Izraženost komponenti signalnoga puta Wnt u difuznom karcinomu želuca

Sremac, Maja

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:005727

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Sremac

Izraženost komponenti signalnoga puta Wnt u difuznom karcinomu želuca

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Sremac

Izraženost komponenti signalnoga puta Wnt u difuznom karcinomu želuca

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Disertacija je rezultat suradnje Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju i Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Mentori: Prof. dr. sc. Nadan Rustemović

Izv. prof. dr. sc. Tamara Nikuševa Martić

ZAHVALE

Zahvljujem svojim mentorima na trajnoj stručnoj i znanstvenoj potpori te motivaciji tijekom provođenja istraživanja i izrade disertacije.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Tamari Nikuševa Martić, djelatnicima Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i studentima Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na ustrajnoj pomoći i nesebično uloženom vremenu pri provedbi istraživanja.

Zahvaljujem kolegama iz Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, kolegama i voditelju Odjela za intervencijsku gastroenterologiju Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb prof. dr. sc. Nadanu Rustemoviću, koji su omogućili uzorke za istraživanje. Hvala kolegici dr. sc. Katji Grubelić Ravić koja me znanstveno usmjerila prema ovoj temi.

Zahvaljujem kolegicama iz Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb prof. dr. sc. Jasminki Razumović Jakić i dr. sc. Ivi Brčić na nesebičnoj pomoći prilikom prikupljanja i patohistološke provjere uzoraka korištenih u istraživanju.

Najveće hvala mojoj obitelji i najbližima na strpljenju i bezuvjetnoj potpori.

Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima koji su me naučili da se rad, ustrajnost i trud uvijek na kraju isplate.

SADRŽAJ:

1 UVOD I SVRHA RADA 1
1.1 Epidemiologija karcinoma želuca 1
1.1.1 Incidencija, mortalitet i preživljenje 1
1.1.2 Rizični čimbenici i patofiziologija 3
1.2 Klasifikacija i stupnjevanje karcinoma želuca 5
1.2.1 Anatomska klasifikacija 5
1.2.2 Histološka klasifikacija 5
1.2.3 Molekularna klasifikacija 6
1.2.4 TNM klasifikacija 7
1.3 Signalni put Wnt 11
1.4 Secreted Frizzled-related proteins (SFRP) 13
1.5 Obitelj transkripcijskih faktora TCF/LEF 14
1.6 Dishevelled 16
2 HIPOTEZA 18
3 CILJEVI RADA 19
3.1 Opći cilj 19
3.2 Specifični ciljevi 19
4 MATERIJALI I I METODE 20
4.1 Uzorci tkiva i dokumentacija 20
4.2 Imunohistokemijska analiza 20
4.2.1 Priprema uzoraka za imunohistokemiju 21
4.2.2 Imunohistokemija 21
4.3 Stereološka kvantitativna analiza 22
4.4 Semikvantitativna analiza 23
4.5 Statistička obrada podataka 24
5 REZULTATI 25
5.1 Demografske karakteristike ispitanika 25
5.2 Patohistološke i kliničke karakteristike 26
5.3 Razina izraženosti proteina SFRP1 i SFRP3 28
5.4 Razina izraženosti proteina TCF-1 32
5.5 Razina izraženosti proteina DVL2 i DVL3 34
5.6 Korelacijska analiza izraženosti ispitanih proteina 37
6 RASPRAVA 38
7 ZAKLJUČCI 45
8 SAŽETAK 46
9 SUMMARY 47
10 LITERATURA 48
11 ŽIVOTOPIS 58

Popis oznaka i kratica:

AJCC	Američki zajednički odbor za rak, eng. American Joint Commitee on Cancer
At	testna površina
CDH1	kadherin 1, eng. *cadherin 1*
CDR	eng. *Context-Dependent Regulatory*
CK1	kazein kinaza 1, eng. *Casein Kinase 1*
CRD	cisteinom bogata domena, eng. C*ystein-Rich Domain*
CSI	kromosomski nestabilni, eng. *Chromosomal Instable*
CtBP	protein koji veže C-terminalnu domenu, engl. *C-terminal Binding Protein*
cTNM	klinička TNM klasifikacija
DAB	diaminobenzidin tetrahidroklorid
DNA	deoksiribonuklinska kiselina, eng. *Deoxyribonucleic Acid*
DVL	eng. *Dishevelled*
EBV	Epstein-Barr virus
EMT	epitelno-mezenhimska tranzicija, eng. *Epithelial-Mesenchymal Transition*
EtOH	etilni alkohol
FAP	familijarna adenomatozna polipoza, eng. *Familial Adenomatous Polyposis*
FrZB	eng. *Frisbee*
Fz	eng. *Frizzled*
GS	genomski stabilni, eng. *Genomically Stable*
GSK3β	glikogen sintetaza kinaza 3β, engl. *Glycogen Synthase Kinase 3β*
HDGC	nasljedni difuzni karcinom, engl. *Hereditary Diffuse Gastric Cancer*
HGA	adenom visokog stupnja displazije, eng. *High Grade Adenoma*
HMG	engl. *High Mobility Group*
HP	Helicobacter pylori
HRP	peroksidaza iz hrena engl. *Horse Radish Peroxidase*

IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka, engl. International Agency for Research on Cancer
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
Int-1	eng. *Integration 1*
IRS	imunoreaktivni rezutat, eng. *Immunoreactive Score*
LEF	engl. *Lymphoid-Enhancing Factor*
LGA	adenom niskog stupnja displazije, eng. *Low Grade Adenoma*
lncRNA	duga nekodirajuća RNA, engl. *long non coding RNA*
LRP	protein sličan receptoru LDL-a, eng. *LDL Receptor-related Protein*
Lt	duljina testnih linija
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina, eng. *messenger RNA*
miRNA	mikro RNA, eng. *micro RNA*
MSI	mikrosatelitna nestabilnost, engl. *Microsatellite Instability*
NIH	Nacionalni instituti za zdravlje, eng. National Institutes of Health
NSCLC	rak pluća nemalih stanica, eng. *Non-Small Cell Lung Cancer*
Nv	numerička gustoća
p53	supresor tumora
PP	postotak pozitivnih stanica, eng. *Percentage of Positive cells*
pTNM	patološka TNM klasifikacija
SI	jačina bojanja, eng. *Staining Intensity*
SFRP	eng. *Secreted Frizzled-Related Protein*
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija, eng. World Health Organisation (WHO)
TBS	Tris-puferirana fiziološka otopina, eng. *Tris-Buffered Saline*
TCF	transkripcijski faktor T-limfocita, eng. *T-Cell-Specific Transcription Factor*
TLE	eng. *Transducine-Like Enhancer Protein*
TNFα	tumor-nekrotizirajući faktor α, eng. *Tumor Necrosis Factor α)*
TNM	međunarodna klasifikacija malignih tumora
Wnt	engl. *Wingless*

1 UVOD I SVRHA RADA

Zloćudne bolesti danas su jedan od globalno najznačajnijih javnozdravstvenih problema, a veliki udio upravo imaju zloćudne novotvorine želuca. Karcinom želuca spada među najčešće maligne bolesti u svijetu i treći je na svjetskoj ljestvici uzroka smrti od malignih oboljenja (1). Iako se ukupna incidencija karcinoma želuca smanjuje unazad proteklih nekoliko desetljeća, zabrinjava porast incidencije difuznog podtipa koji se uglavnom javlja u mlađih pacijenata, dijagnosticira se u već poodmaklom stadiju, te je karakteriziran brzom progresijom bolesti i znatno lošijom prognozom (2,3). Unatoč značajnom napretku u dijagnostici i liječenju malignih bolesti, kao i u tehnološkom napretku, osim zemlje s najvećom incidencijom karcinoma želuca (Japan) nažalost nije postignut značajniji pomak u dijagnostici i liječenju ove bolesti. Iako je patogeneza adenokarcinoma želuca predmet mnogobrojnih istraživanja, molekularni profil difuznih karcinoma želuca još uvijek predstavlja veliku zagonetku te je otkrivanje uloge gena i proteina odgovornih za nastanak i napredovanje ovih tumora od izuzetnog znanstvenog značaja. Glavna namjena ovog istraživanja je pobliže razjasniti ulogu proteina Wnt-signalnog puta u nastanku i progresiji difuznih karcinoma želuca. Otkrića u ovom području otvaraju mogućnost razvoja ciljanih, individualiziranih terapijskih metoda što bi doprinjelo uspješnijem liječenju i boljoj perspektivi oboljelih od ovih tumora.

1.1 Epidemiologija karcinoma želuca

1.1.1 Incidencija, mortalitet i preživljenje

Karcinom želuca predstavlja značajan globalni javnozdravstveni problem i nalazi se na petom mjestu najčešćih malignih oboljenja u svijetu nakon karcinoma dojke, prostate, pluća i kolorektalnog karcinoma te je treći na svjetskoj ljestvici smrtnosti od malignih oboljenja. Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer; IARC), dio Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization; WHO) koja se bavi promocijom internacionalne suradnje u mjerama prevencije raka, svake godine radi GLOBOCAN izvješće o rasprostranjenosti raka, koje uključuje 185 zemalja i 36 vrsta raka. Prema podacima SZO u 2018. godini bilo je 1 033 701 novooboljelih (gotovo 6% od ukupnog broja novih slučajeva malignih bolesti) te 782 685 smrtnih slučajeva (8.2%) od karcinoma želuca (4). Incidencija i mortalitet značajno

variraju ovisno o dobi, spolu, anatomskoj lokalizaciji, rasnom i geografskom podrijetlu, socioekonomskom statusu, prehrambenim i štetnim navikama, izloženosti infekciji s *Helicobacter pylori* (HP) i dr. (5). Gotovo polovina svjetske incidencije je u istočnoj Aziji (Kina), a najveću incidenciju adenokarcinoma ima Japan - u 2018. godini prema podacima SZO bilo je 115 546 novih slučajeva u oba spola (1). Karcinom želuca češće se javlja u muškaraca nego kod žena (u omjeru otprilike 2:1), rijeđe prije 40-te godine života sa vrškom incidencije u 7. i 8. desetljeću života za oba spola, a češće se javlja u nerazvijenim zemljama, grupama lošijeg socioekonomskog statusa i crnoj rasi (5).

Karcinom želuca bio je vodeći uzrok smrti od malignih bolesti početkom 20. stoljeća, međutim od 1950.-ih godina u svjetskim razmjerima se incidencija karcinoma želuca i stopa mortaliteta progresivno smanjuju, kako u područjima s visokom, tako i u područjima s niskom incidencijom bolesti (6,7). Ova pojava objašnjava se poboljšanjem životnih uvjeta, promjenama navika prehrane i skladištenja hrane, okolišnim čimbenicima, uvođenjem programa masovnog probira i redukciji HP infekcije (6,8). No, iako se ukupna incidencija i mortalitet karcinoma želuca progresivno smanjuju od sredine prošloga stoljeća, prati se trend rasta incidencije proksimalnih lokalizacija raka želuca i ezofagogatričnog prijelaza koji se uglavnom javlja u mlađih pacijenata, dijagnosticira se u poodmaklom stadiju i ima znatno slabiju prognozu (9–11). Unatoč svemu, posljednjih godina nije postignut značajniji napredak u dijagnostici i liječenju adenokarcinoma želuca te petogodišnja stopa preživljenja u većini svjetskih zemalja iznosi tek 25-30% uz iznimku Japana gdje se radi visoke stope incidencije provodi program masovnog probira (12).

U Republici Hrvatskoj prema posljednjim statističkim podacima Registra za rak iz 2018. rak želuca bio je na sedmom mjestu po incidenciji u muškaraca sa 535 novih slučajeva, dok je u žena zauzeo deseto mjesto sa 335 novih slučajeva, uz značajno visoku smrtnost pri čemu je omjer mortaliteta i incidencije 0.96 (13).

1.1.2 Rizični čimbenici i patofiziologija

Razvoj karcinoma želuca razultat je kompleksnog procesa koji uključuje interakciju različitih okolišnih, infektivnih i genetskih čimbenika.

S obzirom na značajnu geografsku varijaciju u incidenciji karcinoma želuca te smanjenje rizika za razvoj bolesti kod etničkih grupa koje su migrirale iz visoko u niskorizična područja očit je utjecaj okolišnih čimbenika, osobito u ranijoj životnoj dobi. Naime, postoji značajan pad rizika razvoja bolesti između prve generacije migranata i njihovih potomaka kod selidbe iz područja visoke u područje s niskom prevalencijom (14).

Više prehrambenih čimbenika i životnih navika dovodi se u svezu sa povećanim ili smanjenim rizikom od razvoja karcinoma želuca. Tako se način pripreme hrane bez upotrebe hladnjaka i zamrzivača radi produljenog roka upotrebe (dimljenje, usoljavanje, sušenje), prehrana s povećanim udjelom soli, prehrana bogata nitritima, a siromašna antioksidansima, nedostatan unos svježeg voća i povrća te povećan unos crvenog, dimljenog i prerađenog mesa, pretilost i pušenje smatraju rizičnim čimbenicima za razvoj bolesti te je korekcija životnih i prehrambenih navika važan korak u prevenciji. Mnoge studije pokazale su da je prehrana bogata sirovim povrćem i voćem te vitaminima A i C povezana s nižim rizikom nastanka karcinoma želuca (15,16).

Infekcija HP smatra se jednim od najvažnijih rizičnih faktora za razvoj karcinoma želuca. Tako je ta uzročno-posljedična povezanost dokazana 1994. godine kada je Međunarodna agencija za istraživanje tumora Svjetske zdravstvene organizacije (eng. International Agency for Research on Cancer; IARC) klasificirala HP u grupu I (definitivnih) karcinogena u ljudi (17). Infekcija HP najčešća je kronična bakterijska infekcija u ljudi koja zahvaća preko 50% svjetske populacije te se procijenjuje da je gotovo 90% adenokarcinoma želuca (uz izuzetak karcinoma kardije) posljedica infekcije, no ipak će samo manjina (manje od 1%) zaraženih razviti karcinom (18). Postoji više mehanizama kojima infekcija HP inducira karcinogenezu no najšire je prihvaćena uloga kronične upale. Kronična upala kao posljedica infekcije može progredirati u prekancerozne lezije kao što su atrofični gastritis i intestinalna metaplazija, a također pridonosi i genetskoj nestabilnosti želučane sluznice, smanjenjenju lučenja želučane kiseline (hipoklorhidrija) i promjenama u želučanom mikrobiomu (19). Regije sa visokim stopama incidencije karcinoma želuca tipično imaju i visoke stope seroprevalencije HP infekcije te smanjivanje seroprevalencije HP eradikacijskom terapijom u razvijenim zemljama prati

i smanjenje incidencije karcinoma želuca. Postoje i regije sa visokom stopom seroprevalencije HP, a niskom stopom incidencije karinoma želuca (Afrika, Indija). Pretpostavlja se da je razlog u kompleksnoj interakciji više uzročnih čimbenika kao što su okoliš, životne i prehrambene navike te genetska predispozicija (20).
Karcinom želuca povezan s infekcijom Epstein-Barr virusom (EBV) posebna je podvrsta koja čini 5-10% slučajeva. Ovi karcinomi obilježeni su hipermetilacijom DNA i utišavanjem tumor supresorskih gena što smanjuje njihovu ekspresiju i time vodi nastanku tumora. Karcinomi povezani sa EBV imaju posebna kliničkopatološka obilježja uključujući predominaciju kod muškaraca, lokalizaciju u proksimalnim dijelovima želuca, limfoepitelioidni tip histologije te povoljniju prognozu (21,22).

Patogeneza adenokarcinoma želuca predmet je mnogobrojnih istraživanja no unatoč tome molekularna pozadina karcinogeneze još uvijek je slabo poznata, a podaci o genskim promjenama u difuznom obliku manje su kompletirane u odnosu na intestinalni oblik. Više studija otkrilo je povezanost rizika razvoja karcinoma sa genetskim polimorfizmima gena koji su vezani uz upalni odgovor kao što su *IL-1, IL-6, IL-17, TNFα* i dr.(23,24). Iako je većina adenokarcinoma sporadična, oko 8-10% sadrži nasljednu komponentu. Tako se nasljedni difuzni karcinom (engl. hereditary diffuse gastric cancer, HDGC) javlja u 1-3% slučajeva, a brojnim istraživanjima u podlozi sklonosti razvoja ovog kacinoma dokazana je mutacija gena *CDH1* koji kodira staničnu adhezijsku molekulu E-kadherin odgovornu za međustaničnu interakciju i polarnost (25). Postoji još nekoliko obiteljskih karcinogenih sindroma koji povećavaju rizik od razvoja karcinoma želuca kao što su Lynch sindrom, Li-Fraumeni sindrom, familijarna adenomatozna polipoza (FAP) i dr., a zanimljiv je podatak da se za razliku od HDGC većinom histološki radi o intestinalnom podtipu koji ima prognozu sličnu sporadičnom (8).
Ostali čimbenici koji su povezani s povećanim rizikom za nastanak karcinoma želuca su kronični atrofični gastritis (npr. perniciozna anemija, prijašnje resekcije želuca sa refluksom žuči), hipertrofična gastropatija (Menetrierova bolest) i polipi želuca.
Karcinogeneza je kako u ostalim tako i u tumorima želuca složen multifaktorijalni i postepeni proces karakteriziran interakcijom okolišnih, životnih i genetskih čimbenika domaćina. S obzirom na heterogenost karcinoma želuca ovisno o njihovoj lokaciji (proksimalni/distalni tumori) te na histološku klasifikaciju prema Laurentu

(intestinalni/difuzni/intermedijarni) razlikuje se i patofiziološki mehanizam nastanka karcinoma. Tako je kod tumora intestinalnog tipa pretpostavljen stupnjeviti, višegodišnji proces nastanka karcinoma iz prekarcinoznih lezija poznat kao „Correina kaskada". Proces započinje HP induciranim kroničnim aktivnim gastritisom koji potom može progredirati u kronični atrofični gastritis, intestinalnu metaplaziju, displaziju i na poslijetku rezultirati razvojem invazivnog karcinoma (26,27). Kao što je već spomenuto, sama infekcija bakterijom ne implicira definitivni nastanak karcinoma (manje od 1% inficiranih će razviti karcinom) već je isti rezultat interakcije više rizičnih čimbenika. Detaljni patofiziološki mehanizam razvoja difuznih karcinoma želuca još je nedovoljno definiran, no za razliku od intestinalnog podtipa nema poznate prekursorske lezije, ne slijedi definiranu prekanceroznu kaskadu, a vezan je uz mutaciju gena *CDH1* koji kodira staničnu adhezijsku molekulu E-kadherin. E-kadherin i stanični signalni putevi imaju vitalnu ulogu u osiguranju normalne stanične funkcije te njihova deregulacija pridonosi inicijaciji i razvoju karcinoma (28).

1.2 Klasifikacija i stupnjevanje karcinoma želuca

1.2.1 Anatomska klasifikacija

Prema anatomskoj lokalizaciji razlikujemo proksimalne (tumori kardije i ezofgogastričnog prijelaza) i distalne tumore želuca. Iako se incidencija distalnih tumora stabilno smanjuje tijekom proteklih nekoliko desetljeća, prati se porast incidencije proksimalnih tumora, osobito u razvijenim zemljama. Smatra se da karcinomi proksimalnog dijela želuca predstavljaju drugačiji biološki entitet u odnosu na onaj smješten u distalnom dijelu, pokazuju agresivnije ponašanje, imaju znatno slabiju prognozu, manje petogodišnje preživljenje i veći poslijeoperacijski mortalitet (29).

1.2.2 Histološka klasifikacija

Primarni maligni tumori želuca javljaju se u više oblika (limfomi, sarkomi, gastriointestinalni stromalni tumori), no u preko 90% slučajeva riječ je o adenokarcinomima (30).

Postoje mnoge patohistološke klasifikacije koje su pokušale na osnovu morfoloških makroskopskih i mikroskopskih karakteristika napraviti klasifikaciju na pojedine

podtipove no jedna od i dalje najšire korištenih je Laurenova iz 1965. godine (31) koja ih dijeli na intestinalni, difuzni, te miješani ili neklasificirani tip. Intestinalni podtip ima žljezdanu strukturu koja sliči karcinomu kolona sa upalnom staničnom infiltracijom te čestom intestinalnom metaplazijom, karakterizira ga uglavnom dobra diferencijacija, a tipično nastaje na podlozi prekanceroznih lezija kao što su atrofični gastritis i intestinalna metaplazija. Difuzni tip ima slabu diferencijaciju, ne pokazuje formiranje žlijezda već se sastoji od stanica poput prstena pečatnjaka (engl. signet ring cells) koje imaju svijetlu citoplazmu punu sluzi s jezgrom potisnutnom na periferiju, a nalaze se raspršene pojedinačno ili u obliku nespecifičnih nakupina. On je slabije ograničen i difuzno zahvaća želučanu stijenku te može dovesti do njezinog difuznog zadebljanja stvarajući tako makroskopski oblik koji se naziva plastični linitis (lat. linitis plastica). Pokazuje širenje kroz submukozu, ima manju upalnu infiltraciju i ne dovodi se u svezu sa prekanceroznim lezijama. Češći je kod žena i mlađih osoba, rano metastazira i ima lošiju prognozu (31).
U Hrvatskoj se aktualno koristi histološka klasifikacija adenokarcinoma želuca Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) prema kojoj postoji pet glavnih kategorija morfoloških tipova adenokarcinoma želuca: tubularni, papilarni, mucinozni, slabo kohezivni (uključuje adenokarcinom tipa stanica prstena pečatnjaka – difuzni tip prema Laurenovoj klasifikaciji) i miješani tip adenokarcinoma, te njegove rijetke varijante. Navedena histološka klasifikacija adenokarcinoma želuca SZO usklađena je s tumorima ostalih dijelova probavnog sustava, no ne uključuje patogenezu i stupanj diferencijacije tumora kao niti epidemiološka obilježja tumora (32,33).

1.2.3 Molekularna klasifikacija

S obzirom na značajnu heterogenost karcinoma želuca te potrebu za razvoj ciljane, individualizirane terapije, 2014. godine u sklopu projekta NIH Cancer Genome Atlas (34) učinjena je molekularna analiza 295 primarnih adenokarcinoma želuca te je predložena molekularna klasifikacija karcinoma želuca u četiri podtipa: Epstein-Bar virus pozitivan (EBV, karakteriziran ekstremnom DNA hipermetilacijom, potencijalno osjetljiv na imunoterapiju); mikrosatelitni nestabilni tumori (MSI, s povišenim stupnjevima mutacije, uključujući gene koji kodiraju onkogene signalne proteine koji su potencijalne terapijske mete); genomski stabilni tumori (GS; difuznog fenotipa, CDH1 mutacije); i tumori s kromosomskom nestabilnošću (CSI, često intestinalnog fenotipa prema Laurenu, česte

mutacije u p53 tumor supresorskom genu i mutacije gena za tirozin kinaza receptore)(34,35). Identifikacija molekularnih podtipova predstavlja važan korak u budućem razvoju ciljane terapije i detaljnije stratifikacije pacijenata prilikom započinjanja liječenja.

1.2.4 TNM klasifikacija

Za prognozu i liječenje karcinoma želuca osim patohistološke klasifikacije važno je znati i klinički stupanj proširenosti bolesti. Premda postoje brojne klasifikacije, proširenost tumora određuje se najčešće prema TNM klasifikaciji koja se temelji na dubini invazije tumora (T), zahvaćanju limfnih čvorova (N) i prisutnosti metastaza (M). Trenutno važeća TNM klasifikacija je 8. izdanje American Joint Committee on Cancer (AJCC) iz 2017. godine koja razlikuje klinički stadij (c), patološki (p) (*Tablica 1*). i stadij nakon neoadjuvantnog liječenja. Oznaka "p" odnosi se na patološku klasifikaciju prema klasifikaciji TNM-a koja je različita od kliničke klasifikacije TNM-a te se temelji na makroskopskom i histološkom pregledu tumora. Patološki stadij tumora obično se određuje nakon kirurške resekcije primarnog tumora. „pT" uključuje odgovarajući kirurški resecirani materijal ili biopsiju u određivanju najvećeg pT stadija. „pN" uključuje kiruršku resekciju limfnih čvorova koji omogućavaju odgovarajući pregled limfnih čvorova u smislu prisutnosti metastaza, a „pM" uključuje mikroskopski pregled udaljenih metastaza (36).

Tablica 1. TNM-klasifikacija, klinički i patološki stadij bolesti prema AJCC-u (preuzeto i prilagođeno iz American Joint Commitee on Cancer, 8. izdanje, 2017.)

PRIMARNI TUMOR (T)	**REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI (N)**	**UDALJENE METASTAZE (M)**
TX primarni se tumor ne može odrediti	**NX** ne može se procijeniti prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima**	**M0** nema udaljenih metastaza
T0 nema tumora	**N0** nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	**M1** prisutne su udaljene metastaze
Tis karcinom in situ: intraepitelni tumor bez invazije lamine proprije, displazija visokog stupnja	**N1** metastaze u 1 ili 2 regionalna limfna čvora	
T1 tumor zahvaća laminu propriju, muskularis mukoze ili submukozu	**N2** metastaze u 3-6 regionalnih limfnih čvorova	
T1a tumor zahvaća laminu propriju ili muskularis mukoze	**N3** metastaze u ≥ 7 regionalnih limfnih čvorova	
T1b tumor zahvaća submukozu	**N3a** metastaze u 7-15 regionalnih limfnih čvorova	
T2 tumor zahvaća musklularis propriju	**N3b** metastaze u ≥ 16 regionalnih limfnih čvorova	
T3 tumor zahvaća supserozno vezivno tkivo bez invazije visceralnog peritoneuma ili susjednih struktura*		

T4 tumor zahvaća serozu (visceralni peritoneum) ili susjedne strukture		
T4a tumor zahvaća serozu (visceralni peritoneum)		
T4b tumor zahvaća susjedne strukture		

*susjedne strukture su: slezena, kolon transverzum, jetra, ošit, gušterača, abdominalna stijenka, nadbubrežna žlijezda, bubreg, tanko crijevo, retroperitoneum

**regionalni limfni čvorovi: perigastrični uz veliku i malu krivinu, desni i lijevi parakardijalni, infrapilorični, suprapilorični, limfni čvorovi uz lijevu gastričnu arteriju, celijakalnu arteriju, zajedničku hepatalnu arteriju, hepatoduodenalni te čvorovi uz lijenalnu ili spleničnu arteriju i uz hilus slezene

KLINIČKI STADIJ BOLESTI			
	T	**N**	**M**
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I	T1-2	N0	M0
Stadij IIA	T1-2	N1-N3	M0
Stadij IIB	T3-T4a	N0	M0
Stadij III	T3-T4a	N1-N3	M0
Stadij IVA	T4b	bilo koji	M0
Stadij IVB	bilo koji	bilo koji	M1

PATOLOŠKI STADIJ BOLESTI			
	T	**N**	**M**
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij IA	T1	N0	M0
Stadij IB	T1 T2	N1 N0	M0 M0
Stadij IIA	T1 T2 T3	N2 N1 N0	M0 M0 M0
Stadij IIB	T1 T2 T3 T4a	N3a N2 N1 N0	M0 M0 M0 M0
Stadij IIIA	T2 T3 T4a T4b	N3a N2 N1-2 N0	M0 M0 M0 M0
Stadij IIIB	T1-2 T3-T4a T4b	N3b N3a N1-2	M0 M0 M0
Stadij IIIC	T3-T4a T4b	N3b N3a-N3b	M0 M0
Stadij IV	bilo koji	bilo koji	M1

1.3 Signalni put Wnt

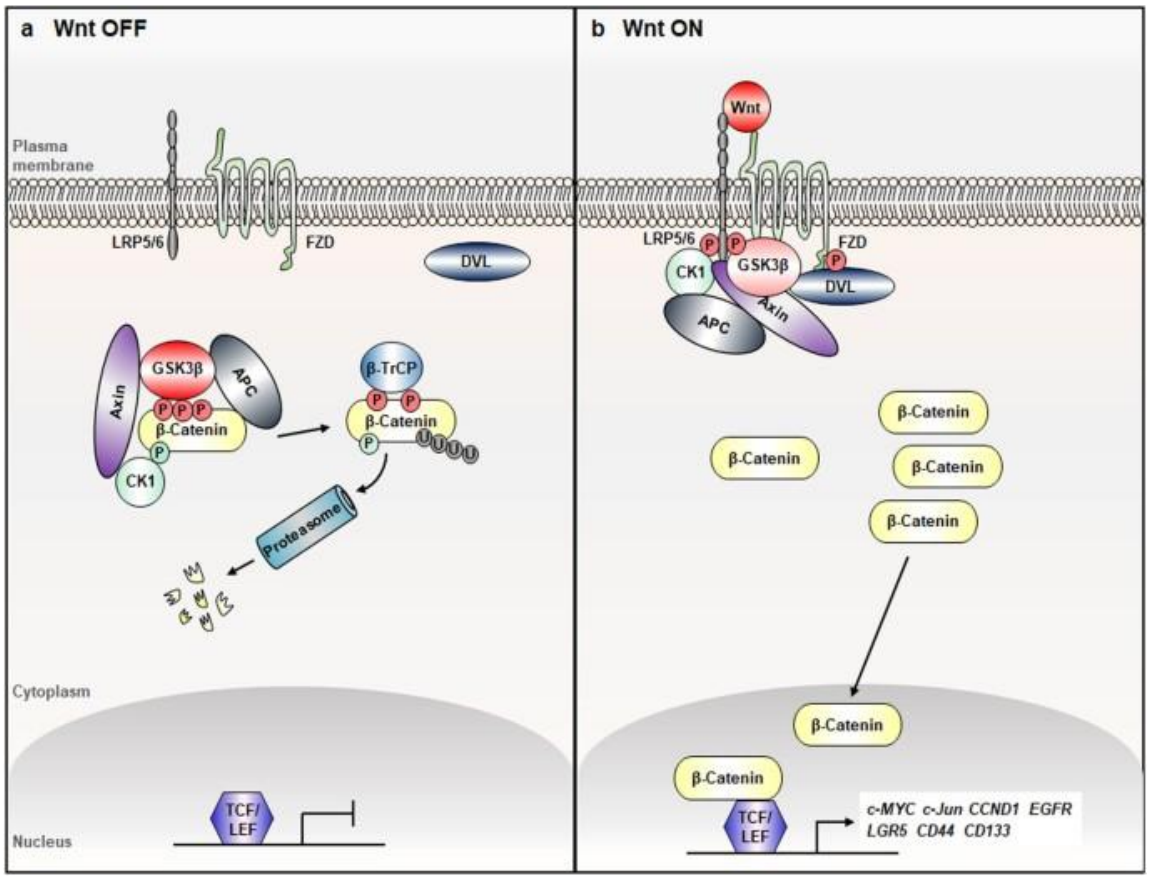
Signalni put Wnt specifičan je naziv za ovaj put u miša i čovjeka, dok se u mušice roda *Drosophila melanogaster* gdje je i otkriven prije gotovo 40 godina u studijama embrionalnog razvitka, naziva Wingless (37). Prvi protein Wnt obitelji, protoonkogen integration-1 (int-1) otkriven je 1982. godine u miševa, a pet godina poslije došlo je do spoznaje da je int-1 homolog Wingless (wg) gena u vinske mušice (38,39). Fuzijom imena ovih dvaju proteina (wg i int-1) Wnt proteini su dobili ime. Do danas je otkriveno 19 Wnt gena u genomu miša i čovjeka koji pripadaju velikoj skupini izvanstaničnih signalnih molekula (40,41).

Put prijenosa staničnog signala Wnt ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju i održavanju stanične homeostaze. Ovaj signalni put vezan je uz mnogobrojne stanične funkcije kao što su regulacija stanične proliferacije, diferencijacije, pokretljivosti, određivanje oblika i polarnosti stanice te staničnu smrt (40). Disregulacija samo jednog od dijelova ovog kompleksnog biološkog aparata vezana je uz razvoj urođenih mana, metaboličkih bolesti i razvoja novotvorina (41–43).

Postoje najmanje tri međusobno različita Wnt signalna puta, a to su klasični ili kanonski koji ovisi o β-kateninu kao transkripcijskom čimbeniku te nekanonski Wnt/PCP (engl. planar cell polarity) i Wnt/Ca^{2+} signalni put koji su neovisni o β-kateninu (44).

Aktivacija kanonskog Wnt signalnog puta vezana je uz malignu transfomaciju, kao i gubitak međustanične adhezije i metastaziranje tumora (45–47). Wnt/β-katenin signalni put aktivira se vezanjem kanonskih Wnt liganda (WNT1, WNT3a, WNT8) za transmembranski Frizzled (Fz) receptor te za njegov koreceptor LRP5 ili LRP6 (engl. low-density lipoprotein receptor related protein). Nakon formiranja kompleksa Wnt-Fz-LRP5/6, za njega se veže protein Dishevelled (Dvl) što u konačnici dovodi do fosforilacije LRP5/6 koreceptora pomoću fosfokinaza GSK3β (engl. Glycogen synthase kinase 3β) i CK1 (engl. Casein kinase 1). Time se raspada unutarstanični proteinski kompleks koji se sastoji od Aksina, Adenomatozne-polipoze-kolona (APC prema eng. Adenomatous polyposis coli), GSK3 i CK1. Ovaj proteinski kompleks u uvjetima bez kanonske Wnt stimulacije drži zarobljenim β-katenin što dovodi do njegove fosforilacije, ubikvitinacije i razgradnje. Prilikom kanonske Wnt stimulacije fosforilacijom aktiviran LRP5/6 koreceptor na sebe veže aksin, koji se također može vezati i za Dvl. Tim vezanjem aksin se uklanja iz destrukcijskog kompleksa što omogućuje nakupljanje β-

katenina u citoplazmi i naposljetku njegov prijenos u jezgru. U jezgri se β-katenin veže za LEF/TCF (engl. lymphoid enhancer factor/ T cell factor) obitelj traskripcijskih faktora, čime se aktivira ekspresija ciljnih gena(48,49) (*Slika 1.)*.



Slika 1. Kanonski Wnt/β-katenin signalni put: a) inaktiviran, b) aktiviran.
Preuzeto i prilagođeno iz izvora: https://www.nature.com/articles/s41698-018-0049-y

Osim kao transkripcijski čimbenik, β-katenin ima ulogu i u formiranju međustaničnih spojeva jer stvara proteinski kompleks s E-kadherinom i omogućava njegovu stabilizaciju na membrani stanica, a prilikom aktivacije i translokacije β-katenina u jezgru dolazi do slabljenja međustaničnih veza. β-katenin također promovira transkripciju proteina koji inhibiraju transkripciju E-cadherina i pridonose njegovoj razgradnji čime se promovira metastaziranje tumora (50–52). Kanonski signalni put Wnt tj. disregulacija njegovih ključnih komponenti povezana je i jasno dokumentirana sa razvojem tumora različitih

primarnih sijela kao što su gastrointestinalni tumori (kolorektalni karcinom, kolangiokarcinom, karinom pankreasa, hepatocelularni karcinom, karcinom želuca), hematološke maligne bolesti, karcinom dojke, epitelni i respiratorni tumori (53–57). Uloga Wnt signalnog puta u razvoju karcinoma želuca dobro je dokumentirana kod intestinalnog podtipa, dok su podaci o genskim promjenama u difuznom podtipu manje kompletirani. U do sada provedenim istraživanjima kod difuznog podtipa promjene u izraženosti proteina Wnt signalnog puta vezane su uz nepovoljne prognostičke faktore i uznapredovalu bolest (58,59).

1.4 Secreted Frizzled-related proteins (SFRP)

Secreted Frizzled-related proteins (SFRP) velika su obitelj ekstracelularnih sekretornih topivih inhibitora Wnt signalnog puta koji djeluju vežući se direktno za Wnt ligand ili Frizzled (Fz) receptore.

Do danas je otkriveno pet članova SFRP obitelji kod sisavaca pa tako i kod ljudi, nazvanih SFRP1-5 (60). Prvi otkriveni član obtelji SFRP 1996. bio je SFRP3 tada nazvan FrzB (eng. Frisbee). SFRP3 je prvotno izoliran kao hondronergični faktor iz hrskavičnog tkiva, a nazvan je FrzB zbog sličnosti koju dijeli sa Fz receptorom (61). Naime, svi proteini iz ove obitelji imaju aminoterminalnu cisteinom bogatu domenu (eng. CRD cystein - rich domain) koja dijeli podudarnost sa Fz proteinima što je logično dovelo do zaključka da SFRP proteini djeluju na Wnt signalni put (60,62). SFRP1 je glikoprotein veličine 35 kDa, gen se nalazi u kromosomskoj regiji 8p12- p11.1 i smatra se da interakcijom sa Wnt ligandom modulira aktivnost signalnog puta (63).

U obitelj antagonista signalnog puta Wnt pripada i SFRP3 koji je mapiran na kromosomu 2q31-33. Gubitak heterozigotnosti kromosoma 2q javlja se u mnogobrojnim karcinomima uključujući i karcinom želuca i to učestalo u uznapredovalim fazama bolesti (64–66).

Gubitak ekspresije proteina SFRP obitelji kao rezultat hipermetilacije promotora dokumentiran je u brojnim istraživanjima različitih vrsta malignih oboljenja kao što su rak prostate, mokraćnog mjehura, bubrega, mezoteliom i dr. (67). U svom istraživanju Zhao i suradnici analizirali su status ekspresije SFRP1 u primarnom karcinomu želuca i njegovu korelaciju sa kliničkim i patološkim parametrima. Rezultati pokazuju potpuni gubitak ekspresije SFRP 1 kao rezultat hipermetilacije promotora, te korelaciju istog sa

uznapredovalom fazom bolesti i lošom prognozom (68). Iako se u većini istraživanja SFRP1 smatra tumor supresorskim genom novija istraživanja nude nove poglede na aktivnost i regulaciju sekretornih Wnt antagonista u različitim tumorskim tkivima. Xavier i suradnici su 2014. demonstrirali da SFRP1 ima kompleksan odgovor u sklopu regulacije signalnog puta Wnt. U mogućnosti je djelovati kao njegov pojačivač ili inhibitor ovisno o staničnom kontekstu, koncentraciji (u nižim koncentracijama stabilizira β-katenin i obrnuto) i uzorku ekspresije Fz receptora (69,70). Qu i suradnici uočili su pojačanu ekspresiju SFRP1 u difuznim karcinomima želuca i njegovu povezanost sa limfnim metastazama i smanjenim ukupnim preživljenjem. Isti autor i suradnici također su analizirali ekspresiju SFRP3 u uzorcima adenokarcinoma želuca, prekanceroznim lezijama i zdravom tkivu želuca. Rezultati su pokazali značajnu ekspresiju SFRP3 u adenokarcinomima intestinalnog tipa i prekanceroznim lezijama (intestinalna metaplazija i displazija) dok se u difuznom tipu ta ekspresija gubi i pozitivno korelira uz stupanj diferenciranosti (71,72). Tako rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na različitu regulaciju ekspresije SFRP ovisno Wnt ligandima prisutnim u različitim stanicama, staničnim odgovorima ovisno o koncentraciji SFRP, različitim afinitetima za vezanje Wnt liganda i sl., te se u tim uvjetima ovisno o ravnoteži svih faktora SFRP mogu ponašati kao tumor supresori ili onkogeni (73).

1.5 Obitelj transkripcijskih faktora TCF/LEF

Obitelj transkripcijskih faktora TCF/LEF u ljudi čine 4 proteina: TCF-1 (TCF7), TCF-3 (TCF7L1), TCF-4 (TCF7L2) i LEF-1 koji posredujući u transkripciji djeluju kao aktivatori ili represori signalnog puta Wnt. Članovi ove obitelji razlikuju se u obliku i funkciji, ali imaju i neke zajedničke karakteristike (74). Svi članovi sadrže četiri konzervirane domene: domena za veznje β-katenina, domena za vezanje na molekulu DNA, regulatorna domena i tzv. karboksi-terminalni „rep", od kojih najviše pažnje pobuđuje domena vezanja β-katenina koja se nalazi na amino kraju te domena za vezanje DNA smještena u središnjem dijelu proteina preko koje se kompleks β-katenin/TCF veže na ciljne gene potičući njihovu transkripciju. β-katenin bio je prvi protein za kojeg je utvrđeno da stupa u interakciju sa proteinima iz obitelji TCF/LEF. U kompleksu β-katenin/TCF β-katenin djeluje kao koaktivator transkripcije dok se čimbenici transkripcije preko svoje domene HMG box (eng. High Mobility Group) vežu na

molekulu DNA. Naime, iako se TCF/LEF transkripcijski faktori izravno vežu na DNA dokazano je da ne mogu samostalno aktivirati transkripciju gena već im je potreban koaktivator. Između domene HMG i vezujuće domene za β-katenin smještena je regulatorna domena CDR (engl. Context-Dependent Regulatory) kojom se ostvaruje interakcija s represorom Groucho/TLE. Kad nema vezanja liganda Wnt, ovi čimbenici preuzimaju ulogu represora transkripcije, dok vezanje β-katenina potiče derepresiju. Karboksi-terminalni „rep" može imati različite oblike, neke inačice proteina sadrže motive koje prepoznaje CtBP (engl. C-terminal Binding Protein) no nije još sasvim jasno koji je funkcionalni učinak vezanja CtBP jer su dosadašnji rezultati kontradiktorni, neki ih autori opisuju kao korepresore transkripcije, dok drugi navode kako proteini CtBP mogu imati ulogu i kao aktivatori i kao represori ovisno o kontekstu događanja u stanici (75–77). Proteini obitelji TCF/LEF transkripcijskih faktora mogu imati doista raznoliko djelovanje, a njihova funkcija (aktivacija ili represija ciljnih gena) ovisi o proteinu-partneru s kojim se u određenom trenutku nalaze u interakciji.

TCF-1 protein kodiran je genom TCF7 (engl. T-Cell Specific Transcription Factor) smještenim na lokusu 5q31.1. Ovaj je protein tijekom embriogeneze snažno izražen u mnogim organima, dok su u odraslom tkivu visoke razine ekspresije zabilježene uglavnom u stanicama koje potječu od T stanične linije. Iako su miševi kojima su inaktivirana oba alela gena TCF7 reproduktivno sposobni, imaju zastoj u diferencijaciji T-limfocita. Relativno slabo izražen fenotip upućuje na nadomještanje aktivnosti TCF7 drugim članovima obitelji TCF/LEF. Ovo je potvrđeno pokusom na miševima kojima su inaktivirana oba alela TCF7 i LEF1 radi čega razvijaju težak fenotip. Također, odrasli miševi koji su homozigoti za mutaciju gena TCF7 s višestruko povećanom vjerojatnošću razvili su adenome mliječne žlijezde i probavnog sustava, što svrstava TCF1 protein u grupu tumor supresora (77–79).

Osim uloge u višestrukim biološkim procesima tijekom embrionalnog razvitka tkiva, pojačana aktivnost TCF/LEF obitelji transkripcijskih faktora je pronađena i u raznim neoplazmama. Provedena su brojna istraživanja u kojima je ispitana razina izraženosti čimbenika transkripcije TCF1 u raznim tipovima tumora uključujući karcinome kolona, bubrega, nekoliko različitih tipova leukemija i limfoma, tumorima mozga,

hondrosarkomima, no do sada nije detaljnije istraživana njihova ekspresija u difuznim karcinomima želuca (80–84).

1.6 Dishevelled

Dishevelled (DVL) je multifunkcionalni fosfoprotein otkriven u mušice roda *Drosophila*. U ljudi su pronađena tri homologa ovog proteina (DVL-1, DVL-2 i DVL-3) koji se sastoje od približno 750 aminokiselina i pokazuju visok stupanj homologije.

Gen Dvl-1 smještan je na 1p36 kromosomu, gen Dvl-2 nalazi se na 17q21, dok je gen za Dvl-3 pozicioniran na 3q27. Iako mehanizam djelovanja proteina DVL još nije sasvim razjašnjen, oni stupaju u interakciju s mnogim drugim proteinima u stanici što ih upliće u vrlo kompleksnu mrežu interakcija i utjecaja na pozitivnu ili negativnu regulaciju Wnt signalnog puta (85,86).

Postoje dva stanična bazena proteina DVL: jedan koji se premješta u jezgru i drugi koji ostaje u citoplazmi. Poznato je da kad se nalazi u jezgri stupa u interakciju s β-kateninom, koji se nakon premještanja iz citoplazme u jezgru veže na faktore transkripcije TCF/LEF, što dovodi do formiranja već spomenutog stabilnog kompleksa β-katenin/TCF i transkripcijske aktivacije ciljnih gena. Nasuprot tome, DVL koji ostaje u citoplazmi odlazi do plazmatske membrane gdje tvori velike molekularne komplekse nužne za prijenos signala od receptora prema jezgri stanice(86,87). U kanonskom signalnom putu Wnt, DVL se smatra ključnim citoplazmatskim regulatorom koji spašava β-katenin od razgradnje. Vezanjem signalne molekule Wnt na kompleks membranskih receptora Fz-LRP 5/6 (engl. Frizzeled, LDL receptor-related protein 5/6) aktivira se fosfoprotein DVL te dolazi u izravan kontakt s receptorom Fz, što je ključno za fosforilaciju njegova koreceptora (LRP5/6) koju provode isti enzimi odgovorni i za modifikaciju β-katenina, fosfokinaze CK1 i GSK3β. Fosforilacijom se aktivira receptor LRP, za njega se uz kinaze veže i aksin, stoga ne mogu više tvoriti kompleks za razgradnju β-katenina. Dolazi do nakupljanja β-katenina u citoplazmi, prijelaza u jezgru, aktivacije transkripcijskih faktora TCF/LEF i poticanja ekspresije gena *c-myc, c-jun* i *ciklin D1*(88,89). Kao važan segment degradacijskog kompleksa DVL se dovodi u vezu s degenerativnim bolestima i karcinomom.

Dosadašnji podaci o ulozi Dishevelled gena u tumorigenezi su kontroverzni no nekoliko istraživanja pokazalo je njihovu pojačanu ekspresiju u više vrsta karcinoma. U

istraživanju karcinoma pluća nemalih stanica (non small cell lung cancer – NSCLC) verificirana je pojačana ekspresija DVL1, DVL2 i DVL3 proteina, koja je bila statistički značajno jača u adenokarcinomima nego u karcinomima pločastih stanica, a ekspresija DVL1 i DVL3 povezana je s lošijom prognozom u tih pacijenata. Povećana izaženost DVL1 gena evidentirana je i u tumorima dojke, prostate te karcinomu pločastih stanica vrata maternice, dok je DVL2 pojačano izražen u ljudskim gliomima visokog stupnja i hepatocelularnim karcinomima (90–97). Prema našim saznanjima do sada nisu rađena istraživanja izraženosti proteina DVL u karcinomima želuca.

2 HIPOTEZA

Komponente Wnt-signalnoga puta SFRP1, SFRP3, DVL2, DVL3 i TCF-1 uključene su u nastanak i napredovanje difuznih karcinoma želuca, a promjene njihove izraženosti povezane su sa stupnjem uznapredovalosti bolesti.

3 CILJEVI RADA

3.1 Opći cilj

Cilj ovog istraživanja jest istražiti promjene izraženosti proteina obitelji Secreted frizzled-related proteina, Dishevelled i transkripcijskog faktora TCF-1 u difuznim karcinomima želuca u odnosu na zdravo tkivo želuca te usporediti rezultate s kliničkim i patohistološkim parametrima.

3.2 Specifični ciljevi

Specifični ciljevi su:

1) ispitati razinu izraženosti proteina SFRP1 i SFRP3
2) ispitati razinu izraženosti proteina DVL2 i DVL3
3) ispitati razinu izraženosti transkripcijskog fakora TCF-1
4) odrediti međusoban odnos ovih sudionika signalnoga puta Wnt
5) korelirati rezultate s kliničkim i patohistološkim parametrima

4 MATERIJALI I I METODE

4.1 Uzorci tkiva i dokumentacija

U istraživanju su korišteni uzorci tkiva s patohistološkom dijagnozom difuznog karcinoma želuca dobiveni terapijskom gastrektomijom u razdoblju od 1. mjeseca 2009. godine do 9. mjeseca 2015. godine, te zdravo tkivo želuca (kontrolna netumorska skupina) dobiveno endoskopskim biopsijama, a uzeti iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Iz preparata tumorskog tkiva određeni su patohistološka dijagnoza (za preparate do 2014. godine korištena je histološka klasifikacija prema Laurentu, a od početka 2014. klasificirani su i prema histološkoj klasifikaciji prema SZO), lokalizacija tumora, te patološka TNM klasifikacija (pTNM). Uzorci zdravog tkiva također prikupljeni iz arhive potvrđeni su kao zdravo tkivo želuca od strane specijalista patologa.

Iz arhive Klinike za kirurgiju te Klinike za unutrašnje bolesti KBC-a Zagreb korištene su povijesti bolesti pacijenata podvrgnutih gastrekotomiji kako bi se rezultati patohistološkog i imunohistokemijskog ispitivanja mogli uspoređivati sa kliničkim parametrima. Uključeni su pacijenti sa potvrđenom patohistološkom dijagnozom difuznog karcinoma želuca koji su dijagnosticirani i operirani u KBC-u Zagreb u razdoblju od 1. mjeseca 2009. do 9. mjeseca 2015. godine. U navedenom razdoblju izdvojeno je 62 bolesnika koji zadovoljavaju kriterije. Za kontrolnu skupinu predviđeno je također 62 preparata zdrave želučane sluznice. Uzorci tkiva uzeti su prije započinjanja onkološkog liječenja. Tijekom uzimanja uzoraka i pregledom medicinske dokumentacije zabilježeni su demografski podaci (spol i dob) te klinički i patološki parametri (lokalizacija tumora u želucu i TNM stadij bolesti).
Istraživanje je 01. prosinca 2014. dobilo suglasnost Etičkog povjerenstva KBC Zagreb: Klasa: 8.1.-14/93-2, Broj: 02/21/JG.

4.2 Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska analiza korištena je kako bi se ustanovile razine ekspresije i stanična lokalizacija proteina SFRP1, SFRP3, DVL-2, DVL-3 i TCF-1.

4.2.1 Priprema uzoraka za imunohistokemiju

Od uzoraka pohranjenih u parafinskom bloku dobiveni su rezovi debljine 4 μm koji su postavljeni na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Prije imunohistokemijske obrade potrebno je deparafinirati i rehidrirati uzorke. Stakla s uzorcima ostavljena su u termostatu preko noći na temperaturi 58 – 60°C. Nakon vađenja iz termostata stakla su ostavljena 10-ak minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ohladila. Zatim su uzorci provedeni kroz red ksilola u trajanju 2x10 minuta te silazni red alkohola: 100% EtOH 2x5 minuta, 96% EtOH 2x5 minuta i 70% EtOH 5 minuta. Uzorci su isprani destiliranom vodom u trajanju od 5 minuta. Radi demaskiranja epitopa uzorci su zagrijavani u Dako Target Retrieval Solution (Dako Corporation, USA) u vodenoj kupelji 20 minuta. Nakon kuhanja uzorci su ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se postupno ohladili. Ohlađeni uzorci isprani su TBS puferom (eng. Tris-buffered saline) u trajanju 2x5 minuta. Kako bi se blokiralo djelovanje endogene peroksidaze, uzorci su tretirani 3%-tnom otopinom vodikova peroksida u mraku tijekom 20 minuta. Zatim su uzorci isprani TBS puferom u trajanju od 5 minuta.

4.2.2 Imunohistokemija

Nakon opisane pripreme uzorci su tretirani optimalno razrijeđenim primarnim protutijelom preko noći u hladnjaku na temperaturi od 4°C: zečja poliklonalna protutijela SFRP1 (engl. rabbit polyclonal anti-human; clone: sc-13939, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:200), SFRP3 (engl. rabbit polyclonal anti-human; clone: sc-13941, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:200), zečja poliklonalna antitijela DVL-2 (engl. rabbit polyclonal anti-human DVL2; clone: H-75, sc-13974, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:200), DVL3 (engl. rabbit polyclonal anti-human DVL3; clone: G-7, sc-271295, Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:100), primarna monoklonska protutijela TCF1; Santa Cruz Biotechnology, USA, razrjeđenje 1:50). Nakon inkubacije uzorci su isprani TBS puferom u trajanju 2x5 minuta. Za detekciju primarnog protutijela korišten je Dako REAL EnVision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA), a uz uporabu sekundarnog kozjeg protutijela na zečji IgG obilježenog s peroksidazom iz hrena (engl. horse radish peroxidase, HRP). Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta sekundarno protutijelo isprano je TBS puferom u trajanju 2x5 minuta. Za vizualizaciju mjesta imunološke reakcije korištena je otopina

supstrat-kromogen u kojoj funkciju supstrata imaju koncentrirani TrisHCl-pufer i 0.8%-tna otopina vodikova peroksida, a kao kromogen korišten je 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Primjena kompleksa supstrat-kromogen rezultira nastajanjem netopljivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu. Nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta uzorci su isprani vodovodnom, a potom i destiliranom vodom. Uzorci su kontrastirani hematoksilinom 30 sekundi, a potom isprani vodovodnom i destiliranom vodom. Na kraju obrade uzorke je potrebno dehidrirati provođenjem kroz uzlazni red alkohola: nekoliko urona u 70% EtOH, nekoliko urona u 96% EtOH, 1 minutu u 100% EtOH I i 2 minute u 100% EtOH II. Bistrenje preparata provodi se kroz red ksilola u trajanju 2x10 minuta. Obrada završava pokrivanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje. Negativna kontrola bio je uzorak koji nije tretiran primarnim protutijelom.

4.3 Stereološka 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, 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:

$$„n“ = (200/y \bullet s/x)2$$

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. 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 brojale su se SFRP1, SFRP3, DVL-2, DVL-3 i TCF-1 pozitivne stanice u normalnom zdravom tkivu želuca i tumorskom tkivu, nakon čega je slijedilo izračunavanje volumenske gustoće. Volumenska gustoća (Vv) je relativna stereološka varijabla koja pokazuje koliki dio sveukupnog prostora zauzima proučavana faza ili koliki je postotak proučavane faze u jedinici volumena.

Volumenska gustoća je bez dimenzije. Volumenska gustoća (Vv) je izračunata prema formuli:

$$Vv = Pf/Pt$$

Pf = broj pogodaka testnih točaka na proučavanu fazu

Pt = broj svih testnih točaka unutar testnog polja

Također, pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sistema brojale su se SFRP1 i SFRP3 pozitivne stanice u normalnom zdravom tkivu želuca i tumorskom tkivu, nakon čega je slijedilo izračunavanje numeričke gustoće. Numerička gustoća (Nv) je relativna stereološka varijabla koja nam daje podatak o broju čestica u jedinici prostora (mm3). Broj profila čestica u ravnini presjeka (NA) je razmjeran produktu njihove numeričke gustoće (Nv) i njihovog prosječnog tangentnog promjera D što se vidi iz jednadžbe:

$$NA = Nv \bullet D$$

Iz nje možemo izraziti numeričku gustoću:

$$Nv = NA/D$$

Nakon što su prebrojeni profili čestica (N) na testnom arealu (At) izračunat je njihov kvocijent NA=N/At, te uvršten u prethodnu formulu, pa se dobiva slijedeće:

$$Nv = N/At \bullet D$$

Prosječni tangentni promjer izračunat je pomoću Elipse 3D programa i on za 100 stanica iznosi D=0,0054 mm, a površina testnog areala 0,0837 mm2. Koristeći ove vrijednosti izračunata je numerička gustoća pozitivnih stanica u patohistološkim preparatima želuca.

4.4 Semikvantitativna analiza

Evaluacija imunohistokemijske reakcije provedena je određivanjem imunoreaktivnog skora, kako su predložili Remmele i Stegner: IRS (immunoreactive score) = SI (staining intensity) x PP (percentage of positive cells). SI je definiran kao 0, negativan; 1, slab; 2, umjeren; i 3, jak. PP je definiran kao 0, negativan; 1, do 10% pozitivnih stanica; 2, 11 – 50% pozitivnih stanica; 3, 51 – 80% pozitivnih stanica; i 4, više od 80% pozitivnih stanica. Analizirano je deset vidnih polja povećanja 400x iz različitih dijelova svakog uzorka.

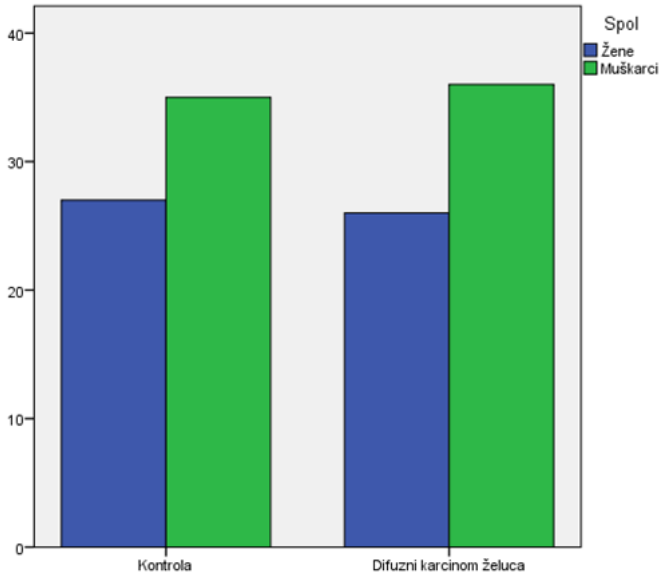
4.5 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka izvršena je uporabom SPSS statističkog software-a (IBM Corp., Armonk, NY, SAD). Normalnost raspodjele podataka analizirana je Shapiro-Wilkovim testom. Podaci su prikazani kao frekvencije (n) i postoci (%) te kao srednja vrijednost sa standardnim odstupanjima (± SD) odnosno medijan s interkvartalnim rasponom (IQR, ebgl. Interquartal range). Usporedba varijabli između grupa izvršena je pomoću t testa ili Mann-Whitneyevog testa za parametrijske, odnosno neparametrijske kontinuirane varijable te Pearsonovim $\chi 2$ testom za kategorijske varijable. Korelacija između dobivenih vrijednosti izvršena je uporabom Pearsonovog korelacijskog testa. $P < 0,05$ smatrao se statistički značajnim.

5 REZULTATI

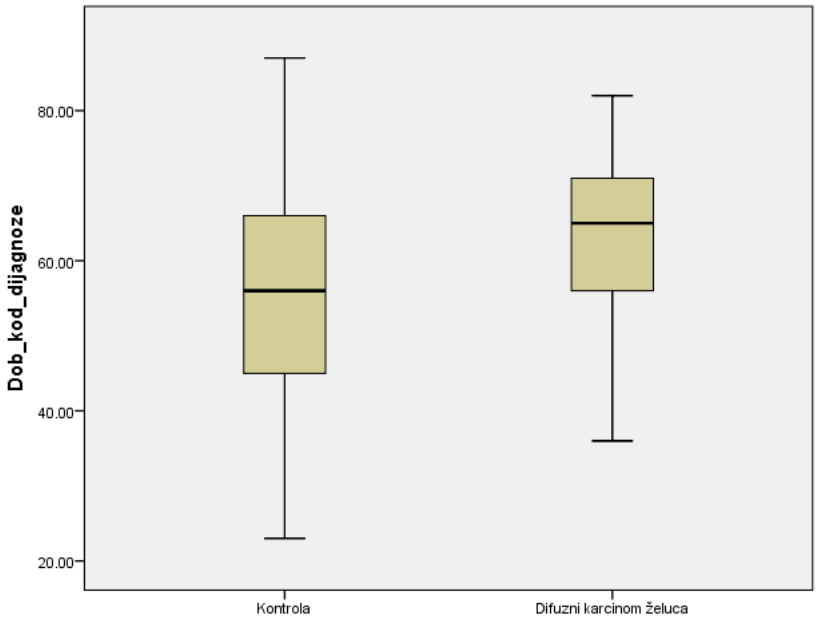
5.1 Demografske karakteristike ispitanika

U ovom radu analizirano je 62 uzoraka difuznih karcinoma želuca i 62 uzoraka kontrolnog zdravog tkiva želuca. Od ukupnog broja bolesnika obuhvaćenih ovim istraživanjem bilo je 53 (42,7%) žena i 71 (57,3%) muškarac. Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodijeli ispitanika s obzirom na spol (Pearson $\chi 2 = 0{,}033$, P= 1,000). Među pacijentima s difuznim karcinomom želuca bilo je 26 (41,9) žena i 36 (58,1%) muškaraca, a kontrolnu skupinu činilo je 27 (43,5 %) žena i 35 (56,5%) muškaraca *(Slika 2.)*.



Slika 2. Prikaz broja ispitanika s obzirom na spol

Srednja ukupna starosna dob bila je 54.58 ± 15.65 godine. Srednja starosna dob za žene bila je 57,83 ± 14.27 godina, dok je za muškarce srednja starosna dob bila 59.55 ± 14.47 godina. Utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji starosti između pacijenata s difuznim karcinomom želuca i kontrolne skupine ispitanika (kontrolni ispitanici: 54.58 ± 15.65; pacijenti: 63.13 ± 11.50; T test, P = 0,001) *(Slika 3.)*.



Slika 3. Raspodjela ispitanika s obzirom na dob

5.2 Patohistološke i kliničke karakteristike

U *Tablici 2.* prikazane su lokalizacija i patološka TNM klasifikacija tumora, te klinička TNM klasifikcija i klinički stadij bolesti. Od ukupno 62 ispitanika, 5 ispitanika bila su u kliničkom stadiju I bolesti (8.1%), 1 ispitanik u kliničkom stadiju IIA (1.6%), 4 ispitanika u kliničkom stadiju IIB (6.5%), 32 ispitanika u kliničkom stadiju III (51.6%), 2 ispitanika u kliničkom stadiju IVA (3.2%), 17 ispitanika u kliničkom stadiju IVB (27,4%) prilikom postavljanja dijagnoze, dok se za jednog ispitanika nisu mogli izdvojiti podaci. Od ukupnog broja ispitanika, 51 ispitaniku (82,3%) dijagnosticirana je bolest u uznapredovaloj fazi bolesti tj. kliničkim stadijima III i IV.

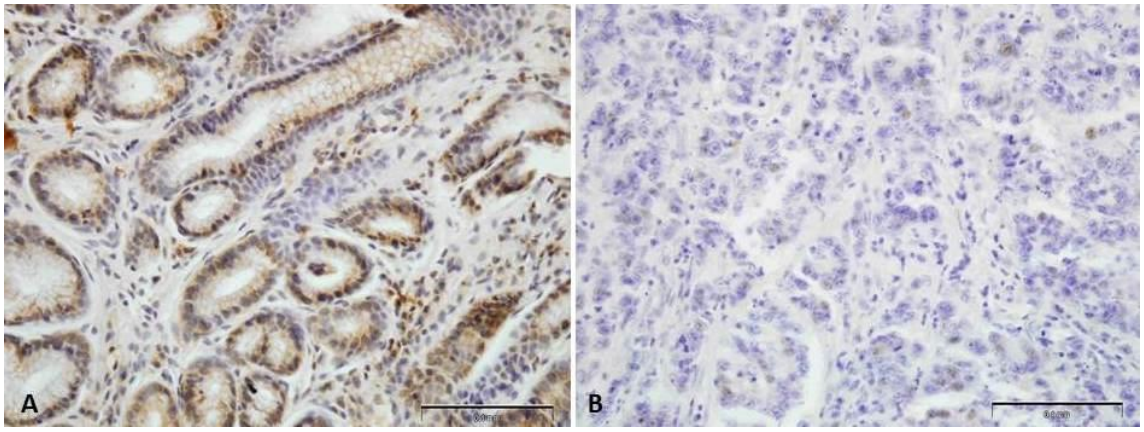
Tablica 2. Patohistološke i kliničke karakteristike ispitanika

Redni broj	Lokalizacija tumora	pTNM	kTNM	Klinički stadij bolesti
1	distalni želudac	pT3N0MX	T3N0M0	IIB
2	distalni želudac	pT4bN2MX	T4bN2M1	IVB
3	distalni želudac	pT4aN1MX	T4aN1M0	III
4	distalni želudac	pT4bN0MX	T4bN2M1	IVB
5	distalni želudac	pT3N1MX	T3N1M0	III
6	prosimalni želudac	pT3N3aMX	T3N3aM0	III
7	distalni želudac	pT3N3bM1	T3N3bM1	IVB
8	distalni želudac	pT3N2MX	T3N2M0	III
9	distalni želudac	pT3N0MX	T4aN0M0	IIB
10	distalni želudac	pT3N0MX	T3N0M0	IIB
11	distalni želudac	pT3N0MX	T3N0M0	IIB
12	proksimalni želudac	pT3N1MX	T3N1M0	III
13	distalni želudac	pT4aN3aMX	T4aN3aM1	IVB
14	distalni želudac	pT3N1MX	T3N1M0	III
15	distalni želudac	pT3N3aMX	T3N3aM0	III
16	distalni želudac	pT3N3aMX	T4aN3aM0	III
17	distalni želudac	pT1aN0X	T1aN0M0	I
18	distalni želudac	pT3N3bMX	T4aN3bM1	IVB
19	distalni želudac	pT2N0MX	T2N0M0	I
20	distalni želudac	pT4aN3aMX	T4aN3aM1	IVB
21	proksimalni želudac	pT3N3bMX	T4bN3bM0	IVA
22	distalni želudac	pT3N0MX	T3N3bM0	III
23	distalni želudac	pT3N2MX	T3N2M0	III
24	distalni želudac	pT3N2MX	T3N2M0	III
25	proksimalni želudac	pT3N2MX	T4aN2M0	III
26	distalni želudac	pT3N1MX	T3N2M0	III
27	proksimalni želudac	pT1aN0MX	T1aN0M0	I
28	distalni želudac	pT3N2Mx	T3N2M0	III
29	distalni želudac	T3N1Mx	T3N1M0	III
30	distalni želudac	pT3N1Mx	T3N1M0	III
31	distalni želudac	pT3N0M0	T3N0M0	III
32	distalni želudac	pT4aN3bMX	T4aN3bM1	IVB
33	distalni želudac	pT1bNoMx	T1bN0M0	I
34	distalni želudac	pT1bN3aMx	T1bN3aM0	IIA
35	distalni želudac	pT1aN0Mx	T1aN0M0	I
36	proksimalni želudac	pT4N2MX	T4aN2M0	III
37	distalni želudac	pT4bN2MX	T4bN2M1	IVB
38	distalni želudac	pT4aN1MX	T4aN1M0	III
39	distalni želudac	pT3N2MX	T3N1M0	III
40	bataljak želuca	pT4bN1Mx	T4bN1M0	IVA

Redni broj	Lokalizacija tumora	pTNM	kTNM	Klinički stadij bolesti
41	distalni želudac	pT3N3bM1	T3N3bM1	IVB
42	distalni želudac	pT3N3bMx	T3N3bM0	III
43	distalni želudac	pT4aN1MX	T4aN1M0	III
44	distalni želudac	pT4aN2MX	T4aN2M0	III
45	distalni želudac	pT4aN0MX	T4aN0M0	IIB
46	proksimalni želudac	pT3N3aMx	T3N3aM0	III
47	distalni želudac	pT4bN3aM1	T4bN3aM1	IVB
48	distalni želudac	pT3N1MX	T3N1M0	III
49	distalni želudac	pT4aN3MX	T4aN3M1	IVB
50	distalni želudac	pT4bN3bM1	T4bN3bM1	IVB
51	distalni želudac	pT3N1Mx	T3N1M0	III
52	distalni želudac	pT3N3aMx	T3N3M0	III
53	distalni želudac	pT4aN0MX	T4aN0M0	III
54	distalni želudac	pT4a N0 Mx	T4aN0M0	III
55	distalni želudac	pT4aN3bMX	T4aN3bM1	IVB
56	distalni želudac	pT3N1M1	T3N1M1	IVB
57	distalni želudac	pT3N1MX	T3N1M0	III
58	distalni želudac	pT3N3aMX	T3N3M0	III
59	distalni želudac	pT3N3bMX	T3N1M1	IVB
60	distalni želudac	pT3N1MX	T3N1M0	III
61	proksimalni želudac	p4aN0MX		
62	distalni želudac	pT4bN3aM1	T4bN3aM1	IVB

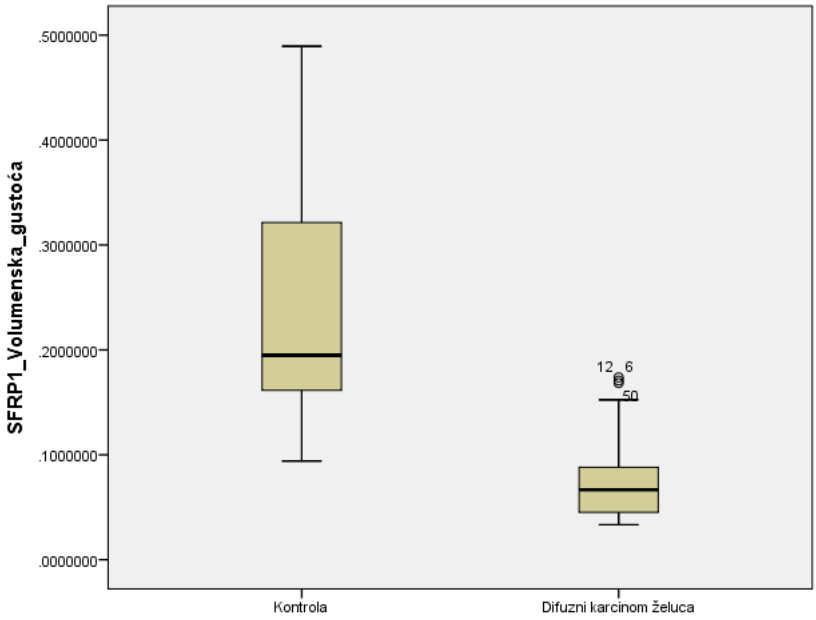
5.3 Razina izraženosti proteina SFRP1 i SFRP3

Imunohistokemijska analiza SFRP1 i SFRP3 proteina prikazala je razinu izraženosti i staničnu lokalizaciju oba proteina. U zdravom tkivu želuca SFRP1 protein bio je lokaliziran u citoplazmi žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu lokalizacija je također bila citoplazmatska, a ponekad se izraženost mogla primijetiti i u jezgri. Kvantitativna analiza SFRP1 proteina otkrila je statistički značajnu razliku u broju SFRP1 pozitivnih stanica u zdravom tkivu želuca u odnosu na tumorsko tkivo ($p< 0, 05$) . Količina izraženosti SFRP1 proteina u zdravom tkivu bila je viša u usporedbi s tumorskim tkivom *(Slika 4.).* Postotak SFRP1 pozitivnih tumorskih stanica nije statistički značajno korelirao s kliničkim i patološkim parametrima.



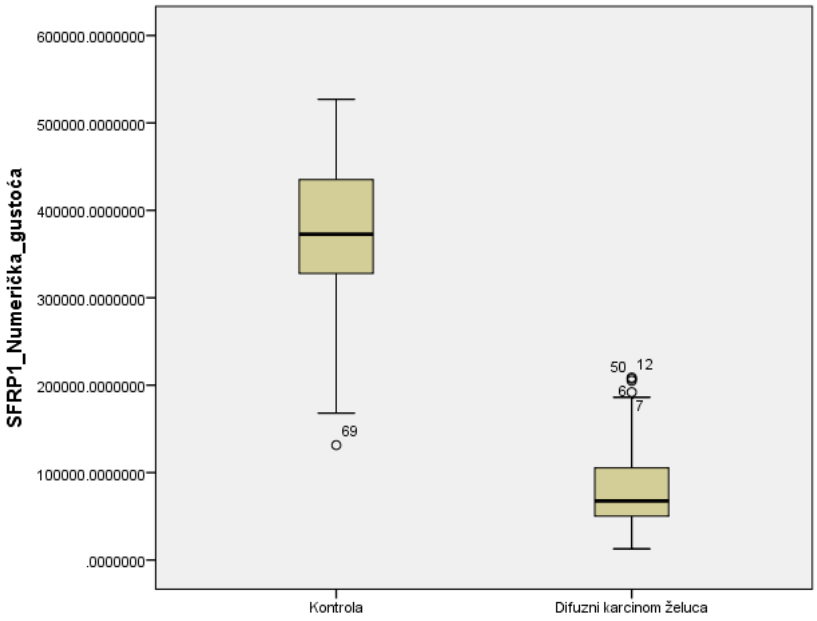
Slika 4. Izraženost proteina SFRP1 u zdravom tkivu želuca (A) i difuznom karcinomu želuca (B)

Stereološka kvantitativna analiza pokazala je statistički značajnu razliku u volumetrijskoj gustoći SFRP1 proteina između pacijenata i kontrolne skupine ispitanika [medijan (IQR, engl. interquartal range): Pacijenti: 0,067 (0.045-0,088); kontrolni ispitanici: 0,195 (0,16-0,32); Mann-Whitney test; P < 0,001 (4,1749E-19)] *(Slika 5.)*.



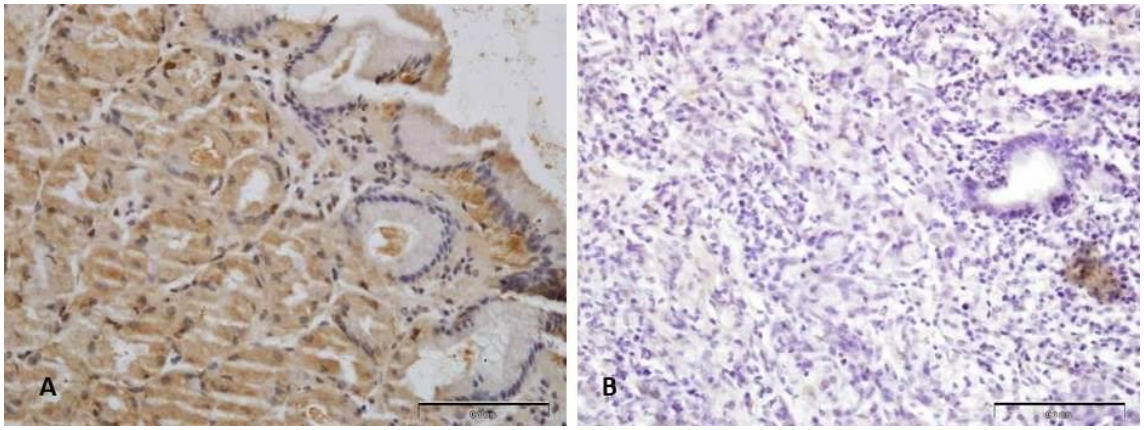
Slika 5. Prikaz volumenske gustoće SFRP1 proteina u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

Statistički značajna razlika zabilježena je i u numeričkoj gustoći SFRP1 proteina između pacijenata i kontrolne skupine ispitanika [medijan (IQR): Pacijenti: 67516.88 (49371.91-105720.87); kontrolni ispitanici: 372732,072 (325775.89-437725.94); Mann-Whitney test; P < 0,001 (2,.3041E-21)] *(Slika 6.).*



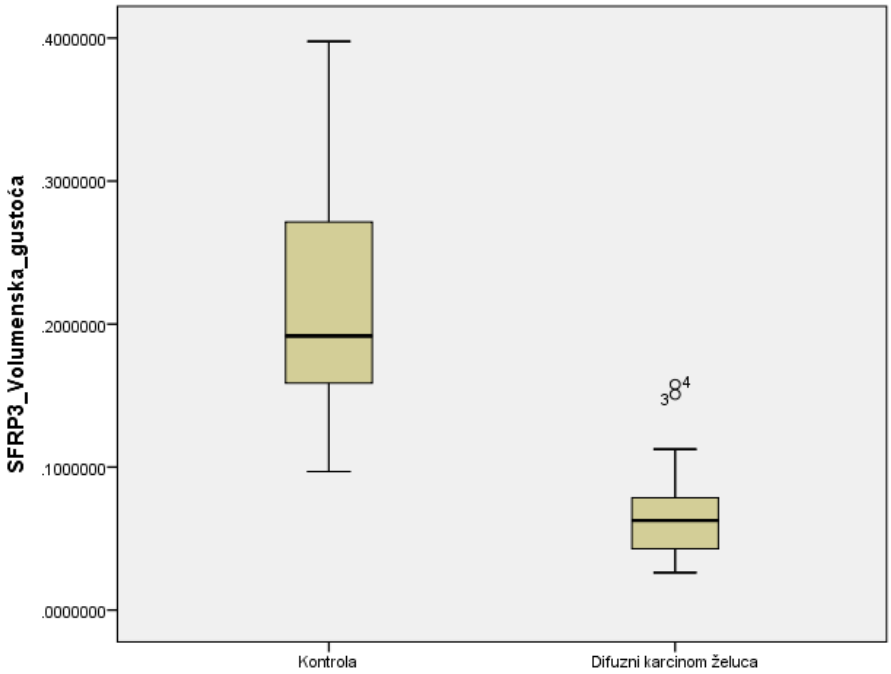
Slika 6. Prikaz numeričke gustoće SFRP1 proteina u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

Analizom SFRP3 u zdravom tkivu želuca subcelularna lokalizacija proteina nađena je u citoplazmi i membrani žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu lokalizacija je također bila citoplazmatska, a ponekad i nuklearna. Nađena je statistički značajna razlika u broju SFRP3 pozitivnih stanica zdravog tkiva i tumora (p< 0, 05). Količina izraženosti SFRP3 proteina u zdravom tkivu bila je viša u usporedbi s tumorskim tkivom *(Slika 7)*. Zanimljivo je da postoji statistički značajna razlika u izraženosti SFRP1 i SFRP3 u tumorskom tkivu želuca. Izraženost SFRP3 je značajno manja u odnosu na ekspresiju SFRP1 u uzorcima tumora, dok je izraženost istih proteina u zdravom tkivu gotovo podjednaka. Taj podatak upućuje da je gubitak izraženosti SFRP3 važno obilježje difuznih karcinoma želuca. Postotak SFRP3 pozitivnih tumorskih stanica nije statistički značajno korelirao s kliničkim i patološkim parametrima.



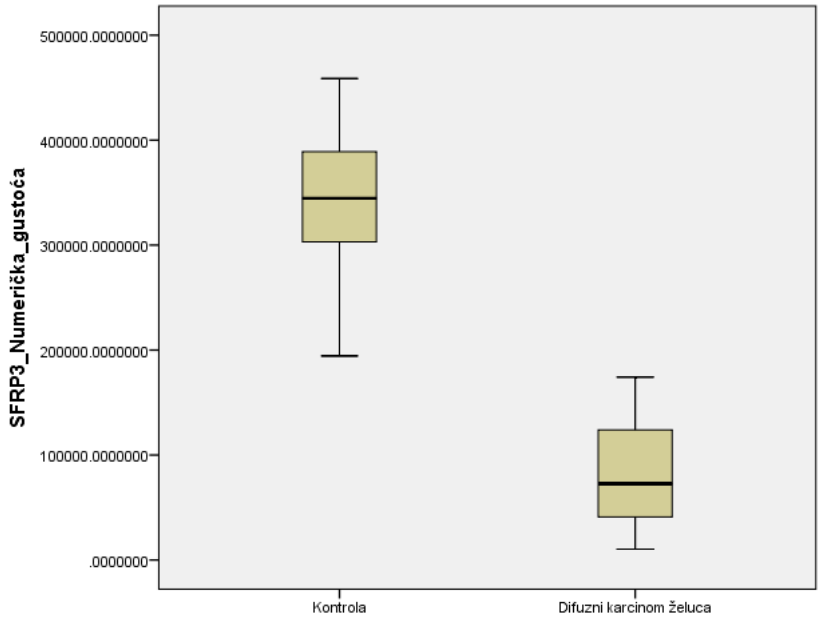
Slika 7. Izraženost proteina SFRP3 u zdravom tkivu želuca (A) i difuznom karcinomu želuca (B)

Stereološka kvantitativna analiza pokazala je statistički značajnu razliku u volumetrijskoj gustoći SFRP3 proteina između pacijenata i kontrolne skupine ispitanika [medijan (IQR, engl. interquartal range): Pacijenti: 0,063 (0.043-0,079); kontrolni ispitanici: 0,192 (0,16-0,27); Mann-Whitney test; P < 0,001 (3.5261E-21)] *(Slika 8.)*.



Slika 8. Prikaz volumenske gustoće SFRP3 proteina u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

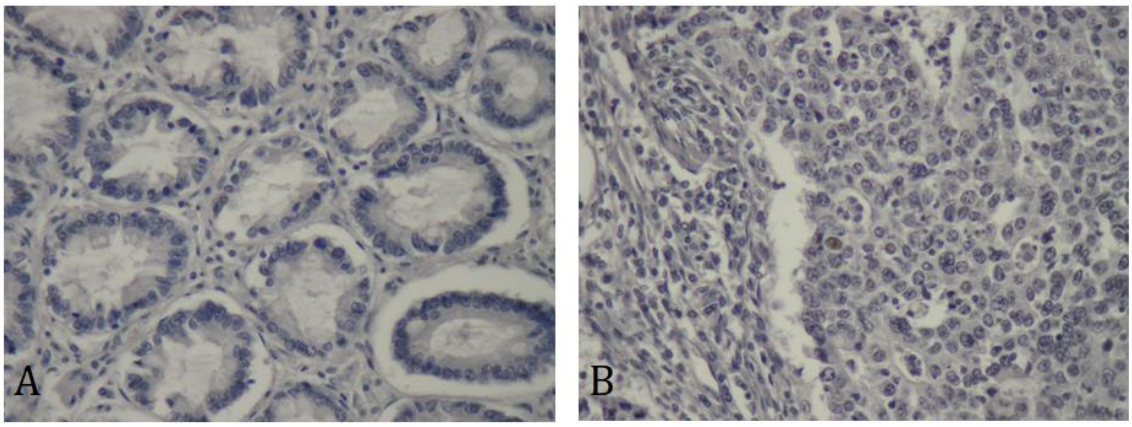
Statistički značajna razlika zabilježena je i u numeričkoj gustoći SFRP3 proteina između pacijenata i kontrolne skupine ispitanika [medijan (IQR): Pacijenti: 72657.053 (40774.082- 124892.33); kontrolni ispitanici: 344669.50 (300769.64- 390305.91); Mann-Whitney test; P < 0,001 (7.6103E-22) *(Slika 9.)*.



Slika 9. Prikaz numeričke gustoće SFRP1 proteina u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

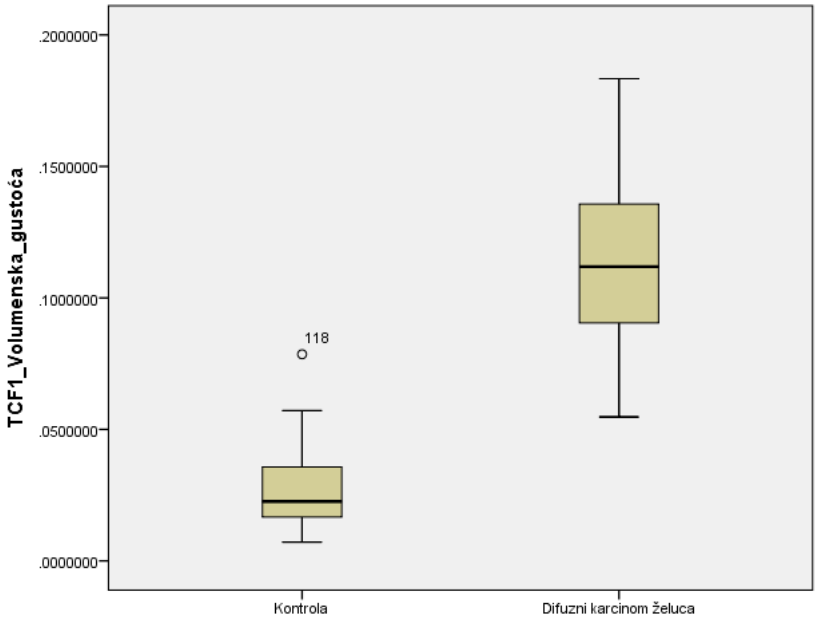
5.4 Razina izraženosti proteina TCF-1

U zdravom tkivu želuca subcelularna lokalizacija TCF-1 proteina nađena je u jezgri žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu lokalizacija je također bila nuklearna. Nađena je statistički značajna razlika u broju TCF-1 pozitivnih stanica zdravog tkiva i tumora (p< 0,05). Količina izraženosti TCF-1 proteina u zdravom tkivu bila je niža u usporedbi s tumorskim tkivom *(Slika 10.)*. Taj podatak upućuje da je povećanje izraženosti TCF-1 proteina važno obilježje difuznih karcinoma želuca.



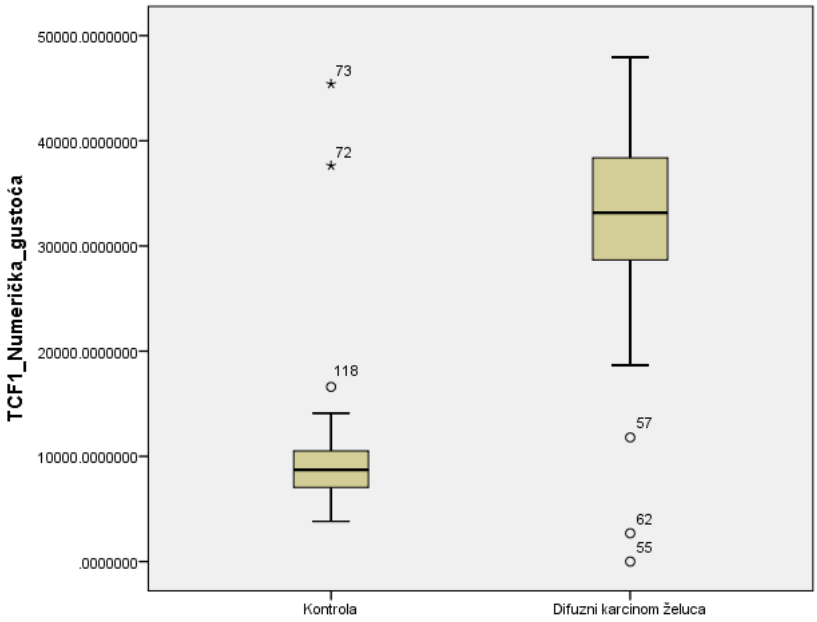
Slika 10. Izraženost proteina TCF1 u zdravom tkivu želuca (B) i difuznom karcinomu želuca (B)

Stereološka kvantitativna analiza pokazala je statistički značajnu razliku u volumetrijskoj gustoći TCF1 proteina između pacijenata i kontrolne skupine ispitanika [medijan (IQR, engl. interquartal range): Pacijenti: 0,112 (0.091-0,136); kontrolni ispitanici: 0,023 (0,017-0,036); Mann-Whitney test; P < 0,001 (1.0726E-21)] *(Slika 11.)*.



Slika 11. Prikaz volumenske gustoće TCF1 proteina u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

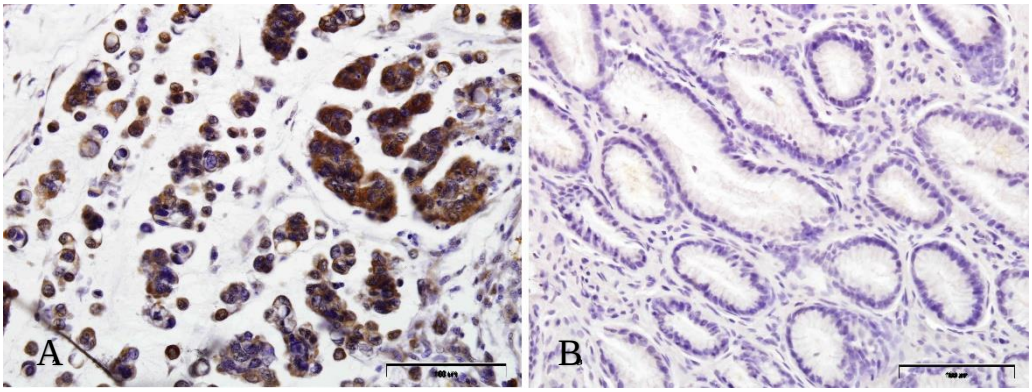
Statistički značajna razlika zabilježena je i u numeričkoj gustoći TCF1 proteina između pacijenata i kontrolne skupine ispitanika [medijan (IQR): Pacijenti: 33154.122 (28636.50- 38381.123); kontrolni ispitanici: 8721.625 (6989.247- 10513.739); Mann-Whitney test; P < 0,001 (2.6928E-17)] *(Slika 12.)*.



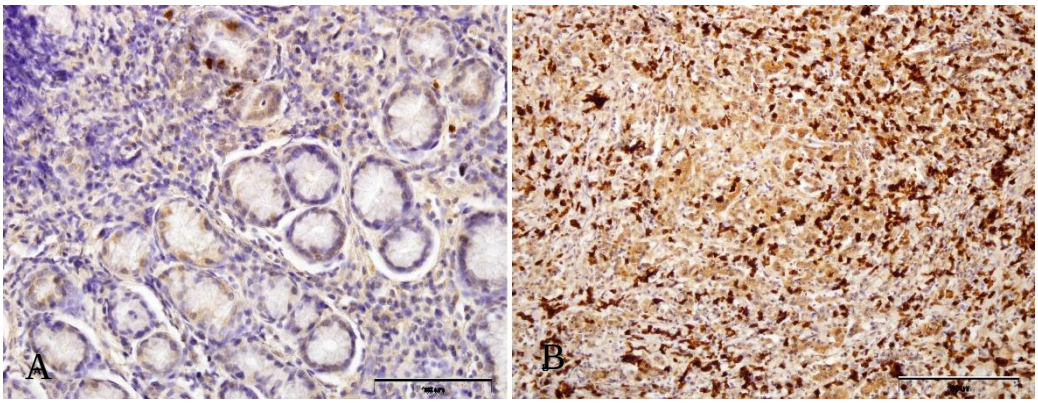
Slika 12. Prikaz numeričke gustoće TCF1 proteina u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

5.5 Razina izraženosti proteina DVL2 i DVL3

Imunohistokemijskom analizom izraženost DVL2 i DVL3 proteina u zdravom tkivu želuca nađena je u citoplazmi žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu izraženost je također bila citoplazmatska, a ponekad se mogla učiti i u jezgri *(Slika 13. i Slika 14.)*.

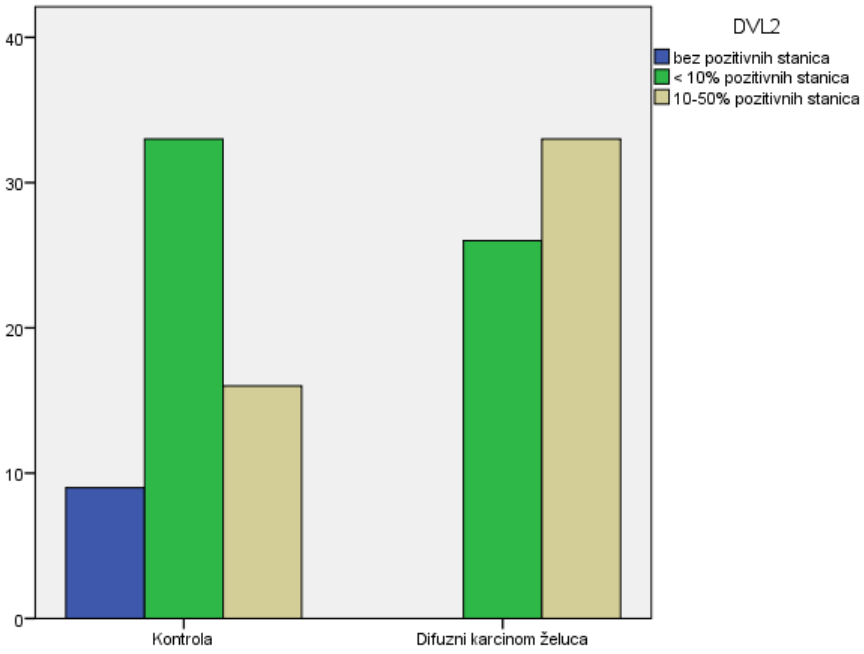


Slika 13. Izraženost proteina DVL2 u difuznom karcinomu želuca (A) i zdravom tkivu želuca (B)

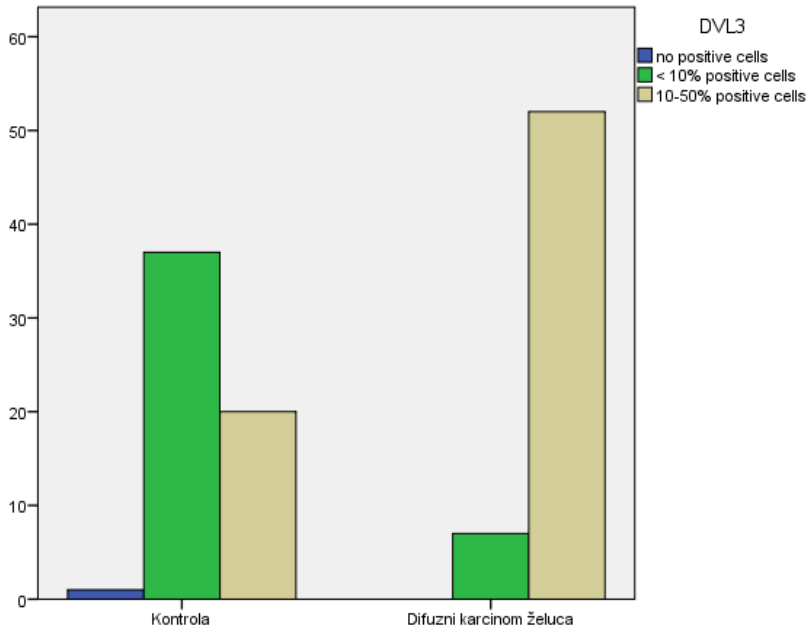


Slika 14. Izraženost proteina DVL3 u zdravom tkivu želuca (A) i difuznom karcinomu želuca (B)

Za oba proteina, DVL2 i DVL3, nađena je statistički značajna razlika u izraženosti proteina u tumorskom tkivu u odnosu na kontrolne uzorke tkiva. Postotak DVL2 i DVL3 pozitivnih tumorskih stanica nije statistički značajno korelirao s kliničkim i patološkim parametrima. Statistički značajno povišena izraženost proteina DVL2 nađena je u tumorskom tkivu (Pearson $\chi 2 = 15{,}721$, $P = 0{,}0002$) pacijenata s difuznim karcinomom želuca *(Slika 15.)*. Značajno povišena [Pearson $\chi 2 = 35{,}67$, $P < 0{,}001$ (1.9148E-9)] izraženost u tumorskom tkivu utvrđena je i za DVL3 protein *(Slika 16.)*.



Slika 15. Izraženost DVL2 proteina u zdravom tkivu želuca i difuznom karcinomu želuca



Slika 16. Ekspresija DVL3 proteina u zdravom tkivu želuca i difuznom karcinomu želuca

5.6 Korelacijska analiza izraženosti ispitanih proteina

Korelacijska analiza podataka uporabom Pearsonovog korelacijskog testa pokazala je pozitivnu korelaciju (rast vrijednosti jedne varijable prati rast vrijednosti druge varijable, odnosno pad vrijednosti jedne varijable prati pad vrijednosti druge varijable) proteina SFRP1 i SFRP3 ($r=0.527$, $p<0.01$), TCF-1 i DVL2 ($r=0.352$, $p<0.01$), TCF-1 i DVL3 ($r=0.515$, $p<0.01$), a negativnu korelaciju (rast jedne varijable prati pad druge varijable i obrnuto): SFRP1 i TCF-1($r= -0.857$, $p<0.01$), SFRP1 i DVL2 ($r= -0.209$, $p<0.05$), SFRP1 i DVL3 ($r= -0.390$, $p<0.01$), SFRP3 i TCF-1 ($r= -0.712$, $p<0.01$), SFRP3 i DVL2 ($r= -0.252$, $p<0.01$), SFRP3 i DVL3 ($r= - 0.431$, $p<0.01$).

Također je utvrđena pozitivna korelacija izraženosti TCF-1 u tumorima s dobi pacijenata ($r=0.352$, $p<0.01$) i negativna korelacija izraženosti SFRP3 u tumorima s dobi pacijenata ($r= -0.239$, $p<0.01$).

Nije pronađena statistički značajna korelacija izraženosti proteina SFRP1, SFRP3, TCF-1, DVL2 i DVL3 s kliničkim i patohistološkim varijablama.

6 RASPRAVA

Adenokarcinomi želuca, među koje spada i difuzni karcinom želuca, predstavljaju skupinu najčešćih malignih oboljenja u svijetu, a čine preko 90% svih primarnih tumora želuca. Unatoč činjenici da unazad posljednjih nekoliko desetljeća pratimo značajan pad incidencije karcinoma želuca te svjedočimo napretku u dijagnostici, kliničkoj i molekularnoj onkologiji, u slučaju adenokarcinoma želuca, a naročito difuznih karcinoma želuca, u posljednjih nekoliko desetljeća nije postignut značajan pomak u povećanju petogodišnje stope preživljenja (98). S obzirom na prirodu bolesti koja u svojoj ranoj fazi ima najčešće asimptomatsku sliku, dijagnosticirani tumori uglavnom su uznapredovalog kliničkog stadija, što uvjetuje lošu prognozu čak i nakon kirurškog liječenja i adjuvantne kemoterapije. Izuzetak čine Japan i Južna Koreja, zemlje sa programom masovnog probira gdje se detekcijom u ranom stadiju bolesti koja doseže i 50%, te pravovremenim liječenjem, dostiže petogodišnja stopa preživljenja i preko 90% (99). S obzirom na imperativ rane detekcije u liječenju ovih bolesnika, a značajan stupanj invazivnosti sadašnjih tehnika ranog otkrivanja koje podrazumijevaju napredne endoskopske metode, očita je potreba za razvojem novih, neinvazivnih testova i otkrivanjem biomarkera visoke specifičnosti. Neki od trenutno najčešće korištenih tumorskih biljega u kliničkoj praksi kao što su karcinoembrionalni antigen (CEA), karbohidratni antigeni (CA19-9, CA72-4, CA125), alfafetoprotein (AFP) i pepsinogen imaju značajno nisku specifičnost i senzitivnost i nisu jedinstveni za karcinom želuca (100). Rezultati projekta TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas) koji je novom molekularnom klasifikacijom podjelio adenokarcinom želuca u 4 podvrste od kojih svaka ima specifične genetske, epigenetske i transkripcijske osobitosti, ukazali su na specifične molekularne biljege i signalne putove odgovorne za nastanak i progresiju ovih tumora te otvorili vrata za razvoj novih biomarkera i ciljanih i individualiziranih terapija. Budući da se klasifikacija i dalje razvija, u tijeku je također i molekularna klasifikacija viših proksimalnih karcinoma na jednjaku i želučanoj kardiji te se očekuje da ona omogući uvid u sličnosti i razlike u odnosu na distalni karcinom želuca (34,101). Neki od novih biomarkera poput mikroRNA (eng. micro ribonucleic acid, miRNA) pokazuju obećavajuće rezultate i sve veću senzitivnost u otkrivanju ranog raka želuca, no istraživanja su još daleko od faze široke upotrebe. Ipak, sve bolje razumijevanje molekularnih čimbenika uključenih u razvoj adenokarcinoma želuca u perspektivi otvara mogućnost razvoja novih biomarkera kako

za rano otkrivanje bolesti, tako i za predviđanje ishoda bolesti i odgovora na liječenje (101,102).

Put prijenosa signala Wnt jedan je od osnovnih mehanizama u signalizaciji stanice, regulaciji stanične proliferacije, diferencijacije, morfologije i pokretljivosti. Velik broj istraživanja potvrdio je ulogu proteina - molekularnih sudionika puta Wnt u embrionalnom razvoju, a poznate su i promjene u signalizaciji u procesu tumorigeneze u brojnim tumorima čovjeka uključujući i karcinome želuca. Promijenjena sposobnost stanica da adherira i komunicira sa susjednim stanicama osnovna je značajka progresije i invazivnosti karcinoma. Mnogobrojnim istraživanjima dokazana je uloga E-kadherina i β-katenina u nastanku i progresiji ovih tumora. Pronađeno je više od 120 naslijeđenih mutacija gena *CDH1* koje mogu dovesti do razvoja nasljednog oblika difuznog karcinoma želuca. Osim njegove uloge u adheziji epitelnih stanica, E - kadherin je uključen u prijenos kemijskih signala unutar stanice, staničnu kontrolu, te regulaciju aktivnosti određenih gena. E – kadherin također djeluje kao tumor supresorski protein, štiti stanice od prebrzog i nekotroliranog rasta i dijeljenja. Mutacijom gena *CDH1* koji kodira E-kadherin, dolazi do stvaranja mutiranog tj. nefunkcionalnog proteina, što može dovesti do popuštanja stanične adhezije, nekotroliranog i brzog rasta stanica zloćudnog tumora. U više istraživanja dokazano je da je smanjena ekspresija E-kadherina povezana s metastazama u limfne čvorove, slabijom diferencijacijom tumora te uznapredovalim stadijem bolesti (104,105). Osim uloge transkripcijskog čimbenika, β-katenin ima ulogu i u formiranju međustaničnih spojeva jer stvara proteinski kompleks s E-kadherinom i omogućava njegovu stabilizaciju na membrani stanica, a prilikom aktivacije i translokacije β-katenina u jezgru dolazi do slabljenja međustaničnih veza. β-katenin također promovira transkripciju proteina koji inhibiraju transkripciju E-kadherina i pridonose njegovoj razgradnji čime se promovira metastaziranje tumora (50,51). Rezultati meta-analize Li i sur. pokazali su povezanost povećane ekspresije β-katenina sa slabijom diferencijacijom tumora, metastazama u limfne čvorove i udaljenim metastazama, smanjenim ukupnim preživljenjem i histološkim podtipom (difuznim karcinomima)(106).

Uloga drugih važnih molekularnih komponenti Wnt signalnoga puta u genetičkom profilu difuznih karcinoma želuca do danas je još uvijek nedovoljno istražena i nepoznata. Zbog

toga smo odlučili istražiti proteine iz obitelji Secreted frizzled-related proteina, Dishevelled i transkripcijskog faktora TCF-1.

Kvantitativna analiza SFRP1 proteina otkrila je statistički značajnu razliku u broju SFRP1 pozitivnih stanica u zdravom tkivu želuca u odnosu na tumorsko tkivo ($p< 0, 05$). Količina izraženosti SFRP1 proteina u zdravom tkivu bila je viša u usporedbi s tumorskim tkivom tj. u tumorskom tkivu došlo je do gubitka izraženosti SFRP1. Gubitak izraženosti proteina SFRP obitelji dokumentiran je u brojnim istraživanjima različitih vrsta malignih oboljenja, pa tako i u karcinomima želuca. U svom istraživanju Zhao i suradnici 2007. analizirali su status izraženosti SFRP1 u primarnom karcinomu želuca i njegovu korelaciju sa kliničkim i patološkim parametrima. Rezultati su pokazali potpuni gubitak izraženosti SFRP 1 kao rezultat hipermetilacije promotora, te korelaciju istog sa stadijem tumora i statusom limfnih čvorova. S druge strane nije nađena korelacija sa spolom, dobi ili histološkim podtipom tumora (68). Iste godine Nojima i sur. također u svom istraživanju potvrđuju značajnu razinu hipermetilacije u staničnim linijama želučanih karcinoma i uzorcima primarnih tumora uz gubitak proteinske izraženosti SFRP1. Također su utvrdili i da povrat izraženosti SFRP-a atenuira Wnt signalizaciju, inhibira rast stanica i inducira apoptozu tumorskih stanica što potvrđuje hipotezu da gubitak izraženosti SFRP-a pridonosi proliferaciji i invazivnosti stanica karcinoma želuca. Zanimljivo je da je uočena određena razina metilacije i u kontrolnim netumorskim tkivima, no značajno niža nego u tumorskim tkivima što ukazuje na to da je razina metilacije važan faktor u procesu utišavanja gena (eng. gene silencing) (107). Kinoshita i suradnici su 2011. uspoređivali razinu izraženosti SFRP1 i SFRP5 u karcinomima želuca i kontrolnom zdravom želučanom tkivu. Također je uočen značajan gubitak izraženosti SFRP1 i SFRP5 u karcinomima želuca u odnosu na kontrolno netumorsko tkivo. Iako nije verificirana korelacija sa spolom, dobi, histološkim podtipom tumora i stadijem tumora, kod karcinoma sa metastazama u limfne čvorove opservirana je statistički značajna smanjena razina izraženosti SFRP1 (108). Novije istraživanje koje su 2018. objavili Wang i suradnici uspoređivalo je razinu hipermetilacije i gubitak izraženosti mRNA SFRP1 (eng. messenger ribonucleic acid, mRNA) u uzorcima adenoma niskog stupnja displazije (eng. low grade adenoma; LGA), adenoma visokog stupnja displazije (eng. high grade adenoma; HGA), uzorcima karcinoma želuca i zdravom tkivu želuca.

Razina metilacije promotora bila je značajno povišena, a razina izraženosti mRNA SFRP1 značajno snižena u uzorcima HGA i karcinoma želuca u odnosu na LGA i zdravog tkiva želuca, iako nije nađena statistički značajna razlika između skupine HGA i karcinoma. Zanimljiv je podatak i da je u uzorcima HGA i karcinoma želuca bio značajno viši postotak infekcije bakterijom *H.pylori* (109). Slične rezultate objavili su i Yang i sur. u svom radu 2017. koji su uspoređivali razinu metilacije i ekspresije mRNA SFRP1 i nekoliko drugih Wnt antagonista kod *H.pylori* pozitivnih karcinoma želuca, *H.pylori* pozitivnih i negativnih netumorskih kontrola, gdje je razina metilacije bila značajno povišena, a razina izraženosti mRNA značajno snižena u *H.pylori* pozitivnim tumorima u odnosu na druge skupine (110). Rezultati svih ovih istraživanja potvrđuju da epigenetičko „utišavanje" gena Wnt-antagonista hipermetilacijom promotora ima ključnu ulogu u razvoju karcinoma želuca.

Suprotno našim rezultatima, u istraživanju koje je proveo Qu sa suradnicima 2013. godine koje je služeći se Oncomine bazom podataka evaluiralo izraženost SFRP1 na razini mRNA u difuznom karcinomu želuca, lobularnom karcinomu dojke, karcinomu prostate i infiltrativnom karcinomu mokraćnog mjehura uočena je pojačana izraženost SFRP1 u difuznim karcinomima želuca i njegova povezanost sa limfnim metastazama i smanjenim ukupnim preživljenjem (71).

Analizirajući izraženost SFRP3 u našem istraživanju nađena je statistički značajna razlika u broju SFRP3 pozitivnih stanica zdravog tkiva i tumora ($p< 0, 05$). Količina izraženosti SFRP3 proteina u zdravom tkivu bila je viša u usporedbi s tumorskim tkivom. Zanimljivo je da je postojala i statistički značajna razlika u izraženosti SFRP1 i SFRP3 u tumorskom tkivu želuca pri čemu je izraženost SFRP3 bila značajno manja u odnosu na izraženost SFRP1, dok je izraženost istih proteina u zdravom tkivu gotovo podjednaka. Taj podatak mogao bi upućivati na to da je gubitak izraženosti SFRP3 važno obilježje difuznih karcinoma želuca. Nekoliko studija opisalo je ulogu proteina SFRP3 u razvoju i progresiji tumora, iako je uloga SFRP3 u tumorigenezi još uvijek podložna kontroverznim raspravama. SFRP3 je bitan Wnt antagonist koji reducira aktivnost metaloproteinaza, inhibira aktivnost β-katenina i inhibira epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) (67). Qu i suradnici analizirali su izraženost SFRP3 u uzorcima adenokarcinoma želuca, prekanceroznim lezijama i zdravom tkivu želuca. Rezultati su pokazali značajnu izraženost SFRP3 u adenokarcinomima intestinalnog tipa i prekanceroznim lezijama

(intestinalna metaplazija i displazija) dok se u difuznom tipu ta izraženost gubi i pozitivno korelira uz stupanj diferenciranosti (72). Ne postoji drugo opsežno istraživanje koje je ispitivalo funkciju ovog proteina u karcinomima želuca, ali je dokazan povećani gubitak izraženosti ovog proteina i kod adenokarcinoma prostate, pluća, karcinoma bubrega i hepatocelularnog karcinoma, ali i povećana izraženost kod uznapredovalih faza bolesti (66,111-113).

Iako se u većini istraživanja SFRP1 i 3 smatraju tumor supresorskim genima, objašnjenje u kontradiktornim rezultatima moglo bi se naći u novijim istraživanjima koja nude nove poglede na aktivnost i regulaciju sekretornih Wnt antagonista u različitim tumorskim tkivima koji se ovisno o ravnoteži svih faktora mogu ponašati kao tumor supresori ili onkogeni (70,73).

Aktivacija transkripcije signalnog puta Wnt, u prvom je redu posredovana čimbenicima transkripcije iz obitelji TCF/LEF, a njihova funkcija (aktivacija ili represija ciljnih gena) ovisi o proteinu-partneru s kojim se u određenom trenutku nalaze u interakciji. Provedena su brojna istraživanja u kojima je ispitana razina izraženosti čimbenika transkripcije TCF-1 u raznim tipovima tumora, no do sada su istraživanja na primarnim tumorima želuca malobrojna radi čega smo odlučili ispitati izraženost transkripcijskog faktora TCF1 u difuznim karcinomima želuca.

Nađena je statistički značajna razlika u broju TCF-1 pozitivnih stanica zdravog tkiva i tumora ($p< 0,05$). Količina izraženosti TCF-1 proteina u zdravom tkivu bila je niža u usporedbi s tumorskim tkivom, što bi moglo upućivati na to da pokazuje onkogenu aktivnost te da je pojačana izraženost TCF-1 važna karakteristika difuznih karcinoma želuca.

Naši rezultati slažu se i s rezultatima istraživanja Xu i suradnika iz 2019. koji su analizirali izraženost TCF-1 (TCF7) u adenokarcinomima želuca i kontrolnom netumorskom tkivu. Povišena izraženost TCF-1 (TCF7) u tumorskom tkivu korelirala je i s limfatičkom invazijom i metastatskom bolesti te s lošijim ishodom bolesti (114). Ono što autori nisu definirali su histološki podtipovi adenokarcinoma korišteni u analizi te vrsta netumorskog kontrolnog tkiva. Povećana razina izraženosti čimbenika transkripcije TCF-1 pronađena je i u mnogim drugim neoplazmama kao što su leukemije i limfomi, karcinomi bubrega, astrocitni tumori mozga, a detaljnija analiza TCF/LEF transkripcijskih faktora rađena je

i kod kolorektalnih adenokarcinoma kod kojih je dokazana poveznica između aktivnosti duge nekodirajuće RNA TCF1 (engl. long non coding RNA; lncRNA) i vjerojatnosti metastaziranja što je dovelo do novih istraživanja usmjerenih na pronalazak nove specifične, ciljane terapije (115,116). Prema našim saznanjima do sada nije rađena analiza izraženosti TCF-1 specifično u difuznim karcinomima želuca te su potrebna daljnja detaljnija istraživanja koja bi potvrdila eventualnu prognostičku ili terapijsku vrijednost ovih proteina u želučanoj karcinogenezi.

Iako se proteini iz obitelji Dishevelled smatraju središnjim faktorima ovog signalnog puta, funkcionalne posljedice ekspresije proteina DVL u nastanku tumora i dalje nisu u potpunosti razjašnjene. Mnoštvo studija pokazalo je povišenu ekspresiju ovih proteina u velikom broju tumora različitih ishodišta uključujući tumore mozga, pluća, dojke, adenokarcinome kolona, hepatoblastome, limfome i dr. (90,91,117-120). Na temelju tih spoznaja pretpostavili smo da bi se pojačana izraženost DVL2 i DVL3 proteina mogla naći i difuznim karcinomima želuca.

Izraženost DVL2 i DVL3 proteina potvrdila je našu hipotezu. Imunohistokemijskom analizom nađena je statistički značajno jača izraženost DVL2 i DVL3 proteina u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo želuca ($p<0.05$). Na temelju dobivenih rezultata mogli bismo pretpostaviti kako bi aktivacija Wnt signalnog puta i DVL proteina smejštenih nizvodno od signala mogla imati ulogu u nastanku ove vrste karcinoma. U istraživanju Pulvirenti i suradnika 2011. godine, osim pojačane izraženosti DVL2 proteina u ljudskim gliomima, otkriveno je kako je u manjku DVL2 proteina inhibiran nastanak tumora nakon intrakranijalne injekcije stanica glioblastoma u imunodeficijentnog miša (96). U istraživanju koje je 2018. proveo Huang sa suradnicima verificirana je značajno povišena izraženost DVL2 u preko 90% ispitanih uzoraka hepatoblastoma. „Knockdown“ DVL2 u stanicama hepatoblastoma inhibirao je proliferaciju i smanjio invazivnost hepatoblastoma (120). Rezultati ovih istraživanja ukazuju na DVL2 kao potencijalnu metu u razvoju ciljanih terapija.

U studiji koju su Uematsu i sur. proveli na karcinomima nemalih stanica pluća otkrivena je povišena izraženost proteina DVL3 dok povišena izraženost proteina DVL1 i DVL2 nije dokazana (90). Istraživanje koje je proveo Wei sa suradnicima pokazalo je da DVL1 i DVL3 imaju različit utjecaj na razinu β-katenina u karcinomu pluća nemalih stanica.

Nađena je povezanost između pojačane izraženosti DVL1 proteina i β-katenina, a nije nađena statistički značajna povezanost između pojačane izraženosti DVL3 proteina i β-katenina u primarnom tumoru, što bi se moglo ukazivati na to da su Dishevelled proteini medijatori i Wnt puta neovisnog o β-kateninu (91).

S obzirom da je u našem istraživanju tumor u preko 80% analiziranih pacijenata bio dijagnosticiran u kasnom stadiju nije bilo moguće povezati izraženost Dishevelled proteina s TNM statusom tumora. Rezultati drugih istraživanja ipak govore u prilog tome da je povišena razina izraženosti DVL proteina povezana sa progresijom i stadijem tumora. Prema istraživanju koje je proveo Zhang sa suradnicima kod hepatocelularnog karcinoma pojačana izraženost DVL2 proteina povezana je s višim patohistološkim stadijem tumora, prisutnim metastazama i niskim stopama preživljenja (97). U već spomenutom istraživanju Wei i sur. također ukazuju na to da je visoka izraženost svih proteina Dishevelled povezana s progresijom s obzirom na to da je opažena u karcinomima nemalih stanica pluća gradusa III i IV (91).

Uzevši u obzir rezultate dosadašnjih i našeg istraživanja čini se da bi ciljano smanjenje izraženosti proteina DVL moglo utjecati na supresiju aktivnosti signalnog puta Wnt te bi time mogao poslužiti kao potencijalna terapijska meta. Kako do sada nisu rađena istraživanja na difuznim karcinomima želuca potrebno je prikupiti još mnoštvo podataka za bolje shvaćanje uloge Dishevelled proteina u ovim tumorima, a osobito kod tumora u ranijim kliničkim i patohistološkim stadijima.

Rezultati ovog rada jasno pokazuju da su važne komponente signalnog puta Wnt čije smo promjene izraženosti analizirali pojačano aktivirane ili se njihova izraženost gubi u difuznim karcinomima želuca. Nažalost, dobivene rezultate nije se moglo korelirati s kliničkim stadijem bolesti jer je najveći dio uzoraka dobiven kod ispitanika koji su bili u već poodmakloj fazi bolesti što ponovno naglašava iznimno bitnu borbu za rano otkrivanje ovog „tihog“ ubojice. Otkrivanje promjena molekula uključenih u prijenos signala signalnim putem Wnt, pa tako i naši rezultati, postavljaju temelje za razumijevanje procesa nastanka i invazivnosti tumora te otvaraju mogućnost otkrivanja novih molekularnih meta i razvoja specifičnih lijekova koji će pomoći u poboljšanju preživljenja i boljoj perspektivi oboljelih od ovih tumora.

7 ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem potvrdili smo našu hipotezu da postoji razlika u izraženosti istraživanih proteina signalnoga put Wnt između difuznih karcinoma želuca i zdravog tkiva želuca.

Prema rezultatima učinjenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Izraženost SFRP1 proteina u tumorskom tkivu difuznog karcinoma želuca je značajno manja u usporedbi s izraženosti u zdravom tkivu želuca.
- Izraženost SFRP3 proteina u tumorskom tkivu difuznog karcinoma želuca je značajno manja u usporedbi s izraženosti u zdravom tkivu želuca.
- Izraženost TCF-1 proteina u tumorskom tkivu difuznog karcinoma želuca je značajno veća u usporedbi s izraženosti u zdravom tkivu želuca.
- Izraženost DVL2 proteina u tumorskom tkivu difuznog karcinoma želuca je značajno veća u usporedbi sa izraženosti u zdravom tkivu želuca.
- Izraženost DVL3 proteina u tumorskom tkivu difuznog karcinoma želuca je značajno veća u usporedbi s izraženosti u zdravom tkivu želuca.
- Za niti jedan protein nije utvrđena statistički značajna razlika u izraženosti u odnosu na kliničke i patološke karakteristike pacijenata.
- Nije utvrđena razlika u izraženosti SFRP1, SFRP3, TCF1, DVL-2 i DVL-3 proteina s obzirom na spol pacijenata s difuznim karcinomom želuca.
- Utvrđena je pozitivna međusobna korelacija izraženosti proteina SFRP1 i SFRP3, TCF-1 i DVL2, TCF-1 i DVL3.
- Utvrđena je negativna korelacija izraženosti proteina SFRP1 i TCF-1, SFRP1 i DVL2, SFRP1 i DVL3, SFRP3 i TCF-1, SFRP3 i DVL2, SFRP3 i DVL3.
- Utvrđena je pozitivna korelacija izraženosti TCF-1 u tumorima s dobi pacijenata i negativna korelacija izraženosti SFRP3 u tumorima s dobi pacijenata.

8 SAŽETAK

Karcinom želuca spada među najčešće maligne bolesti u svijetu i treći je na svjetskoj ljestvici uzroka smrti od malignih oboljenja. Iako se ukupna incidencija karcinoma želuca smanjuje unazad proteklih nekoliko desetljeća, zabrinjava porast incidencije difuznog podtipa kod kojeg unatoč značajnom napretku u dijagnostici i liječenju nažalost nije postignut značajniji pomak u pronalasku učinkovite terapije. Iako je patogeneza adenokarcinoma želuca predmet mnogobrojnih istraživanja, molekularni profil difuznih karcinoma želuca još uvijek predstavlja veliku zagonetku. Cilj disertacije bio je istražiti promjene proteina obitelji Dishevelled, Secreted frizzled-related proteina i čimbenika transkripcije TCF-1, molekularnih komponenti signalnog puta Wnt, u difuznim karcinomima želuca i usporediti rezultate s patološkim i kliničkim parametrima. Učinjenom imunohistokemijskom i stereološkom kvantitativnom analizom na 62 uzorka difuznih karcinoma želuca i 62 kontrolna uzorka zdravog tkiva želuca utvrđena je statistički značajna razlika u izraženosti proteina SFRP1, SFRP3, TCF-1, DVL2 i DVL3. Izraženost SFRP1, SFRP3 u tumorskom tkivu bila je značajno manja odnosu na zdravo tkivo, dok je izraženost DVL2, DVL3 i TCF-1 u tumorskom tkivu bila značajno veća u odnosu na zdravo tkivo. Za niti jedan protein nije utvrđena statistički značajna razlika u izraženosti u odnosu na kliničke i patološke karakteristike pacijenata. Dobiveni rezultati ukazuju na značajnu ulogu komponenti signalnoga put Wnt u razvoju difuznog kracinoma želuca te predstavljaju temelj za daljnja istraživanja.

Ključne riječi: difuzni karcinom želuca, signalni put Wnt, Dishevelled (DVL), Secreted frizzled-related proteini (SFRP), T-cell factor-1(TCF-1)

9 SUMMARY

The expression of Wnt-signaling pathway components in diffuse gastric cancer

Maja Sremac, 2020

Gastric cancer is one of the most common malignancies in the world and the third leading cause of cancer-associated death worldwide. Although the overall incidence of gastric cancer has declined rapidly over the recent few decades, increase in the incidence of the diffuse subtype is concerning in which, despite significant advances in diagnosis and treatment, no significant progress has unfortunately been made in finding an effective therapy. Although the pathogenesis of gastric adenocarcinoma is the subject of numerous studies, the molecular profile of diffuse gastric cancer is still a big mystery. The aim of this dissertation was to investigate changes in protein expression of Dishevelled family, Secreted frizzled-related protein (SFRP) and transcription factor TCF-1, the molecular components of the Wnt signaling pathway, in diffuse gastric cancers and compare results with pathological and clinical parameters. Immunohistochemical and stereological quantitative analysis of 62 samples of diffuse gastric cancer and 62 control samples of healthy gastric tissue revealed a statistically significant difference in the expression of SFRP1, SFRP3, TCF-1, DVL2 and DVL3 proteins. The expression of SFRP1, SFRP3 in tumor tissue was significantly lower compared to healthy tissue, while the expression of DVL2, DVL3 and TCF-1 was significantly higher in tumor tissue compared to healthy tissue. No statistically significant difference in expression was found for any of the proteins in relation to the clinical and pathological characteristics of the patients. The obtained results indicate a significant role of the Wnt signaling pathway components in the development of diffuse gastric carcinoma and represent the basis for further research.

Keywords: diffuse gastric cancer, Wnt-signaling pathway, Dishevelled (DVL), Secreted frizzled-related proteins (SFRP), T-cell factor-1(TCF-1)

10 LITERATURA

1. WHO, International Agency for research on Cancer G 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Available at: www. dep.iarc.fr.

2. Ikeda Y, Mori M, Kamakura T, Haraguchi Y, Saku M, Sugimachi K. Improvements in diagnosis have changed the incidence of histological types in advanced gastric cancer. Br J Cancer. 1995;72(2):424–6.

3. Correa P. Gastric cancer: Two epidemics? Dig Dis Sci. 2011;56(5):1585–6.

4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, 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):394–424.

5. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E. Gastric cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2009;71(2):127–64.

6. Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. Singapore Med J. 2014;55(12):621–8.

7. Petryszyn P, Chapelle N, Matysiak-Budnik T. Gastric Cancer: Where Are We Heading? Dig Dis. 2020;38(4):280–5.

8. Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors. J Surg Oncol. 2013;107(3):230–6.

9. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, et al. Recent patterns in gastric cancer: A global overview. Int J Cancer. 2009;125(3):666–73.

10. Powell J. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. Br J Cancer. 1990;62(3):440–3.

11. Bišof V, Juretić A, Stančić-Rokotov D, Rustemović N, Miletić D, Boban M, et al. Kliničke preporuke za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka jednjaka i ezofagogastričnog prijelaza. Lijec Vjesn. 2016;138(9–10):233–9.

12. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. Nat Rev Dis Prim. 2017;3.

13. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Hrvatski zavod za javno zdravstvo Registar za rak Republike Hrvatske Incidencija raka u Hrvatskoj 2018. 2020;(Bilten 44):1–34.

14. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. J Clin Epidemiol. 2003;56(1):1–9.

15. Pasechnikov V, Chukov S, Fedorov E, Kikuste I, Leja M. Gastric cancer: Prevention, screening and early diagnosis. World J Gastroenterol. 2014;20(38):13842–62.

16. Correa P. Gastric Cancer. Overview. Gastroenterol Clin North Am. 2013;42(2):211–7.

17. Schulz C, Koch N, Schütte K, Pieper DH, Malfertheiner P. H.pylori and its modulation of gastrointestinal microbiota. J Dig Dis. 2015;16(3):109–17.

18. Lee YC, Chiang TH, Chou CK, Tu YK, Liao WC, Wu MS, et al. Association between Helicobacter pylori Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology. 2016;150(5):1113-1124.

19. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer Lett. 2014;345(2):196–202.

20. Miwa H, Go MF, Sato N. H. pylori and Gastric cancer: The Asian enigma. Am J Gastroenterol. 2002;97(5):1106–12.

21. Naseem M, Barzi A, Brezden-masley C, Puccini A, Tokunaga R, Battaglin F, et al.Outlooks on Epstein-Barr Virus Associated Gastric Cancer. Cancer Treat Rev. 2018;66:15–22.

22. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on epstein-barr virus and gastric cancer (review). Int J Oncol. 2015;46(4):1421–34.

23. Zhou G, Yang J. Correlations of gastrointestinal hormones with inflammation and intestinal flora in patients with gastric cancer. J BUON. 2019;24(4):1595–600.

24. Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. Int J Cancer. 2010;127(1):86–92.

25. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: Genetic susceptibility, pathology, and implications for management. Lancet Oncol. 2015;16(2):60–70.

26. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. a Model for Gastric Cancer Epidemiology. Lancet. 1975;306(7924):58–60.

27. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer Res. 1992;52(24):6735–40.

28. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. Diffuse gastric cancer: A summary of analogous contributing factors for its molecular pathogenicity. Int J Mol Sci. 2018;19(8):1–19.

29. Yu X, Hu F, Li C, Yao Q, Zhang H, Xue Y. Clinicopathologic characteristics and prognosis of proximal and distal gastric cancer. Onco Targets Ther. 2018;11:1037–44.

30. Troskot B, Gamulin M. Želučani adenokarcinom. 2006;15(1):73–87.

31. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt At a Histo-Clinical Classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31–49.

32. World Health Organization Classification of Tumours: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: IARC Press; 2010.

33. Mariette C, Carneiro F, Grabsch HI, van der Post RS, Allum W, de Manzoni G, et al. Consensus on the pathological definition and classification of poorly cohesive gastric carcinoma. Gastric Cancer. 2019;22(1):1–9.

34. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014;507(7492):315–22.

35. Röcken C. Molecular classification of gastric cancer. Expert Rev Mol Diagn. 2017;17(3):293–301.

36. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK et al. American Joint Committee on Cancer. Digestive System. AJCC Cancer Staging Manual. 8. izdanje. Chicago:Springer. 2017. 203–20.

37. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: A personal perspective on how a scientific field developed. EMBO J. 2012;31(12):2670–84.

38. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell. 1982;31(1):99–109.

39. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell. 1987;50(4):649–57.

40. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Dev Cell. 2009;17(1):9–26.

41. Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell. 2012;149(6):1192–205.

42. Duchartre Y, Kim Y, Kahn M, Angeles HL, California S, Angeles L, et al. The Wnt Signaling Pathway in Cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;99:141–9.

43. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. Oncogene. 2017;36(11):1461–73.

44. Miller JR. The Wnts. Genome Biol. 2002;3(1):1–15.

45. Polakis P. Wnt signaling and cancer. Genes Dev. 2000;14(15):1837–51.

46. Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. Stem Cell Rev. 2007;3(1):30–8.

47. Grocott T, Johnson S, Bailey AP, Streit A. and canonical Wnt signalling. Nat Commun. 2011;2:266–9.

48. Kretzschmar K, Clevers H. Wnt/β-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. Dev Bio . 2017;428(2):273–82.

49. Komiya Y, Habas R. Wnt Secretion and Extra-Cellular Regulators. 2008;4(2):68–75.

50. Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β-catenin. Curr Opin Genet Dev. 2006;16(1):51–9.

51. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-Cadherin/β-catenin complex and the epithelial barrier. J Biomed Biotechnol. 2011;2011.

52. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. Cancer Res. 2008;68(10):3645–54.

53. Chiurillo MA. Role of the Wnt/β-catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. World J Exp Med. 2015;5(2):84.

54. Grainger S, Traver D, Willert K. Wnt Signaling in Hematological Malignancies. Vol. 153, Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;153:321–341.

55. Rapp J, Jaromi L, Kvell K, Miskei G, Pongracz JE. WNT signaling - lung cancer is no exception. Respir Res. 2017;18(1):1–16.

56. Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. Pathobiology. 2007;73(5):213–23.

57. Harb J, Lin PJ, Hao J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. Curr Oncol Rep. 2019;21(2).

58. Korourian A, Roudi R, Shariftabrizi A, Kalantari E, Sotoodeh K, Madjd Z. Differential role of Wnt signaling and base excision repair pathways in gastric adenocarcinoma aggressiveness. Clin Exp Med. 2017;17(4):505–17.

59. Kato M, Nishihara H, Hayashi H, Kimura T, Ishida Y, Wang L, et al. Clinicopathological evaluation of Sox10 expression in diffuse-type gastric adenocarcinoma. Med Oncol. 2017;34(1):1–7.

60. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(3):1–26.

61. Hoang B, Moos M, Vukicevic S, Luyten FP. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. J Biol Chem. 1996;271(42):26131–7.

62. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: New functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. J Cell Sci. 2008;121(6):737–46.

63. Üren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, et al. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. J Biol Chem. 2000;275(6):4374–82.

64. Peichel CL, Kozak CA, Luyten FP VT. Evaluation of mouse Sfrp3/Frzb1 as a candidate for the Ist, UI, and Far mutants on chromosome 2. Mamm Genome. 1998;9:385–387.

65. Nishizuka S, Tamura G, Terashima M, Satodate R. Loss of heterozygosity during the development and progression of differentiated adenocarcinoma of the stomach. J Pathol. 1998;185(1):38–43.

66. Zi X, Guo Y, Simoneau AR, Hope C, Xie J, Holcombe RF, et al. 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.

67. Surana R, Sikka S, Cai W, Shin EM, Warrier SR, Tan HJG, et al. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2013;1845(1):53–65.

68. Zhao CH, Bu XM ZN. Hypermethylation and aberrant expression of Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2007;13:2214–7.

69. Rubin JS, Barshishat-Kupper M, Feroze-Merzoug F XZ. Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. Front Biosci. 2006;11:2093–105.

70. Xavier CP, Melikova M, Chuman Y, Üren A, Baljinnyam B RJ. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/βcatenin signaling. Cell Signal. 2014;26(1):94–101.

71. Qu Y, Ray PS, Li J, Cai Q, Bagaria SP, Moran C, et al. High levels of secreted frizzled-related protein 1 correlate with poor prognosis and promote tumourigenesis in gastric cancer. Eur J Cancer. 2013;49(17):3718–28.

72. Qu Y, Li JF, Cai Q, Wang YW, Gu QL, Zhu ZG, et al. Over-expression of FRZB in gastric cancer cell suppresses proliferation and induces differentiation. J Cancer Res Clin Oncol. 2008;134(3):353–64.

73. Shi Y, He B, You L, Jablons DM. Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. Acta Pharmacol Sin. 2007;28(9):1499–504.

74. Van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. Dev Biol. 2002;244(1):1–8.

75. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(11).

76. Brantjes H, Roose J, van de Wetering M, Clevers H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. Nucleic Acids Res. 2001;29(7):1410–9.

77. Hrckulak D, Kolar M, Strnad H, Korinek V. TCF/LEF transcription factors: An update from the internet resources. Cancers (Basel). 2016;8(7):70.

78. Verbeek S, Izon D, Hofhuis F, Robanus-Maandag E, Te Riele H, Watering M Van De, et al. An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. Nature. 1995;374(6517):70–4.

79. Roose J, Huls G, Beest M Van, Moerer P. Synergy Between Tumor Suppressor APC and the. Science. 1999;285(17):1923–6.

80. Najdi R, Syed A, Arce L, Theisen H, Ting JH, Atcha F, Nguyen AV, Martinez M, Holcombe RF, Edwards RA, Marsh JL WM. A Wnt kinase network alters nuclear localization of TCF-1 in colon cancer. Oncogene. 2009;28(47):41133–46.

81. Nikuševa-Martić T, Šerman L, Zeljko M, Vidas Ž, Gašparov S, Zeljko HM, et al. 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.

82. Dorfman DM, Greisman HA, Shahsafaei A. Loss of expression of the WNT/β-catenin-signaling pathway transcription factors lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and T cell factor-1 (TCF-1) in a subset of peripheral T cell lymphomas. Am J Pathol. 2003;162(5):1539–44.

83. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Tomas D, Marković L, Okštajner PK, Sukser V KB. Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. Histol Histopathol. 2014;29(12):1557–64.

84. Xu X, Tang X, Guo W, Yang K RT. TCF-1 participates in the occurrence of dedifferentiated chondrosarcoma. Tumour Biol. 2016;37(10):14129–40.

85. Lee YN, Gao Y WH. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. Cell Signal. 2008;20(2):443–52.

86. Gao C, Chen YG. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. Cell Signal. 2010;22(5):717–27.

87. Wang Y WH. Dvl3 translocates IPMK to the cell membrane in response to Wnt. Cell Signal. 2012;24:2389–95.

88. Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, Li L. Nuclear Dvl, c-Jun, β-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of β-catenin-TCF interaction. J Cell Biol. 2008;180(6):1087–100.

89. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of dishevelleds. Croat Med J. 2014;55(5):459–67.

90. Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, Jablons DM. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: Evidence of dishevelled overexpression. Oncogene. 2003;22(46):7218–21.

91. Wei Q, Zhao Y, Yang ZQ, Dong QZ, Dong XJ, Han Y, et al. Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. Lung Cancer. 2008;62(2):181–92.

92. Zhao Y, Yang ZQ, Wang Y, Miao Y, Liu Y, Dai SD, et al. 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.

93. Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, et al. 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.

94. Mizutani K, Miyamoto S, Nagahata T, Konishi N, Emi M OM. Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the Drosophila dishevelled gene, in prostate cancer. Tumori. 2005;92:546–51.

95. Okino K, Nagai H, Hatta M, Nagahata T, Yoneyama K, Ohta Y, et al. Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the Drosophila dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2003;10(5):1219–23.

96. Pulvirenti T, Van Der Heijden M, Droms LA, Huse JT, Tabar V, Hall A. Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. Cancer Res. 2011;71(23):7280–90.

97. Zhang C, Li C, Chen X, Zhou Y, Yin B, Ni R, et al. 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.

98. Tan Z. Recent advances in the surgical treatment of advanced gastric cancer: A review. Med Sci Monit. 2019;25:3537–41.

99. Suzuki H, Oda I, Abe S, Sekiguchi M, Mori G, Nonaka S, et al. High rate of 5-year survival among patients with early gastric cancer undergoing curative endoscopic submucosal dissection. Gastric Cancer. 2016;19(1):198–205.

100. Suo J, Zhang D, Tong W, Ye F, He L, Cui L, et al. Serum biomarker panels for diagnosis of gastric cancer. Onco Targets Ther. 2016;9:2455.

101. Chivu-Economescu M, Matei L, Necula LG, Dragu DL, Bleotu C, Diaconu CC. New therapeutic options opened by the molecular classification of Gastric cancer. World J Gastroenterol. 2018;24(18):1942–61.

102. Link A, Kupcinskas J. MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives. World J Gastroenterol. 2018;24(30):3313–29.

103. Necula L, Matei L, Dragu D, Neagu AI, Mambet C, Nedeianu S, et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. World J Gastroenterol. 2019;25(17):2029–44.

104. Bure IV., Nemtsova MV., Zaletaev DV. Roles of e-cadherin and noncoding rnas in the epithelial–mesenchymal transition and progression in gastric cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(12).

105. Liu X, Chu KM. E-cadherin and gastric cancer: Cause, consequence, and applications. Biomed Res Int. 2014;2014:1–9.

106. Li LF, Wei ZJ, Sun H, Jiang B. Abnormal β-catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis. World J Gastroenterol. 2014;20(34):12313–21.

107. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. Oncogene. 2007;26(32):4699–713.

108. Kinoshita T, Nomoto S, Kodera Y, Koike M, Michitaka Fujiwara AN. Decreased expression and aberrant hypermethylation of the SFRP genes in human gastric cancer. Hepatogastroenterology. 2011;58(107-108):1051–6.

109. Wang Z, Ye Y, Liu D, Yang X, Wang F. Hypermethylation of multiple wnt antagonist genes in gastric neoplasia: Is H pylori infection blasting fuse? Med (United States). 2018;97(52).

110. Yang HJ, Kim SG, Lim JH, Choi JM, Kim WH, Jung HC. Helicobacter pylori-induced modulation of the promoter methylation of Wnt antagonist genes in gastric carcinogenesis. Gastric Cancer. 2018;21(2):237–48.

111. Hirata H, Hinoda Y, Ueno K, Majid S, Saini S, Dahiya R. Role of secreted frizzled-related protein 3 in human renal cell carcinoma. Cancer Res. 2010;70(5):1896–905.

112. Schlensog M, Magnus L, Heide T, Eschenbruch J, Steib F, Tator M, et al. Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. Epigenetics. 2018;13(3):214–27.

113. Lin YW, Shih YL, Lien GS, Suk FM, Hsieh CB, Yan M De. Promoter methylation of SFRP3 is frequent in hepatocellular carcinoma. Dis Markers. 2014;2014.

114. Xu X, Liu Z, Tian F, Xu J, Chen Y. Clinical significance of transcription factor 7 (TCF7) as a prognostic factor in gastric cancer. Med Sci Monit. 2019;25:3957–63.

115. Wu B, Chen M, Gao M, Cong Y, Jiang L, Wei J, et al. Down-regulation of lncTCF7 inhibits cell migration and invasion in colorectal cancer via inhibiting TCF7 expression. Hum Cell. 2019;32(1):31–40.

116. Jin FS, Wang HM, Song XY. Long non-coding RNA TCF7 predicts the progression and facilitates the growth and metastasis of colorectal cancer. Mol Med Rep. 2018;17(5):6902–8.

117. Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Activation of Wnt/β-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. Neurochem Int. 2009;55(5):307–17.

118. Kafka A, Bačić M, Tomas D, Žarković K, Bukovac A, Njirić N, et al. Different behaviour of DVL1, DVL2, DVL3 in astrocytoma malignancy grades and their association to TCF1 and LEF1 upregulation. J Cell Mol Med. 2019;23(1):641–55.

119. You XJ, Bryant PJ, Jurnak F, Holcombe RF. Expression of Wnt pathway components frizzled and disheveled in colon cancer arising in patients with inflammatory bowel disease. Oncol Rep. 2007;18(3):691–4.

120. Hegazy SA, Alshareef A, Gelebart P, Anand M, Armanious H, Ingham RJ, et al. Disheveled proteins promote cell growth and tumorigenicity in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Cell Signal. 2 013;25(1):295–307.

121. Huang S, Chen J, Tian R, Wang J, Xie C, Gao H, et al. Down-regulation of dishevelled-2 inhibits cell proliferation and invasion in hepatoblastoma. Pediatr Blood Cancer. 2018;65(7).

11 ŽIVOTOPIS

Pristupnica je rođena 1984. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i III. opću gimnaziju. Medicinski fakultet upisala je 2002., a diplomirala 2008. Pripravnički staž obavljala je od 2008. do 2009. godine u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice te je uspješno položila državni ispit. Od siječnja 2010. do veljače iste godine radi kao doktor medicine na zamjeni u pedijatrijskoj ambulanti Doma zdravlja Sisak te se potom u veljači 2010. zapošljava u Zavodu za hitnu medicinu Grada Zagreba gdje radi sve do početka specijalizacije iz interne medicine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u ožujku 2011., pod mentorstvom prof.dr.sc. Borisa Vucelića. Specijalistički ispit iz interne medicine položila je 2015. Užu specijalizaciju iz gastroenterologije i hepatologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Rajka Ostojića započela je 2016. godine, a subspecijalistički ispit položila je 2019. godine. Stalno je zaposlena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb. Upisala je poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2012., a temu doktorske disertacije obranila je 2015. Sudjelovala je aktivno na više stručnih usavršavanja i znanstvenih skupova u inozemstvu i Hrvatskoj. Autor je nekoliko znanstvenih članaka te više znanstvenih i kongresnih sažetaka. Član je nekoliko domaćih i inozemnih stručnih društava.