1995;23:200-7.
28. Schildkraut J, Schwingl P, Bastos E, Evanoff A, Hughes C. Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 1996;88(4):554-9.
29. Kuroda H, Mandai M, Konishi I, i sur. Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor-1. *Int J Cancer.* 2001;91(3):309-15.
30. Kurman R, Shih I. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol.* 2016;186(4):733-47.
31. Haller H, Matković V, i sur. Što morate znati o raku jajnika. Zagreb: Hrvatska liga protiv raka; 2015.
32. Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer C. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet.* 2012;103:1122-9.
33. Olsen C, Green A, Whiteman D, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb P. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2007;43:690-709.
34. Cannioto R, LaMonte M, Risch H, Hong C, Sucheston-Campbell L, Eng K, i sur. Chronic recreational physical inactivity and epithelial ovarian cancer risk: evidence from the ovarian cancer association consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25:1114-24.
35. Langseth H, Hankinson S, Siemiatycki J, Weiderpass E. Perineal use of talc and risk of ovarian cancer. *J Epidemiol Commun Health.* 2008;62:358-60.
36. Agency for Research on Cancer I. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 1987.
37. Kolahdooz F, van der Pols J, Bain C, Marks G, Hughes M, Whiteman D, i sur. Meat, fish, and ovarian cancer risk: results from 2 Australian case-control studies, a systematic review, and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1752-63.
38. Wallin A, Orsini N, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of ovarian cancer: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer.* 2011;104:1196-201.
39. Gilsing A, Weijenberg M, Goldbohm R, van den Brandt P, Schouten L. Consumption of dietary fat and meat and risk of ovarian cancer in the Netherlands Cohort Study. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:118-26.

40. Komatsu T, Konishi I, Mandai M, i sur. Peritoneal papillary serous carcinoma arising in an infertile woman during ovulation-induction therapy: immunohistochemici surxpression of LH/hCG receptors. *Gynecol Oncol.* 1995;56(3):470-4.
41. Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, i sur. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(1):37-43.
42. Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Fujii S. LH/hCG action and development of ovarian cancer—a short review on biological and clinical/epidemiological aspects. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;269(1-2):61-4.
43. Gong T, Wu Q, Vogtmann E, Lin B, Wang Y, ,,. Age at menarche and risk of ovarian cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2013;132:2894-900.
44. Gates M, Rosner B, Hecht J, Tworoger S. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. *Am J Epidemiol.* 2010;171:45-53.
45. Sayasneh A, Tsivos D, Crawford R. Endometriosis and ovarian cancer: a systematic review. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011;2011:140310.
46. Wentzensen N, Poole E, Trabert B, White E, Arslan A, Patel A, i sur. Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the ovarian cancer cohort consortium. *J Clin Oncol.* 2016;34:2888-98.
47. Merritt M, De Pari M, Vitonis A, Titus L, Cramer D, Terry K. Reproductive characteristics in relation to ovarian cancer risk by histologic pathways. *Hum Reprod.* 2013;28:1406-17.
48. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis I, Domchek S, Eccles D, Nevanlinna H, i sur. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifi ers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21:134-47.
49. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. Ovary: Epithelial tumors. 2003. web: <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/OvaryEpithTumID5230.html>
50. King M, Marks J, Mandell J, Group NYBCS. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 2003;302(5645):631-6.
51. Pennington K, Swisher E. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol.* 2012;124(2):347-53.
52. Pal T, Permuth-Wey J, Betts J, Krischer J, Fiorica J, Arango H, i sur. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer.* 2005;104(12):2807-16.
53. Piver M. Hereditary ovarian cancer. Lessons from the first twenty years of the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry. *Gynecol Oncol.* 2002;85(1):9-17.
54. Koornstra J, M, MJ, Sijmons R, Leliveld A, Hollema H, Kleibeuker J. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):400-8.
55. Barrow E, Robinson L, Alduaij W, Shenton A, Clancy T, Lalloo F, i sur. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet.* 2009;75(2):141-9.
56. Crijnen T, Janssen-Heijnen M, Gelderblom H, all. e. Survival of patients with ovarian cancer due to a mismatch repair defect. *Fam Cancer.* 2005;4:301.
57. Watson P, Bützow R, Lynch H, Mecklin J, Järvinen H, Vasen H, i sur. The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol.* 2001;82(2):223-8.
58. Wu M, Whittemore A, Paffenbarger RJ, Sarles D, Kampert J, Grosser S, i sur. Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer. I. Reproductive and menstrui survents and oral contraceptive use. *Am J Epidemiol.* 1988;128:1216-27.
59. Kvåle G, Heuch I, Nilssen S, Beral V. Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study. *Int J Cancer.* 1988;42:246-51.

60. Joly D, Lilienfeld A, Diamond E, Bross I. An epidemiologic study of the relationship of reproductive experience to cancer of the ovary. *Am J Epidemiol.* 1974;99:190-209.
61. Hartge P, Schiffman M, Hoover R, McGowan L, Leshner L, Norris H. A case-control study of epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:10-6.
62. Nasca P, Greenwald P, Chorost S, Richart R, Caputo T. An epidemiologic case-control study of ovarian cancer and reproductive factors. *Am J Epidemiol.* 1984;119:705-13.
63. Whittemore A, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol.* 1992;136:1184-203.
64. Risch H, Marrett L, Howe G. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 1994;140:585-97.
65. La Vecchia C, Franceschi S. Oral contraceptives and ovarian cancer. *Eur J Cancer Prev.* 1999;8:297-304.
66. Ricciardelli C, Oehler M. Diverse molecular pathways in ovarian cancer and their clinical significance. *Maturitas.* 2009;62(3):270-5.
67. Kurman R, Carcangiu M, Herrington C, i sur. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth edition. In WHO Classification of Tumours. Lyon: WHO Press; 2014.
68. Shih I, Kurman R. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American Journal of Pathology.* 2004;164(5):1511-8.
69. Landen CJ, Birrer M, Sood A. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(6):995-1005.
70. Seidman J, Cho K, R, BM, Kurman R. Surface epithelial tumors of the ovary. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract ed 6.* New York: Springer Verlag; 2011. p. 679–784.
71. Ardighieri L, Zeppernick F, Hannibal C, Vang R, Cope L, Junge J, i sur. Mutational analysis of BRAF and KRAS in ovarian serous borderline (atypical proliferative) tumours and associated peritoneal implants. *J Pathol.* 2014;232:16-22.
72. Dehari R, Kurman R, Logani S, Shih I. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:1007-12.
73. Tsang Y, Deavers M, Sun C, Kwan S, Kuo E, Malpica A, i sur. KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumour are associated with recurrent low-grade serous carcinoma. *J Pathol.* 2013;231:449-56.
74. Grisham R, Iyer G, Garg K, DeLair D, Hyman D, Zhou Q, i sur. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer.* 2013;119:548-54.
75. Wong K, Tsang Y, Deavers M, Mok S, Zu Z, Sun C, i sur. BRAF mutation is rare in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinomas. *Am J Pathol.* 2010;177:1611-7.
76. Maniar K, Wang Y, Visvanathan K, Shih I, Kurman R. Evaluation of microinvasion and lymph node involvement in ovarian serous borderline/atypical proliferative serous tumors: a morphologic and immunohistochemical analysis of 37 cases. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:743-55.
77. Singer G, Oldt III R, Cohen Y. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(6):484-6.

78. Kuo K, Guan B, Y F, i sur. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res.* 2009;49(9):4036-42.
79. Haas C, Diebold J, Hirschmann A, Rohrbach H, Löhrs U. In serous ovarian neoplasms the frequency of Ki-ras mutations correlates with their malignant potential. *Virchows Archiv.* 1999;434(2):117-20.
80. Seiben N, Macropoulos P, Roemen G, i sur. In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours,. *J Pathol.* 2004;202(3):336-40.
81. Mayr D, Hirschmann A, Löhrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecologic Oncology.* 2006;103(3):883-7.
82. Sieben N, Macropoulos P, Roemen G, Kolkman-Uljee S, Jan Fleuren G, Houmadi R, i sur. In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol.* 2004;202:336-40.
83. Jones S, Wang T, Kurman R, Nakayama K, Velculescu V, Vogelstein B, i sur. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol.* 2012;226:413-20.
84. Sheu J, Guan B, Tsai F, Hsiao E, Chen C, Seruca R, i sur. Mutant BRAF induces DNA strand breaks, activates DNA damage response pathway, and up-regulates glucose transporter-1 in nontransformed epithelial cells. *Am J Pathol.* 2014;232:16-22.
85. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int.* 2014;2014:934261.
86. Köbel M, Kalloger S, Huntsman D, Santos J, Swenerton K, Seidman J, i sur. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2010;29:203-11.
87. Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chin J Cancer.* 2015;34(1):50-5.
88. Vang R, Shih I, Kurman R. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol.* 2009;16:267-82.
89. Malpica A, Deavers M, Lu K, Bodurka D, Atkinson E, Gershenson D, i sur. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:496-504.
90. Malpica A, Deavers M, Tornos C, Kurman R, Soslow R, Seidman J, i sur. Interobserver and intraobserver variability of a two-tier system for grading ovarian serous carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:1168-74.
91. Escobar J K, AC, Dean M, Chu P, Nation J, Nelson G, Ghatage P, i sur. Quantification of ER/PR expression in ovarian low-grade serous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2013;128:371-6.
92. Altman A, Nelson G, Ghatage P, McIntyre J, Capper D, Chu P, i sur. The diagnostic utility of *TP53* and *CDKN2A* to distinguish ovarian high-grade serous carcinoma from low-grade serous ovarian tumors. *Mod Pathol.* 2013;26:1255-63.
93. Jones S, Wang T, Kurman R, i sur. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol.* 2012;226(3):413-20.
94. Boyd J, Luo B, Peri S i sur. Whole exome sequence analysis of serous borderline tumors of the ovary. *Gynecol Oncol.* 2013;130(3):560.
95. Network TCGA. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474(7353):609-15.
96. Coleman R, Lu K, Sood A, Deavers M, Malpica A, Kavanagh J. Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant. *Gynecol Oncol.* 2009;114:48-52.

97. Heintz A, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet J, Creasman W, i sur. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83(1):135-66.
98. Crispens M, Bodurka D, Deavers M, Lu K, Silva E, Gershenson D. Response and survival in patients with progressive or recurrent serous ovarian tumors of low malignant potential. *Obstet Gynecol.* 2002;99:3-10.
99. Bristow R, Puri I, Chi D. Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2009;112:265-74.
100. Gershenson D, Sun C, Lu K, Coleman R, Sood A, Malpica A, i sur. Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol.* 2006;108:361-8.
101. Soslow R, Han G, Park K, Garg K, Olvera N, Spriggs D, i sur. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25:625-36.
102. Howitt B, Hanamornroongruang S, Lin D, Conner J, Schulte S, Horowitz N, i sur. Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:287-93.
103. Kobel M, Kalloger L, S, Duggan M, Kelemen L, Prentice L, Kalli K, i sur. Ovarian Tumor Tissue Analysis Consortium Biomarker-based ovarian carcinoma typing: a histologic investigation in the ovarian tumor tissue analysis consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22:1677-86.
104. Silva E, Robey-Cafferty S, Smith T, Gershenson D. Ovarian carcinomas with transitional cell carcinoma pattern. *Am J Clin Pathol.* 1990;93:457-65.
105. Network CGAR. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474:609-15.
106. Patch A, Christie E, Etemadmoghadam D, Garsed D, George J, Fereday S. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature.* 2015;521:489-94.
107. Piek J, Van Diest P, Zweemer R, i sur. Dysplastic changes in prophylactically removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol.* 2001;195(4):451-6.
108. Piek J, Verheijen R, Kenemans P, Massuger L, Bulten H, Van Diest P. BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecologic Oncology.* 2003;90(2):491.
109. Piek J, van Diest P, Zweemer R, Kenemans P, Verheijen R. Tubal ligation and risk of ovarian cancer. *Lancet.* 2001;358:844.
110. Medeiros F, Muto M, Lee Y, Elvin J, Callahan M, Feltmate C, i sur. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:230-6.
111. Powell B, Kenley E, Chen L, i sur. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA mutation carriers: role of serial sectioning in the detection of occult malignancy. *J Clin Oncol.* 2005;23(1):127-32.
112. Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod S, Colgan T. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol.* 2006;100(1):58-64.
113. Kindelberger D, Lee Y, Miron A, i sur. "Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(2):161-9.
114. Callahan M, Crum C, Medeiros F, i sur. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin Oncol.* 2007;25(25):3985-90.
115. Przybycin C, Kurman R, Ronnett B, Shih I, Vang R. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol.* 2010;34(10):1407-16.

- 116.Kuhn E, Meeker A, Wang T, Sehdev A, Kurman R, Shih I. Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(6):829-36.
- 117.Kuhn E, Kurman R, Vang R, Sehdev A, Han G, Soslow R, i sur. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma-evidence supporting their clonal relationship. *J Pathol.* 2012;226:421–6.
- 118.Espinosa I, Catasus L, Canet B, D'Angelo E, M, J, P, J. Gene expression analysis identifies two groups of ovarian high-grade serous carcinomas with different prognosis. *Mod Pathol.* 2011;24:846-54.
- 119.Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893-917.
- 120.Hunn J, Rodriguez G. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol.* 2012;55:3-23.
- 121.Pelucchi C, Galeone C, Talamini R, Bosetti C, Montella M, Negri E, i sur. Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:83-7.
- 122.Permuth-Wey J, Sellers T. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol.* 2009;472:413-37.
- 123.Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet.* 2008;371:303-14.
- 124.Goff B, Mandel L, Melancon C, Muntz H. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA.* 2004;291:2705-12.
- 125.Zivanovic O, Sima S, Iasonos A, Bell-McGuinn K, Sabbatini P, Leitao M, i sur. Exploratory analysis of serum CA-125 response to surgery and the risk of relapse in patients with FIGO stage IIIC ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;115:209-2014.
- 126.Koshiyama M, Konishi I, Mandai M, i sur. Immunohistochemical analysis of p53 protein and 72 kDa heat shock protein (HSP72) expression in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology and sex steroid receptor status. *Virchows Archiv.* 1995;425(6):603-9.
- 127.Santin A, Zhan F, Bellone S, i sur. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer.* 2004;112(1):14-25.
- 128.Salani R, Kurman R, Giuntoli R, i sur. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(3):487-91.
- 129.Cho K, Shih I. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:287-313.
- 130.Christie M, Oehler M. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc.* 2006;12(2):57-63.
- 131.Bookman M. First-line chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol.* 2012;55:96-113.
- 132.Eisenkop S, Spirtos N, Lin W. Optimal” cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer: a commentary. *Gynecol Oncol.* 2006;103:329-35.
- 133.Clarke B, Tinker A, Lee C, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, i sur. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol.* 2012;22:393-402.
- 134.Bolton K, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus S, Karlan B, i sur. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012;307:382-90.

135. Prat J, Oncology FCoG. FIGO Guidelines. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*. 2014;124(1):1-5.
136. Amin M, Edge S, Greene F, Byrd D, Brookland R, et al. American Joint Committee on Cancer. Ovary, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Carcinoma. *AJCC Cancer Staging Manual*. 2017;8:689-98.
137. Kobel M, Madore J, Ramus SC, BA, Pharoah P, Deen S. Evidence for a time-dependent association between FOLR1 expression and survival from ovarian carcinoma: implications for clinical testing. An Ovarian Tumour Tissue Analysis consortium study. *Br J Cancer*. 2014;111:2297-307.
138. Goff B, Mandel L, Drescher C, Urban N, Gough S, Schurman K, et al. Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer*. 2007;109(2):221-7.
139. Andersen M, Goff B, Lowe K, Scholler N, Bergan L, Drescher C, et al. Combining a symptoms index with CA 125 to improve detection of ovarian cancer. *Cancer*. 2008;113(3):484-9.
140. College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice A. Committee Opinion No. 477: the role of the obstetrician-gynecologist in the early detection of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2011;117(3):742-6.
141. Clarke-Pearson D. Clinical practice. Screening for ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(2):170-7.
142. Smith R, Manassaram-Baptiste D, Brooks D, Doroshenk M, Fedewa S, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2015: a review of current American cancer society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):30-54.
143. Horvath G, Andersson H, Nemes S. Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: a retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward. *BMC Cancer*. 2013;13:396.
144. Elliker K, Sommerville B, Broom D, Neal D, Armstrong S, Williams H. Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC Urol*. 2014;14:22.
145. Menon U, Griffin M, Gentry-Maharaj A. Ovarian cancer screening--current status, future directions. *Gynecol Oncol*. 2014;132(2):490-5.
146. Sharma A, Apostolidou S, Burnell M, Campbell S, Habib M, Gentry-Maharaj A, et al. Risk of epithelial ovarian cancer in asymptomatic women with ultrasound-detected ovarian masses: a prospective cohort study within the UK collaborative trial of ovarian cancer screening (UKCTOCS). *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;40(3):338-44.
147. Jacobs I, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi J, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10022):945-56.
148. Menon U, Gentry-Maharaj A, Hallett R, Ryan A, Burnell M, Sharma A, et al. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet*. 2009;40(4):327-40.
149. SS B, Partridge E, Black A, Johnson C, Lamerato L, Isaacs C, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2011;305(22):2295-303.
150. Partridge E, Kreimer A, Greenlee R, Williams C, Xu J, Church T, et al. Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstet Gynecol*. 2009;113(4):775-82.

151. Pinsky P, Zhu C, Skates S, Black A, Partridge E, Buys S, i sur. Potential effect of the risk of ovarian cancer algorithm (ROCA) on the mortality outcome of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) trial. *Int J Cancer*. 2013;132(9):2127-33.
152. Valenti L, Jurkovic D, Van Calster B, Testa A, Van Holsbeke C, Bourne T, i sur. Adding a single CA 125 measurement to ultrasound imaging performed by an experienced examiner does not improve preoperative discrimination between benign and malignant adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009;34(3):345-54.
153. College of Obstetricians and Gynecologists A. ACOG Practice Bulletin. Management of adnexal masses. *Obstet Gynecol*. 2007;110(1):201-14.
154. Harris R, Javitt M, Glanc P, Brown D, Dubinsky T, Harisinghani M, i sur. ACR Appropriateness Criteria® clinically suspected adnexal mass. *Ultrasound Q*. 2013;29(1):79-86.
155. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, Einhorn N, Sevelde P, i sur. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet*. 2001;357(9251):176-82.
156. Romagnolo C, Leon A, Fabricio A, Taborelli M, Polesel J, Del Pup L, i sur. HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2):303-11.
157. Schorge J, Eisenhauer E, Chi D. Current surgical management of ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26(1):93-109.
158. Schlaerth A, Chi D, Poynor E, Barakat R, Brown C. Long-term survival after fertility-sparing surgery for epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(7):1199-204.
159. Wright J, Shah M, Mathew L, Burke W, Culhane J, Goldman N, i sur. Fertility preservation in young women with epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 2009;115(18):4118-26.
160. Gershenson D. Treatment of ovarian cancer in young women. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55(1):65-74.
161. Covens A, Dodge J, Lacchetti C, Elit L, Le T, Devries-Aboud M, i sur. Surgical management of a suspicious adnexal mass: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2012;126(1):149-56.
162. EL E, Abu-Rustum N, Sonoda Y, Levine D, Poynor E, Aghajanian C, i sur. The addition of extensive upper abdominal surgery to achieve optimal cytoreduction improves survival in patients with stages IIIC-IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):1083-90.
163. Chi D, Eisenhauer E, Zivanovic O, Sonoda Y, Abu-Rustum N, Levine D, i sur. Improved progression-free and overall survival in advanced ovarian cancer as a result of a change in surgical paradigm. *Gynecol Oncol*. 2009;114(1):26-31.
164. Wimberger P, Lehmann N, Kimmig R, Burges A, Meier W, Du Bois A, i sur. Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. *Gynecol Oncol*. 2007;106(1):69-74.
165. Fader A, Rose P. Role of surgery in ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(20):2873-83.
166. Schorge J, Garrett L, Goodman A. Cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer: quo vadis? *Oncology (Williston Park)*. 2011;25(10):928-34.
167. Chang S, Bristow R. Evolution of surgical treatment paradigms for advanced-stage ovarian cancer: redefining 'optimal' residual disease. *Gynecol Oncol*. 2012;125(2):483-92.
168. du Bois A, Reuss A, Harter P, de-Lauraine E, Ray-Coquard I, Pfisterer J, i sur. Potential role of lymphadenectomy in advanced ovarian cancer: a combined exploratory analysis of

- three prospectively randomized phase III multicenter trials. *J Clin Oncol.* 2010;28(10):1733-9.
169. Wright A, Bohlke K, Armstrong D, Bookman M, Cliby W, Coleman R, i sur. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Gynecol Oncol.* 2016;134(1):3-15.
 170. Van Meurs H, Tajik P, Hof M, Vergote I, Kenter G, Mol B, i sur. Which patients benefit most from primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in stage IIIC or IV ovarian cancer? An exploratory analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 55971 randomised trial. *Eur J Cancer.* 2013;49(15):3191-201.
 171. Gadducci A, Cosio S, Zizioli V, Notaro S, Tana R, Panattoni A, i sur. Patterns of Recurrence and Clinical Outcome of Patients With Stage IIIC to Stage IV Epithelial Ovarian Cancer in Complete Response After Primary Debulking Surgery Plus Chemotherapy or Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Interval Debulking Surgery. *Int J Gynecol Cancer.* 2017;27(1):28-36.
 172. Chi D, Bristow R, Armstrong D, Karlan B. Is the easier way ever the better way? *J Clin Oncol.* 2011;29(31):4073-5.
 173. van der Burg M, van Lent M, Buyse M, Kobierska A, Colombo N, Favalli G, i sur. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med.* 1995;332(10):629-34.
 174. Landrum L, Java J, Mathews C, Lanneau GJ, Copeland L, Armstrong D, i sur. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer treated with intraperitoneal chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2013;130(1):12-8.
 175. Provencher D, Gallagher C, Parulekar W, Ledermann J, Armstrong D, Brundage M, i sur. OV21/PETROC: a randomized Gynecologic Cancer Intergroup phase II study of intraperitoneal versus intravenous chemotherapy following neoadjuvant chemotherapy and optimal debulking surgery in epithelial ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(2):431-8.
 176. Bookman M, Brady M, McGuire W, Harper P, Alberts D, Friedlander M, i sur. Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *J Clin Oncol.* 2009;27(9):1419-25.
 177. Pignata S, Scambia G, Ferrandina G, Savarese A, Sorio R, Breda E, i sur. Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: the MITO-2 randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(27):3628-35.
 178. Pignata S, Scambia G, Katsaros D, Gallo C, P-L, E5, De. Placido S, i sur. Carboplatin plus paclitaxel once a week versus every 3 weeks in patients with advanced ovarian cancer (MITO-7): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(4):296-405.
 179. Vasey P, Jayson G, Gordon A, Gabra H, Coleman R, Atkinson R, i sur. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2004;17(96):1682-91.
 180. Burger R, Brady M, Rhee J, Sovak M, Kong G, Nguyen H, i sur. Independent radiologic review of the Gynecologic Oncology Group Study 0218, a phase III trial of bevacizumab in the primary treatment of advanced epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Gynecol Oncol.* 2013;131(1):21-6.
 181. Burger R, Brady M, Bookman M, Fleming G, Monk B, Huang H, i sur. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(26):2473-83.

182. Hall M, Gourley C, McNeish I, Ledermann J, Gore M, Jayson G, i sur. Targeted anti-vascular therapies for ovarian cancer: current evidence. *Br J Cancer*. 2013;108(2):250-8.
183. Ferriss J, Java J, Bookman M, Fleming G, Monk B, Walker J, i sur. Ascites predicts treatment benefit of bevacizumab in front-line therapy of advanced epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers: an NRG Oncology/GOG study. *Gynecol Oncol*. 2015;139(1):17-22.
184. Yan J, Milosevic M, Fyles A, Manchul L, Kelly V, Levin W. A hypofractionated radiotherapy regimen (0-7-21) for advanced gynaecological cancer patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011;23(7):476-81.
185. Tinger A, Waldron T, Peluso N, Katin M, Dosoretz D, Blitzer P, i sur. Effective palliative radiation therapy in advanced and recurrent ovarian carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51(5):1256-63.
186. Nishino M, Jagannathan J, Ramaiya N, Van den Abbeele A. Revised RECIST Guideline Version 1.1: What Oncologists Want to Know and What Radiologists Need to Know. *AJR*. 2010;195(2):291-89.
187. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz L, Sargent D, Ford R, i sur. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.
188. Moyer V, Preventive Services Task Force US. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2014;160(4):271-81.
189. Lu K, Wood M, Daniels M, Burke C, Ford J, Kauff N, i sur. American Society of Clinical Oncology Expert Statement: collection and use of a cancer family history for oncology providers. *J Clin Oncol*. 2014;32(8):833-40.
190. Butler T, Maravent S, Boisselle J, Valdes J, Fellner C. A review of 2014 cancer drug approvals, with a look at 2015 and beyond. *PT*. 2015;40(3):191-205.
191. Deeks E. Olaparib: first global approval. *Drugs*. 2015;72(2):231-40.
192. Pujade-Lauraine E, Ledermann J, Selle F, Gebski V, Penson R, Oza A, i sur. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1274-84.
193. McDonald B, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26.
194. Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
195. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
196. Sherwood V. Wnt signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism? *Mol Cell Biol*. 2015;35(1):2-10.
197. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*. 1999;112(8):1237-45.
198. Brembeck F, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16(1):51-9.
199. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461-73.
200. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36:1461-73.
201. Katoh M. Wnt/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*. 2005;16(6):1583-8.
202. Sherwood V. Wnt signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism? *Mol Cell Biol*. 2014;35(1):2-10.

203. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127:469-80.
204. Dey N, Young B, Abramovitz M, Bouzyk M, Barwick B, et al. Differential Activation of Wnt- β -Catenin Pathway in Triple Negative Breast Cancer Increases MMP7 in a PTEN Dependent Manner. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77425.
205. Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology*. 2004;36:120.
206. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398(6726):422-6.
207. Lam A, Gottardi C. Beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;26(6):652-7.
208. Easwaran V, Lee S, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, et al. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res*. 2003;63(12):345-53.
209. Dejmeek J, Saffholm A, Kamp Nielsen C, Andersson T, Leandersson K. Wnt-5a/Ca²⁺-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 2006;26:6024-36.
210. Kuhl M, Sheldahl L, Malbon C, Moon R. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem*. 2000;275:12701-11.
211. Huang T, Xie Z, Wang J, Li M, Jing N, Li L. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins repress canonical Wnt signaling via its interaction with Dishevelled (Dvl) protein and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 2001;276:37399-405.
212. Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. The Wnt/calcium pathway activates NFAT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature*. 2002;417:295-9.
213. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;23:131-9.
214. Wallingford J. Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:627-53.
215. Ybot-Gonzalez P, Savery D, Gerrelli D, Signore M, Mitchell C, Faux C, et al. Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development*. 2007;134:789-99.
216. Wang Y. Wnt/planar cell polarity signaling : a new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:2103-9.
217. McDonald B, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26.
218. Kongkham P, Northcott P, Croul S, Smith C, Taylor M, Rutka J. The SFRP family of Wnt inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene*. 2010;29(30):3017-24.
219. Cheng C, Smith S, Charnock-Jones D. Transcript profile and localization of Wnt signaling-related molecules in human endometrium. *Fertil Steril*. 2008;90(1):201-4.
220. Chong JM, Uren A, Rubin JS, Speicher DW. Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J Biol Chem*. 2002;277:5134-44.
221. Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP, Moos M. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell*. 1997;88:757-66.
222. Dai W, Teodoridis J, Zeller C, Graham J, Hersey J, Flanagan J, et al. Systematic CpG islands methylation profiling of genes in the Wnt pathway in epithelial ovarian cancer identifies biomarkers of progression-free survival. *Clin Cancer Res*. 2011;17(12):4052-62.

223. Vincent K, Postovit L. A pan-cancer analysis of secreted Frizzled-related proteins: reexamining their proposed tumour suppressive function. *Scientific reports*. 2017;7(1).
224. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg M, i sur. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet*. 2002;31:141-9.
225. Vincan E, Barker N. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):657-63.
226. Lee A, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, Mazieres J, i sur. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*. 2004;23:6672-6.
227. Zou H, Molina J, Harrington J, Osborn N, Klatt K, Romero Y, i sur. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer*. 2005;116:584-91.
228. Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman F, Benhattar J. Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene*. 2006;25:3084-92.
229. Fukui T, Kondo M, Ito G, Maeda O, Sato N, Yoshioka H, i sur. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2005;24:6323-27.
230. Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R, Krieg R, Klopocki E, i sur. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab Invest*. 2004;84:465-78.
231. Takada T, Yagi Y, Maekita T, Imura M, Nakagawa S, Tsao S, i sur. Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers. *Cancer Sci*. 2004;95:741-4.
232. Cheng Y, Yu J, Wong Y, Man E, To K, Jin V, i sur. Frequent epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by promoter methylation in human gastric cancer. *Br J Cancer*. 2007;97:895-901.
233. Surana R, Sikka S, Cai W, EM S, Warriar S, Tan H, i sur. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(1):53-65.
234. Shulewitz M, Soloviev I, Wu T, Koeppen H, Polakis P, Sakanaka C. Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene*. 2006;25:4361-9.
235. Veeck J, Geisler C, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knüchel R, i sur. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis*. 2008;29(5):991-8.
236. Veeck J, Noetzel E, Bektas N, Jost E, Hartmann A, Knüchel R, i sur. Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. *Molecular Cancer*. 2008;7:83.
237. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*. 2004;23:6672-6.
238. Mandal D, Srivastava A, Mahlum E, Desai D, Maran A, Yaszemski M, i sur. Severe suppression of Frzb/sFRP3 transcription in osteogenic sarcoma. *Gene*. 2007;386:131-8.
239. Wissmann C, Wild P, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, i sur. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol*. 2003;201:204-12.
240. Abu-Jawdeh G, Comella N, Tomita Y, Brown L, Tognazzi K, Sokol S, i sur. Differential surxpression of frpHE: a novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. *Lab investigatig*. 1999;79:439-47.

- 241.Hrzenjak A, Tippl M, Kremser M, Strohmeier B, Guelly C, Neumeister D, i sur. Inverse correlation of secreted frizzled-related protein 4 and beta-catenin expression in endometrial stromal sarcomas. *J Pathol.* 2004;204:19-27.
- 242.Feng Han Q, Zhao W, Bentel J, Shearwood A, Zeps N, Joseph D, i sur. Expression of sFRP-4 and beta-catenin in human colorectal carcinoma. *Cancer Lett.* 2006;231:129-37.
- 243.Lee JL, Chang CJ, Wu SY, Sargan DR, Lin CT. Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) is highly expressed in canine mammary gland tumours but not in normal mammary glands. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84.
- 244.Yamamura S, i sur. Oncogenic functions of secreted Frizzled-related protein 2 in human renal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:1680-87.
- 245.Herman J, Baylin S. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349:2042-54.
- 246.Jones P, Baylin S. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3:415-28.
- 247.Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003;116:2627-34.
- 248.Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434(7035):843-50.
- 249.Sharma M, Castro-Piedras I, Simmons GJ, Pruitt K. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cell Signal.* 2018;47:52-64.
- 250.Pizzuti A, Amati F, Calabrese G, Mari A, Colosimo A, Silani V, i sur. cDNA characterization and chromosomal mapping of two human homologs of the *Drosophila* dishevelled polarity gene. *Hum Mol Genet.* 1996;5:953-8.
- 251.Semēnov M, Snyder M. Human dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family. *Genomics.* 1997;42:302-10.
- 252.Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A. Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 2003;278:14066-73.
- 253.Pecina-Slaus N, Nikuseva Martić T, Kokotović T, Kusec V, Tomas D, Hrascan R. AXIN1 Protein expression and localisation in glioblastoma. *Coll antropol.* 2011;35(1):101-16.
- 254.Gao C, Chen Y. Dishevelled: The hub of wnt signaling. *Cell Signal.* 2010;22:717-27.
- 255.Kafka A, Basic-Kinda S, Pecina-Slaus N. The cellular story of dishevelleds. *Croat Med J.* 2014;55(5):459-5.
- 256.Zhang C, Li C, Chen X, Zhou Y, Yin B, Ni R, i sur. Overexpression of dishevelled 2 is involved in tumor metastasis and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(12):1507-17.
- 257.Mizutani K, Miyamoto S, Nagahata T, Konishi N, Emi M, Onda M. Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in prostate cancer. *Tumori.* 2005;91(6):546-51.
- 258.Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, i sur. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci.* 2003;94(6):515-8.
- 259.Okino K, Nagai H, Hatta M, Nagahata T, Yoneyama K, Ohta Y, i sur. Up-regulation and overproduction of DVL-I, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in cervical squamous cell carcinoma. *Onco Rep.* 2003;10(5):1219-23.
- 260.Wnt signaling in cervical cancer? *J Cancer.* 2018;9(7):1277-86.
- 261.Zhou G, Ye J, Sun L, Zhang Z, Feng J. Overexpression of Dishevelled-2 contributes to proliferation and migration of human esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Histol.* 2016;47(3):287-95.

262. Pulvirenti T, Van Der Heijden M, Droms L, Huse J, Tabar V, Hall A. Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. *Cancer Res.* 2011;71:7280-90.
263. Wei Q, Zhao Y, Yang Z, Dong Q, Dong X, Han Y, i sur. Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. *Lung Cancer.* 2008;62(2):181-92.
264. Zhao Y, Yang Z, Wang Y, Miao Y, Liu Y, Dai S, i sur. Dishevelled-1 and dishevelled-3 affect cell invasion mainly through canonical and noncanonical Wnt pathway, respectively, and associate with poor prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Mol Carcinog.* 2010;49(8):760-70.
265. Badiglian Filho L, Oshima C, De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, De Sousa Damião R, Gomes T, i sur. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2009;21(2):313-20.
266. Burkhalter R, Symowicz J, Hudson L, Gottardi C, Stack M. Integrin regulation of beta-catenin signaling in ovarian carcinoma. *J Biol Chem.* 2011;286(26):23467-75.
267. Jacob F, Ukegijini K, Nixdorf S, Ford C, Olivier J, Caduff R, i sur. Loss of Secreted Frizzled-Related Protein 4 Correlates with an Aggressive Phenotype and Predicts Poor Outcome in Ovarian Cancer Patients. *PLoS One* 7. 2012;7(2):e31885.
268. Gray J, Suzuki S, Kuo W, i sur. Specific keynote: genome copy number abnormalities in ovarian cancer. *Gynecol oncol.* 2003;88:16-21.
269. Saran U, Arfuso F, Zeps N, Dharmarajan A. Secreted frizzled-related protein 4 expression is positively associated with responsiveness to Cisplatin of ovarian cancer cell lines in vitro and with lower tumour grade in mucinous ovarian cancers. *BMC Cell Biol.* 2012;13:25.
270. Tulac S, Nayak N, Kao L, Van Waes M, Huang J, Lobo S, i sur. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3860-6.
271. Su H, Lai H, Lin Y, Liu C, Chen C, Chou Y, i sur. Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer.* 2010;127(3):555-67.
272. Zhang K, Song H, Yang P, Dai X, Li Y, Wang L, i sur. Silencing dishevelled-1 sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells via AKT/GSK-3 β / β -catenin signalling. *Cell Prolif.* 2015;48(2):249-58.
273. Popadiuk C, Xiong J, Wells M, Andrews P, Dankwa K, Hirasawa K, i sur. Antisense suppression of pygopus2 results in growth arrest of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;1(12):2216-23.
274. Christiansen J, Rajasekaran A. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006;1(66):8319-26.
275. Gottardi C, Wong E, Gumbiner B. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1049-60.
276. Rizzardi A, J, AT, Vogel R, Pambuccian S, Henriksen J, Skubitz A, i sur. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol.* 2012;7(42).
277. Choi S, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr.* 2010;1(1):8-16.
278. Anderson O, Sant K, Dolinoy D. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem.* 2012;23(8):853-9.
279. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

280. Kališnik M. Temelji stereologije. *Acta Stereol.* 1985;4(1):1-148.
281. Kardum V, Karin V, Glibo M, Skrtic A, Martić T, Ibisević N, i sur. Methylation-associated silencing of SFRP1 gene in high-grade serous ovarian carcinomas. *Ann Diagn Pathol.* 2017;31:45-9.
282. González-Sancho J, Brennan K, Castelo-Soccio L, Brown A. Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6- independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 2004;24(11):4757-68.
283. Fabijanović D, Zuni I, Martić T, Skenderi F, Serman L, Vranic S. The expression of SFRP1, SFRP3, DVL1, and DVL2 proteins in testicular germ cell tumors. *APMIS.* 2016;124:942-9.
284. Nikuševa-Martić T, Šerman L, Zeljko M, Vidas Ž, Gašparov S, Zeljko H, i sur. Expression of Secreted Frizzled-Related Protein 1 and 3, T-cell Factor 1 and Lymphoid Enhancer Factor 1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(3):545-51.
285. Serman L, Nikuseva Martić T, Serman A, Vranic S. Epigenetic alterations of the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014;14:191-4.
286. Davaadorj M, Saito Y, Morine Y, Ikemoto T, Imura S, Takasu C, i sur. Loss of secreted frizzled-related protein-1 expression is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43:344-50.
287. Yang H, Liu G, Liu Y, Zhao H, Yang Z, Zhao C, i sur. Over-expression of microRNA-940 promotes cell proliferation by targeting GSK3beta and sFRP1 in. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:593-601.
288. Dahl E, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoehr R, Wild P, Veeck J, i sur. Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2007;26(38):5680-91.
289. Garcia-Tobilla P, Solorzano S, Salido-Guadarrama I, Gonzalez-Covarrubias V, Morales-Montor G, Diaz-Otanez C, i sur. SFRP1 repression in prostate cancer is triggered by two different epigenetic mechanisms. *Gene* 2016;593:1. 2016;593:292–301.
290. Wu F, Li J, Guo N, Wang X, Liao Y. MiRNA-27a promotes the proliferation and invasion of human gastric cancer MGC803 cells by targeting SFRP1 via Wnt/betacatenin signaling pathway. *Am J Cancer Res* 2017;7:405-16.
291. Kong L, Xue M, Zhang Q, Su C. In vivo and in vitro effects of microRNA-27a on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through targeting of SFRP1 gene via Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2017;8:15507-19.
292. Qiao B HB, Cai JH, Tao Q, King-Yin Lam A. MicroRNA-27a-3p modulates the Wnt/beta-catenin signaling pathway to promote epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma stem cells by targeting SFRP1. *Sci Rep.* 2017;7:44688.
293. Marsit C, Houseman E, Christensen B, Gagne L, Wrensch M. Identification of Methylated Genes Associated with Aggressive Bladder Cancer. *PLoS One.* 2010;5(8):e12334.
294. Zi X, Guo Y, Simoneau A, Hope C, Xie J, Holcombe R, i sur. Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Res.* 2005;65(21):9762-70.
295. Qu Y, Li Y, Cai Q, Wang Y, Gu Q, Zhu Z, i sur. Over-expression of FRZB in gastric cancer cell suppresses proliferation and induces differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(3):353-64.
296. Schlenzog M, Magnus L, Heide T, Eschenbruch J, Steib F, Tator M, i sur. Schlenzog, M., Magnus, L., Heide, T., Eschenbruch, J., Steib, F., Tator, M., ... Dahl, E. (2018). Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Epigenetics.* 2018;13(3):214-27.

- 297.Hirata H, Hinoda Y, Ueno K, i sur. Role of secreted frizzled-related protein 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2010;70:1896-905.
- 298.Moskalev E, Luckert K, Vorobjev I, i sur. Concurrent epigenetic silencing of wnt/b-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer.* 2012;12:213.
- 299.Ekström E, Sherwood V, Andersson T. Methylation and loss of secreted frizzled-related protein 3 enhances melanoma cell migration and invasion. *PLoS One.* 2011;6:e18674.
- 300.Morin P, Sparks A, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, i sur. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997;275(5307):1787-90.
- 301.Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science.* 1997;275(5307):1790-2.
- 302.Chesire D, Ewing C, Sauvageot J, Bova G, Isaacs W. Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer. *The Prostate.* 2000;45(4):323-34.
- 303.Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer research.* 1998;58(16):3526-8.
- 304.Palacios J, Gamallo C. Mutations in the β -catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Research.* 1998;58(7):1344-7.
- 305.Huang M, Yen L, Liu H, Liu P, Chung F, Wang T, i sur. Significant overexpression of DVL1 in Taiwanese colorectal cancer patients with liver metastasis. *International journal of molecular sciences.* 2013;14(10):20492-507.
- 306.Prasad C, Gupta S, Rath G, Ralhan R. Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. *Oncology.* 2007;73(1-2):112-7.
- 307.Nagaraj A, Joseph P, Kovalenko O, Singh S, Armstrong A, Redline R, i sur. Critical role of Wnt/beta-catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. *Oncotarget.* 2015;6(27):23720-34.
- 308.Armstrong D, Bundy B, Wenzel L, Huang H, Baergen R, Lele S, i sur. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(1):34-43.
- 309.Suh D, Lee K, Kim K, Kang S, Kim J. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2014. *J gynecol oncol.* 2015;26(2):156-67.
- 310.Steffensen K, Smoter M, Waldstrom M, Grala B, Bodnar L, Stec R, i sur. Resistance to first line platinum paclitaxel chemotherapy in serous epithelial ovarian cancer: the prediction value of ERCC1 and Tau expression. *Int J Oncol.* 2014;44(5):1736-44.
- 311.Vergara D, Tinelli A, Iannone A, Maffia M. The impact of proteomics in the understanding of the molecular basis of Paclitaxel-resistance in ovarian tumors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;12(8):987-97.
- 312.Holloway K, Calhoun T, Saxena M, Metoyer C, Kandler E, Rivera C, i sur. SIRT1 regulates Dishevelled proteins and promotes transient and constitutive Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(20):9216-21.
- 313.Khan A, Hojjat-Farsangi M, Daneshmanesh A, Hansson L, Kokhaei P, Osterborg A, i sur. Dishevelled proteins are significantly upregulated in chronic lymphocytic leukaemia. *Tumour Biol.* 2016;37(9):11947-57.
- 314.Rosenbluh J, Wang X, Hahn W. Genomic insights into Wnt/beta-catenin signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2014;35(2):103-9.
- 315.Chu Y, Fan W, Guo W, Zhang Y, Wang L, Guo L, i sur. miR-1247-5p functions as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma by targeting Wnt3. *Oncol Rep.* 2017;38(1):343-51.

316. Shi S, Lu Y, Qin Y, Li W, Cheng H, Xu Y, i sur. miR-1247 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and inhibits cell proliferation by targeting neuropilins. *Curr Mol Med*. 2014;14(3):316-27.
317. Castro-Piedras I, Sharma M, den Bakker M, Molehin D, Martinez E, Vartak D, i sur. DVL1 and DVL3 differentially localize to CYP19A1 promoters and regulate aromatase mRNA in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2018;9(86):35639-54.
318. Wu Y, Bai J, Hong L, Liu C, Yu S, Yu G, i sur. Low expression of secreted frizzled-related protein 2 and nuclear accumulation of β -catenin in aggressive nonfunctioning pituitary adenoma. *Oncol Lett*. 2016;12(1):199-206.
319. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, i sur. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357(660):eaan2507.
320. Tang Z, i sur. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W98-W102.

11 KRATKA BIOGRAFIJA

Vedran Kardum dr.med. rođen je 1985. godine u Pakracu gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2009. godine. Obavezni pripravnički staž odradio je u Specijalnoj bolnici za medicinsku rehabilitaciju Lipik te je 2010. godine položio stručni ispit. Polaže specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije u 12/2015. godine. Zaposlen je kao specijalist ginekologije i opstetricije u Klinici za ženske bolesti i porode KB Merkur gdje radi na Zavodu za humanu reprodukciju s dnevnom bolnicom za medicinski pomognutu oplodnju. Subspecijalističko usavršavanje iz područja ginekološke endokrinologije i humane reprodukcije započinje u 12/2018. godine.

Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo upisuje 2014. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te počinje s izradom disertacije pod mentorstvom prof. dr.sc. Ljiljane Šerman dr.med.

Tijekom specijalizacije završio je specijalistički poslijediplomski studij „Ultrazvuk u ginekologiji i porodništvu“ u KB Sveti Duh, te specijalistički poslijediplomski tečaj ginekološke endoskopije „Kurt Semm“ KBC Zagreb, kao i druge internacionalne tečajeve iz područja minimalno invazivne kirurgije.

Aktivno se služi engleskim jezikom. U dosadašnjem radu redovito sudjeluje na stručnim skupovima iz područja ginekologije i opstetricije te je autor/koautor 4 rada u časopisima sa međunarodnom recenzijom te je autor/koautor 12 radova objavljenih na domaćim i regionalnim kongresima.