

# Analiza ekspresije transkripcijskih čimbenika SOX2, OCT4 i NANOG i puta PI3K/AKT/BCL2 u malignom mezoteliomu pleure

---

Seiwerth, Fran

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:460983>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Fran Seiwert**

**Analiza ekspresije transkripcijskih čimbenika  
SOX2, OCT4 i NANOG i puta PI3K/AKT/BCL2 u  
malignom mezoteliomu pleure**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Fran Seiwert**

**Analiza ekspresije transkripcijskih čimbenika  
SOX2, OCT4 i NANOG i puta PI3K/AKT/BCL2 u  
malignom mezoteliomu pleure**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2023.**

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju i Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelji rada:

prof.dr.sc. Marko Jakopović

Izv.prof.dr.sc Filip Sedlić

## ZAHVALA

Zahvaljujem voditeljima, prof. dr. sc. Marku Jakopoviću i izv. prof. dr. sc. Filipu Sedliću na mentorstvu i vođenju u izradi ove disertacije. Također zahvaljujem doc. dr. sc. Ani Šepac i dr. sc. Sunčani Sikirić na stručnoj pomoći i suradnji.

Posebne zahvale idu mojoj obitelji zbog podrške i motivacije tijekom procesa izrade rada.

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1 Plućnica (pleura) .....	1
1.2 Difuzni maligni pleuralni mezoteliom (DMPM) .	2
1.2.1 Patologija.....	4
1.2.2 Klinička slika i dijagnostika .....	6
1.2.3 Liječenje .....	9
1.2.3.1 Kirurško liječenje .....	9
1.2.3.2 Radioterapijsko liječenje .....	10
1.2.3.3 Sistemsko liječenje .....	11
1.2.4 Prognoza .....	12
1.3 ČIMBENICI PLURIPOTENCIJE OCT4, NANOG I SOX2 I SIGNALNI PUT	
PI3K/AKT/BCL2 .....	13
1.3.1 OCT4 .....	14
1.3.1.1 Osnove genetike i funkcije OCT4 .....	14
1.3.1.2 Uloga OCT4 u onkogenezi .....	15
1.3.2 NANOG .....	17
1.3.2.1 Osnove genetike i funkcije NANOG-a .....	17
1.3.2.2 Uloga NANOG-a u onkogenezi .....	18
1.3.3 SOX2 .....	20
1.3.3.1 Osnove genetike i funkcije SOX2 .....	20
1.3.3.2 Uloga SOX2 u onkogenezi .....	21
1.3.4 PI3K/AKT ... ..	23
1.3.4.1 Struktura PI3K .....	23
1.3.4.2 Struktura AKT .....	23
1.3.4.3 Uloga PI3K/AKT signalnog puta .....	24
1.3.4.4 Uloga PI3K/AKT u onkogenezi .....	25
1.3.5 BCL2 .....	27
1.3.5.1 Osnove genetike i funkcije BCL2 .....	27
1.3.5.2 Uloga BCL2 u onkogenezi .....	27
1.4 Svrha rada .....	29

2. HIPOTEZA .....	30
3. CILJEVI .....	31
3.1 Opći cilj .....	31
3.2 Specifični ciljevi .....	31
4. MATERIJALI I METODE .....	32
4.1 Uzorci.....	32
4.2 Imunohistokemijska analiza proteinske izraženosti.....	32
4.3 qPCR analiza genske izraženosti .....	33
4.4 Statistička analiza podataka .....	35
5. REZULTATI .....	36
5.1 Opće karakteristike pacijenata .....	36
5.2 Izraženost OCT4, NANOG i SOX2 u histološkim podtipovima DMPM i u zdravoj pleuri ..	37
5.2.1 OCT4 .....	37
5.2.2 NANOG .....	39
5.2.3 SOX2 .....	40
5.3 Ekspresija komponenti signalnog puta PI3K, AKT i BCL2 .....	42
5.3.1 PI3K .....	42
5.3.2 AKT .....	43
5.3.3 BCL2 .....	44
5.4 Korelacija genske izraženosti.....	47
5.5 Analiza preživljenja .....	49
6. RASPRAVA .....	58
7. ZAKLJUČAK .....	68
8. SAŽETAK .....	70
9. SUMMARY .....	71
10. POPIS LITERATURE .....	73
11. ŽIVOTOPIS .....	86

## POPIS OZNAKA I KRATICA

DMPM- difuzni maligni pleuralni mezoteliom (*eng. diffuse malignant pleural mesothelioma*)

BAP1 - BRCA - 1 povezani protein (*eng. BRCA 1 related protein*)

*BRCA 1* – gena karcinoma dojke (*eng. Breast cancer gene*)

CK - citokeratin (*eng. cytokeratine*)

WT 1 - Wilms tumor - 1 protein

CEA - karcinoembrionalni antigen (*eng. Carcinoembryonic antigen*)

EPCAM - molekula adhezije epitelnih stanica (*eng. Epithelial cell adhesion molecule*)

Ber - EP4 - protutijelo specifično za EPCAM protein

TTF -1 - čimbenik prekida transkripcije 1 (*eng.transcription termination factor 1*)

CK 5/6 - citokeratin 5/6

D2-40 - protutijelo specifično za podoplanin

HBME-1 - endotelni marker ljudske koštane srži (*eng. Human bone marrow endothelium marker-1*)

CDKN2A/ARF - ciklin- ovisan inhibitor kinaze 2A, tumor supresor gen (*eng. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

NF2- neurofibromin 2, tumor supresor protein (*eng. neurofibromin 2*)

p16 - tumor supresor protein 16 (*eng. p16, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

FDG - fluorodeoksiglukoza (*eng. fluorodeoxy glucose*)

PET- pozitronska emisijska tomografija (*eng. positron emission tomography*)

CT - kompjuterizirana tomografija (*eng. computed tomography*)

SUV - standardizirana vrijednost prihvata signala (*eng. standardized uptake value*)

LAT - medicinska torakoskopija (*eng. local anesthetic thoracoscopy*)



VATS - video asistirana torakoskopija (*eng. video-assisted thoracoscopy*)

TNM - sistem bodovanja proširenosti tumora (*eng. tumor, node, metastasis*)

NCCN - Nacionalna sveobuhvatna mreža protiv raka, (*eng. National comprehensive cancer network*)

P/D - pleurektomija/dekortikacija (*eng. pleurectomy/decortication*)

EPP - ekstrapleuralna pneumektomija (*eng. extrapleural pneumoectomy*)

IMRT -radioterapija moduliranog intenziteta (*eng. Intensity modulated radiotherapy*)

HR - omjer rizika (*eng. hazard radio*)

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (*eng. vascular endothelial growth factor*)

PD-L1 (B7- H1) - ligand proteina programirane stanične smrti 1 (*eng. programmed death-ligand 1*)

CTLA-4 (*eng. cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)

CI - interval pouzdanosti (*eng. confidence interval*)

ESMO - Europska udruga medicinske onkologije (*eng. European society of medical oncology*)

OS - ukupno preživljenje (*eng. overall survival*)

OCT4 -transkripcijski oktamer vežući faktor 4 (*eng. octamer-binding transcription factor 4*)

NANOG - transkripcijski čimbenik NANOG

SOX2 - transkripcijski čimbenik (*eng. (sex determining region Y)-box 2*)

PI3K - fosfoinozimid 3 kinaza (*eng. phosphoinositide 3-kinase*)

AKT - serin/treonin specifična protein kinaza (*eng. protein kinase B*)

BCL2 - protein povezan s B-staničnim limfomom 2 (*eng. B-cell lymphoma 2*)

POU5F1 - gen koji kodira OCT4 protein (*eng. POU Class 5 Homeobox 1 protein*)

TGF -  $\beta$  - transkripcijski čimbenik rasta beta (*eng. Transcription growth factor beta*)

ATP - adenzin trifosfat (*eng. adenosine triphosphate*)

POU - obitelj proteina PIT, OCT, UNC (*eng. PIT, OCT, UNC proteins*)

OCT3/NF A3 - transkripcijski oktamer vežući čimbenik 3 (*eng (NF-A3, Octamer-binding Protein 3, Oct-3)*)

ES - embrionalne matične stanice (*eng embryonic stem cells*)

CSC - matične stanice raka (*eng. cancer stem cells*)

FIGO - međunarodna udruga ginekologije i porodništva (*eng. The International federation of gynecology and obstetrics*)

HER2 - receptor ljudskog čimbenika epidermalnog rasta (*eng. human epidermal growth factor receptor 2*)

p58 - p58 regulatorna podjedinica PI3K

p110 - p 110 katalitička podjedinica PI3K

p110 $\alpha$  - alfa podtip 110 katalitičke podjedinice PI3K

p110 $\beta$ - beta podtip katalitičke podjedinice p110

p110 $\delta$  .- Delta podtip katalitičke podjedinice p110

PIP - fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat (*eng. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PTEN - homolog fosfataze i tenzina (*eng. phosphatase and tensin homolog*)

IGF-1 (inzulinu sličan faktor rasta 1 (*eng.insulin-like growth factor 1*))

mTOR - ciljni protein rapamicina kod sisavaca (*eng. mammalian target of rapamycin*)

mTORc - mTOR kompleks (*eng. mTOR complex*)

GLUT- prijenosnik glukoze (*eng. glucose transporter*)

S6 - ribosomski protein (*eng. S6 protein*)

FOXO - obitelj transkripcijskih čimbenika (*eng. Forkhead box protein*)

GCD DLBCL - podtip difuznog B velikostaničnog limfoma (*eng. germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma*)

T-ALL - akutna limfoblastična leukemija T limfocita (*eng. T lymphocyte acute lymphoblastic leukemia*)

CLL - kronična limfatična leukemija (*eng. Chronic lymphatic leukemia*)

FL - folikularni limfom (*eng. follicular lymphoma*)

HR + - tumor pozitivan na hormonske receptore (*eng. hormone receptors positive*)

BCLXL - ekstra veliki protein B limfoma (*eng. B-cell lymphoma-extra large protein*)

BAX- BCL2- vezani x protein, regulator apoptoze (*eng. BCL2-associated X protein*)

EGFR - receptor za epidermalni čimbenik rasta (*eng. Epidermal growth factor receptor*)

RNA - ribonukleinska kiselina (*eng. ribonucleic acid*)

PCR - lančana reakcija polimeraze (*eng. polymerase chain reaction*)

DAB - 3,3-diaminobenzidin tetraklorid (*eng. 3,3 daimnbenzidine tetrachloryde*)

qPCR kvantitativna lančana reakcija polimeraze (*eng. quantitative polymerase chain reaction*)

FFPE - fiksirano u formalinu, ugrađeno u parafin (*eng. formalin-fixed, paraffin-embedded*)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (*eng. deoxyribonucleic acid*)

2- $\Delta\Delta C_t$  - metoda izračuna relativne ekspresije qPCR

H&E - bojenje hemalaunom i eozinom (*eng. hemalaun - eosine staining*)

p-AKT- aktivirani, fosforilirani AKT (*eng. phosphorylated AKT*)

p-PI3K - aktivirana, fosforilirana fosfatidilinozitol 3 kinaza (*eng. phosphohorylated PI3K*)

AKT 1,2,3 - geni AKT 1,2 i 3 (*eng. AKT 1,2 and 3 genes*)

Ihi - imunohistokemijski indeks (*eng. immunohistochemic index*)

# 1. UVOD

## 1.1. Poplućnica (pleura)

Pleura je serozna membrana koja obavija pluća te stijenku prsišta s unutarnje strane. Pleura koja oblaže pluća naziva se visceralna, a dio koji obavija unutrašnju površinu prsnog koša, medijastinuma i ošita parijetalna pleura, koja se može podijeliti na kostalnu, dijafragmalnu, medijastinalnu i cervikalnu pleuru (1). Histološki, pleura je građena od sloja stanica jednoslojnog pločastog epitela (mezotela) s bazalnom membranom i tankim slojem veziva koji priliježe na sloj građen od mreže elastičnih i kolagenih vlakana. Ispod ovog sloja u parijetalnoj pleuri nalazi se endotorakalna fascija. Visceralna pleura ne sadrži ovu fasciju već se njezina elastična vlakna nadovezuju na vlakna plućnog intersticija gdje su smještene krvne i limfne žile. Parijetalnu pleuru opskrbljuje torakalna aorta i ogranci sistemske cirkulacije (interkostalne, perikardiofrenične, frenične i muskulofrenične arterije), a visceralnu plućna arterija i grane bronhijalnih arterija (1,2). Venska krv se iz parijetalne pleure drenira putem vene azygos, hemiazygos i mamarnih vena, a iz visceralne putem plućnih vena. Limfa parijetalne pleure drenira se kroz limfne otvore između mezotelnih stanica te u limfne kapilare u području kostalne, medijastinalne i dijafragmalne pleure. Limfu visceralne pleure dreniraju subpleuralne limfne kapilare (3,4).

Između parijetalne i visceralne pleure nalazi se prostor koji je u fiziološki uvjetima gotovo virtualan, a naziva se pleuralna šupljina. Ispunjen je s oko 15 ml serozne, acelularne tekućine s niskom koncentracijom bjelančevina koja omogućava funkciju klizanja listova pleure tijekom disanja (2). Tekućina se filtrira na parijetalnoj pleuri, a reapsorbira na visceralnoj pleuri. U patološkim stanjima dolazi do poremećaja ravnoteže stvaranja tekućine na

parijetalnoj pleuri i njene reapsorpcije na visceralnoj pleuri te do posljedičnog nakupljanja pleuralne tekućine unutar pleuralnog prostora (4).

## **1.2. Difuzni maligni pleuralni mezoteliom (DMPM)**

Maligni mezoteliom rijetka je zloćudna bolest porijeklom iz mezotelnih stanica koje oblažu pleuru, peritonej, perikard i tunicu vaginalis testisa. Difuzni maligni pleuralni mezoteliom je prvi puta opisan sredinom 20. stoljeća, a početkom 1960.-ih njegova je incidencija povezana s izloženošću azbest kod industrijskih radnika u Južnoj Africi (5). Azbest potječe od grčke riječi „ἀσβεστος“, što znači „neuništiv, nezapaljiv“ te je više tisuća godina u upotrebi zbog svoje izdržljivosti, otpornosti prema gorenju i izolacijskog potencijala.

Istinski globalni teret DMPM-a ne može se jasno definirati, uglavnom zbog različitih metoda praćenja i izvještavanja podataka koje se koriste u različitim zemljama. Međutim, od 1960-ih bolest je široko prepoznata u populaciji izloženoj azbestu, što odražava prethodnu industrijsku uporabu proizvoda koji ga sadrže. Ona je posebno izražena u visokorazvijenim državama, u kojima se događa 88% smrti vezanih za DMPM (6–8). Incidencija varira od 7 na milijun (Japan) do 40 na milijun (Australija) stanovnika godišnje. U Europi je incidencija oko 20 na milijun stanovnika, što uzrokuje oko 54% ukupnog svjetskog broja smrtnih slučajeva povezanih s mezoteliomom (oko 50 000 smrti u razdoblju od 1994. – 2016.) (9). Nije poznat prag ispod kojeg se izloženost azbestu smatra sigurnom, no postoji jasan odnos doze prema izloženosti i riziku od DMPM -a s povećanjem rizika tijekom vremena od prve izloženosti (10). Procjene latencije nastavljaju se revidirati paralelno sa starenjem izložene populacije. Registar mezotelioma Zapadne Australije isprva je izvijestio o vremenu od prve izloženosti dijagnozi onih koji su dijagnosticirani u razdoblju 1960–1979 od 26 godina, pri čemu je najnovija procjena latencije kod onih koji su dijagnosticirani između 2010. i 2019. bila 52

godine (11). To je za sada najdulje sustavno proučeno razdoblje latencije i moguće je da će ono s vremenom još rasti.

Od drugih rizičnih čimbenika za razvoj mezotelima u zadnje se vrijeme proučava izloženost ionizirajućem zračenju u sklopu prethodnog antineoplastičnog liječenja. Provedena radioterapija je označena kao nezavisni rizični čimbenik u kohortama pacijenata liječenih zbog ne-Hodgkinovog limfoma (12) i testikularnih tumora (13). Obiteljski rizik opisan je kod srodnika prvog ili drugog koljena pacijenata s DMPM-om uz posljedično približno dvostruko povećanje stope incidencije DMPM-a, a mutacije germinativnih linija u genu *BAP1* (eng. *BRCA-1-associated protein 1*, BRCA1-povezani protein 1) identificirane su u obiteljima s visokom učestalošću DMPM-a (14,15).

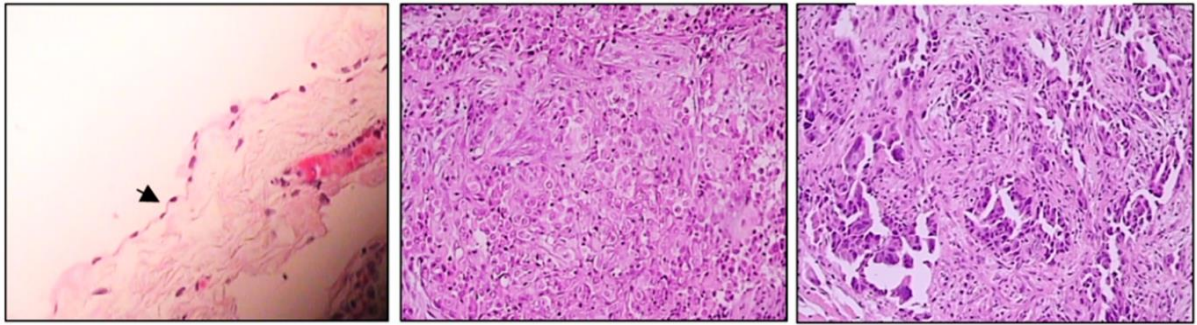
Incidencija DMPM-a veća je kod muškaraca nego kod žena, pri čemu muški pacijenti čine 60-80% oboljelih, ovisno o istraživanju. Razlika u incidenciji najvjerojatnije je uzrokovana tradicionalno većom prisutnošću muškaraca na poslovima izloženima azbestu, kao što su brodogradnja, građevinarstvo i druge tehničke struke (16,17).

Praćenje pojavnosti DMPM u Hrvatskoj nije uključeno u redovita godišnja izvješća te se podatci o incidenciji svode na pojedine kohortne analize. Tako je u razdoblju od 1989. do 1998. godine stopa incidencije DMPM iznosila između 0,4 i 1,1/100.000 stanovnika. Najveća stopa incidencije bila je u Istarskoj (2,9) i Splitsko-dalmatinskoj županiji (2,5). Pojavnost kod muškaraca bila je viša nego kod žena, s omjerom 3,2:1(18). Jedna je studija analizirala profesionalne bolesti u Hrvatskoj povezane s azbestom između 2002. i 2007., u kojoj su se godišnje stope bolnički liječenih pacijenata zbog mezotelioma, azbestoze ili pleuralnog plaka na razini države kretale oko 2.1/100000 stanovnika, od čega je dijagnoza DMPM-a postavljena kod oko polovice slučajeva, s incidencijom 1.3/100 000 stanovnika. Incidencija je ponovno bila najviša u Istarskoj (2.9), Splitsko-dalmatinskoj (3.0) i Primorsko-goranskoj

županiji (3.6/100 000 stanovnika) (19). Prema Hrvatskom registru za rak je od 1991. do 1997. godine dijagnoza DMPM postavljena kod 248 pacijenata, što bi odgovaralo prosječnoj godišnjoj incidenciji od 0.8/100 000, s predominacijom kod muškaraca u omjeru 4:1. Vidljiva je velika razlika u incidenciji DMPM između kopnenih područja (0.7/100 000) u usporedbi s priobalnim regijama (2.66/100 000 stanovnika). Ta je razlika uvjetovana prvenstveno tada razvijenom industrijom priobalnog područja kao što su brodrogradilišta u Puli, Kraljevici, Rijeci, Splitu, Trogiru, Šibeniku i Korčuli, azbestna cementna industrija u Vranjicu/Splitu i obrada azbesta u Pločama, gdje su radnici, ali i okolno stanovništvo (što je pogotovo naglašeno u slučaju cementare u Vranjicu) bili izloženi azbestnoj prašini (20).

#### 1.2.1. Patologija

Patohistološki, DMPM se dijeli u 3 podtipa: epiteloidni, sarkomatoidni i bifazični, koji je prema svojim značajkama kombinacija epiteloidnog i sarkomatoidnog (4). Epiteloidni je podtip najčešći i čini oko 66% svih slučajeva DMPM (21,22). Prema WHO (*eng. World health organisation*) klasifikaciji iz 2015., postoji nekoliko obrazaca u kojima se epiteloidni podtip može javiti – solidni, tubulopapilarni, trabekularni, mikropapilarni, adenomatoidni, svjetlostanični, tranzicijski, deciduoidni i sitnostanični (4,23), od kojih su potonja 2 izuzetno rijetki, s manje od 100 opisanih slučajeva u literaturi. Važno je naglasiti da epiteloidni mezoteliom obično ima više od dva obrasca rasta te se ta značajka može koristiti kao dijagnostički kriterij u odnosu na neke druge zloćudne tumore. Pojedini obrasci, npr. tubulopapilarni i trabekularni (24) te miksoidni i mikrocistični (25) povezani su s boljim preživljenjem, dok pleomorfni karakterizira lošiji klinički ishod (26,27).



**Slika 1.** Mikroskopski preparat: prikazi pleure i mezotelioma. Prva slika prikazuje stanice pleure (crna strelica), druga solidnog mezotelioma, a treća tubulopapilarnog.

Mikroskopski je potrebno razlikovati DMPM od drugih tumora (npr. epitelioidni podtip treba razlikovati od adenokarcinoma, a sarkomatoidni od drugih tumora vretenastih stanica), za što se koristi panel imunohistokemijskih markera, od kojih citokeratin (CK) ima važnu ulogu u dijagnostici mezotelioma (28). Uz histološku se sliku, koja zbog svoje raznolikosti ima samo okvirno značenje u dijagnostici, kao kriterij uzima dokaz dva ili više mezotelnih markera kao što su kalretinin i WT-1 (*eng. Wilms tumor -1*), uz negativan nalaz dva ili više epitelnih markera za razlikovanje malignog mezotelioma od metastatskog adenokarcinoma. Obzirom na raznolikost adenokarcinoma koji mogu davati metastaze u pleuru – od pluća, dojke probavne cijevi do prostate i ženskog genitalnog trakta, koriste se obično protutijela relativno širokog spektra, za koje se ustanovilo da su izuzetno rijetko pozitivna u mezotelu. Najčešće se upotrebljavaju CEA (*eng. Carcinoembryonic antigen*), Ber-EP4 (*eng. Epithelial cell adhesion molecule-4*), TTF-1 (*eng. transcription termination factor 1*) i Napsin A. Od mezotelnih markera upotrebljavaju se i CK 5/6, D2-40, HBME-1 (*eng. Human bone marrow endothelium marker-1*) i mezotelin (*eng. mesothelioma antigen*) (21,22).

Specifična imunohistokemijska bojenja, upotrebljena kao panel, imaju dobru osjetljivost i specifičnost za potvrdu mezotelnog porijekla stanica ili tkiva koje se proučava (29). Obzirom na veliku morfološku sličnost reaktivnog mezotela, promijenjenog u sklopu upalnog odgovora te neoplastičnog mezotela, problem dijagnoze mezotelioma na malim uzorcima ili



citologiji time nije bio riješen te je zlatni standard dijagnoze do nedavno predstavljao nalaz invazije stanica mezotelnog porijekla u plućevinu, mast ili mišić. U zadnjih nekoliko godina, s razvojem znanja o kromosomskim promjenama u DMPM-u, savjetuje se da bi rutinska analiza trebala uključivati testiranje na inaktivaciju tumor supresorskih gena, osobito gubitak *CDKN2A/ARF* (eng. *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), neurofibromatoze tipa 2 (NF2) i proteina 1 povezanog s BRCA1 (BAP-1, eng *BRCA1 associated protein*)(30). Temeljem toga u novoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije uveden je i pojam *Mesothelioma in situ* koji podrazumijeva morfološki promijenjeni mezotel uz gubitak izraženosti BAP-1 (31,32). Neki autori zagovaraju dostatnost citološke analize za postavljanje dijagnoze mezotelioma, gdje su kao dijagnostički kriteriji navedni prisutnost malignih stanica prema citomorfološkim kriterijima (koji pokazuju mezotelski fenotip) ili suspektne citomorfološke značajke s molekularnim markerima gubitka BAP-1 ili p16 (CDKN2A) (33). Iako je na relativno velikom uzorku od preko 1200 pacijenata s epiteloidnim mezoteliomom pleure pokazana neinferiornost citološke prema histološkoj dijagnozi u smislu razlike u ukupnom preživljenju (34), patohistološka dijagnoza ostaje standard dijagnostike, pogotovo u novoj eri imunoterapije i potrebe za opsežnijim molekularnim analizama.

### 1.2.2. Klinička slika i dijagnostika

Klinička slika DMPM je nespecifična, a najčešći vodeći simptomi su umor, bol, otežano disanje i gubitak na težini, od kojih je pleuritična bol najspecifičnija (35). U dijagnostičkom algoritmu prvi korak je najčešće rendgenska (RTG) snimka srca i pluća u dvije projekcije, na kojoj se u pravilu može vidjeti pleuralni izljev ili pleuralno zadebljanje, a u uznapredovalim stadijima bolesti i drugi znakovi, npr. lezije plućnog parenhima. Kompjuterizirana tomografija (CT) s kontrastom je radiološki standard kojim se određuje stadij bolesti, a može

se dopuniti magnetskom rezonancom toraksa ili FDG-PET CT om (fluorodeoksiglukozna – pozitronska emisijska tomografija). Vrijednosti SUV (*eng. standardised uptake value*) ispod 2.2 pokazale su najvišu prediktivnu vrijednost za razlikovanje benignih od malignih pleuralnih lezija (36). PET CT je, osim za karakterizaciju metaboličke aktivnosti lezija, nužan i za detekciju eventualnih udaljenih metastaza.

Punkcija pleuralnog izljeva s citološkom analizom te punkcija ili biopsija pleuralne lezije pod kontrolom ultrazvuka ili CTA su najmanje invazivne metode dobivanja dijagnostičkog materijala. Zlatnim standardom dijagnostike patologije pleuralnog izljeva smatraju se biopsije pleure provedene endoskopskim pristupom (torakoskopija) pod izravnom vizualizacijom. Torakoskopske biopsije mogu se izvesti u lokalnoj anesteziji (LAT, *eng. local anesthetic thoracoscopy*, torakoskopija u lokalnoj anesteziji, također nazvane medicinska torakoskopija (MT) koje se u pravilu izvode kroz jedan otvor/rez. Alternativa metoda je kirurški pristup video-asistiranom torakoskopijom (VATS, *eng. video-assisted thoracoscopy*). Obje tehnike omogućuju vizualni pregled pleuralne šupljine i obavljanje dijagnostičkog postupka u istom aktu (37).

Temeljem rezultata dijagnostičke obrade određuje se stadij bolesti za koji se u pravilu koristi TNM klasifikacija. Trenutno je u upotrebi 8.verzija TNM klasifikacije mezotelioma, predstavljena 2018. godine (38). Objašnjenje pojedinih deskriptora predstavljeno je u tablicama 1. i 2.

**Tablica 1.** Opis deskriptora T, N i M kod određivanja stadija malignog pleuralnog mezotelioma

<b>Tx</b>	Nedektibilan primarni tumor	<b>Nx</b>	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti	
<b>T0</b>	Bez dokaza primarnog tumora	<b>N0</b>	Bez metastaza u limfnim čvorovima	
<b>T1</b>	Tumor koji uključuje ipsilateralnu parietalnu pleuru (uključujući medijastinalnu i dijafragmalnu pleuru) sa ili bez zahvaćanja visceralne pleure	<b>N1</b>	Metastaze u ipsilateralne bronhopulmonalne, hilarne ili medijastinalne limfne čvorove	
<b>T2</b>	Tumor koji zahvaća svaku od ipsilateralnih pleuralnih površina (parijetalna, medijastinalna, dijafragmalna i visceralna pleura) s barem jednim od sljedećih obilježja <ul style="list-style-type: none"> <li>• Konfluirajući tumor viscerarne pleure (uključujući fisure)</li> <li>• Zahvaćenost mišića dijafragme</li> <li>• Invazija plućnog parenhima</li> </ul>	<b>N2</b>	Metastaze u kontralateralne bronhopulmonalne, hilarne ili medijastinalne limfne čvorove ili ipsilateralni/kontralateralni supraklavikularni limfni čvor	
<b>T3</b>	Tumor koji zahvaća sve ipsilateralne pleuralne površine (parijetalnu, medijastinalnu, dijafragmalnu i visceralnu pleuru) s barem jednim od sljedećih obilježja: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invazija endotorakalne fascije</li> <li>• Širenje u medijastinalno masno tkivo</li> <li>• Solitarni, potpuno resektabilni fokus koji zahvaća meka tkiva stijenke prsnog koša</li> <li>• Ne-transmuralno zahvaćanje perikarda</li> </ul>	<b>Mx</b> <b>M0</b> <b>M1</b>	Udaljene metastaze se ne mogu procijeniti Bez dokaza udaljenih metastaza Prisutne udaljene metastaze	
<b>T4</b>	Tumor koji zahvaća sve ipsilateralne pleuralne površine s barem jednim od sljedećih obilježja: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Difuzna ili multifokalna invazija mekih tkiva stijenke prsnog koša</li> <li>• Bilo kakvo zahvaćanje rebara</li> <li>• Invazija peritoneuma kroz dijafragmu</li> <li>• Invazija bilo kojeg medijastinalnog organa</li> <li>• Izravno širenje na kontralateralnu pleuru</li> <li>• Invazija kralježnice ili brahijalnog pleksusa</li> <li>• Transmuralna invazija perikarda (s ili bez perikardijalnog izljeva) ili invazija miokarda</li> </ul>			

**Tablica 2.** Prikaz principa određivanja stadija malignog pleuralnog mezotelioma ovisno o vrijednostima pojedinih deskriptora

Stadij	T	N	M
<b>I</b>			
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T 2,3	N0	M0
<b>II</b>	T1,2	N1	M0
<b>III</b>			
<b>IIIA</b>	T3	N1	M0
<b>IIIB</b>	T1-3	N2	M0
<b>IV</b>	T4	N0-2	M0
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

### 1.2.3. Liječenje

Ovisno o stadiju bolesti te patohistološkoj dijagnozi, određuje se modalitet liječenja. Prema smjernicama NCCN (*eng. National comprehensive cancer network*), za stadij bolesti I-IIIa preferabilna metoda liječenja je kirurška resekcija ukoliko se radi o epiteloidnom ili bifazičnom podtipu DMPM, dok je za više stadije bolesti te sarkomatoidni podtip preporučeno sistemsko liječenje (39).

#### 1.2.3.1. Kirurško liječenje

Ukoliko je kod pacijenta s DMPMom indicirano torakokirurško liječenje, moguća su dva pristupa: prvi podrazumijeva aplikaciju neoadjuvantne/indukcijske kemoterapije prema platina/pemetreksed protokolu, nakon čega slijedi radiološka reevaluacija te torakokirurški zahvat, dok se kod drugog prvo provodi torakokirurško liječenje, nakon kojeg slijedi adjuvantna kemoterapija (39).

Kirurška resekcija za pacijente s MPM može uključivati pleurektomiju/dekortikaciju (P/D), za pluća poštednu operaciju, koja podrazumijeva potpuno uklanjanje zahvaćene pleure te svih

velikih tumora, s ili bez resekcije perikarda i/ili dijafragme u bloku. Alternativno, može se izvesti ekstrapleuralna pneumektomija (EPP), što podrazumijeva resekciju zahvaćene pleure, pluća te moguće ipsilateralne dijafragme i/ili perikarda u bloku. Neovisno o pristupu, tijekom operacije je potrebno učiniti resekciju limfnih čvorova sredoprsja na barem 3 razine radi određivanja patohistološkog N stadija bolesti.

Ne postoje podatci randomiziranih kliničkih studija koji bi dali prednost jednoj od dvije metode kirurškog liječenja. Podatci iz pojedinih retrospektivnih istraživanja također ne pokazuju jasan benefit po pitanju preživljenja pacijenata (40,41), makar se čini kako P/D nosi manji perioperativni rizik i smrtnost (42,43).

#### *1.2.3.2. Radioterapijsko liječenje*

Učinak radioterapije u liječenju mezotelioma je ograničen s buduću da je mezoteliom neosjetljiv na ionizirajuće zračenje. Izradu radioterapijskog plana i provedbu radioterapije otežava i način širenja tumora duž pleure, perikarda i peritoneuma te na okolne vitalne organe, zbog čega je otežano primjeniti odgovarajuću dozu te obuhvatiti kompletno područje zahvaćeno tumorom u polje zračenja, što značajno smanjuje učinkovitost metode (28). Radioterapija je u liječenju DMPM indicirana u adjuvantnom postavu, nakon kirurške resekcije. Primjenjuje se zajedno s kemoterapijom (konkomitantno) ili nakon kemoterapijskog liječenja (sekvencijski), s ciljem lokalne kontrole bolesti. Provođi se zračenje cijelog hemitoraksa, a primjena radikalnih doza zračenja putem modernih tehnika (IMRT, radioterapija moduliranog intenziteta) pokazala je značajan povoljan utjecaj na preživljenje pacijenata (43).

### 1.2.3.3. Sistemsko liječenje

Kemoterapijsko liječenje bazirano na cisplatinu i pemetreksedu predstavlja temelj sistemskog liječenja DMPM. Kod pacijenata kod kojih je moguća kirurška resekcija, kemoterapija se aplicira bilo kao neoadjuvantno/indukcijsko liječenje prije same operacije (s prvenstvenim ciljem preoperativne redukcije tumorske mase) ili kao neoadjuvantna terapija, s ciljem uništavanja zaostalih tumorskih stanica, u pravilu u kombinaciji s radioterapijom (44).

Kod neresektabilne bolesti, temelj sistemske terapije također je kombinacija platine (preferabilno cisplatinu) u kombinaciji s pemetreksedom. U studiji na 456 pacijenata u kojoj se dvojna terapija uspoređivala s dotadašnjim standardom liječenja cisplatinom, pokazan je benefit u preživljenju pacijenata liječenih cisplatinom i pemetreksedom (12.1 naprama 9.3 mjeseca, HR = 0.77, p=0.02) (45). Dodatak VEGF (*eng. vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni faktora rasta) inhibitora bevacizumaba dvojnjoj terapiji pokazao je dobru tolerabilnost i doprinjeo produljenju ukupnog preživljenja u kohorti od 448 pacijenata, pri čemu je ukupno preživljenje u grupi pacijenata liječenih bevacizumabom bilo za 2,7 mjeseci dulje u usporedbi s kemoterapijskom grupom (18,8 prema 16,1 mjeseci; HR, 0,77; p = 0,0167) (46).

Nakon što 15 godina nije bilo značajnijeg pomaka u sistemskom liječenju DMPM, posljednji napredak dogodio se uvođenjem imunoterapije anti-PD-1 antitijelom nivolumabom i anti-CTLA-4 antitijelom ipilimumabom. U registracijskoj randomiziranoj studiji faze 3, CheckMate743, uspoređivano je liječenje prve linije nivolumabom i ipilimumabom u odnosu na kemoterapiju platinom i pemetreksedom u 605 bolesnika s neoperabilnim MPM. Medijan ukupnog preživljenja u populaciji bolesnika koji su primali nivolumab i ipilimumab bio je 18,1 mjeseci (95% CI, 16.8–21.4) u odnosu na 14.1 mjesec (95% CI, 12,4–16,2) u onih koji su primali kemoterapiju (HR, 0,74; 96,6% CI, 0,60–0,91). Dvogodišnja ukupna stopa

preživljenja bila je 41% (95% CI, 35,1%–46,5%) u skupini koja je primala nivolumab i ipilimumab prema 27% (95% CI, 21,9%–32,4%) u kemoterapijskoj skupini (47).

Aktualne smjernice NCCN i ESMO (*eng. European society for medical oncology*) preporučuju liječenje pemetrexedom i cisplatinom ili kombinacijskom imunoterapijom ipilimumabom i nivolumabom, označavajući ih kao jednakovrijedne terapijske opcije. U slučaju progresije na prvu liniju liječenja, preporuka je provesti liječenje dvojnoumoterapijom ukoliko je bolesnik liječen kemoterapijom i obrnuto. NCCN smjernice savjetuju dodatak bevacizumaba kemoterapijskom protokolu (39,48).

Ostale sistemske terapijske su opcije skromne: vinorelbin i gemcitabin pokazuju određeni učinak u kontroli simptoma bolesti, no bez značajnijeg benefita po pitanju ukupnog preživljenja (49).

#### 1.2.4. Prognoza

Prognoza pacijenata s DMPM-om je loša. Usprkos terapiji, prosječno preživljenje od trenutka postavljanja dijagnoze je između 12 i 15 mjeseci, s tim da postoje i rjeđi slučajevi dugotrajnijeg preživljenja (50). Stopa petogodišnjeg preživljenja u američkoj populaciji je oko 7-12% za lokalno uznapredovalu i proširenu bolest, a 18% za lokaliziranu, dok je ukupna prosječna stopa 5-godišnjeg preživljenja oko 10% (51). Sarkomatodini podtip DMPM-a karakterizira vrlo loša prognoza, s medianom preživljenja od 4-8 mjeseci (22).

Podatci za Hrvatsku vezano za preživljenja pacijenata s DMPM-om svode se na pojedina kohortna izvješća, čiji se rezultati podudaraju sa svjetskima. Tako je u jednoj analizi preživljenja pacijenata s epiteloidnim DMPM median OS (*eng. median overall survival*, median ukupnog preživljenja) iznosio 11 mjeseci, s varijacijama ovisno o histološkim podtipu - 11 mjeseci za epiteloidni, 12.5 za miješani i 5.5 za sarkomatoidni te prema kliničkom stadiju - 7 mjeseci za stadij II, 17.5 mjeseci za stadij III te 11 mjeseci za stadij IV (52).

### **1.3. Čimbenici pluripotencije OCT4, NANOG i SOX2 i signalni put PI3K/AKT/BCL2**

Smatra se da je evolucija raka skup slučajnih, nekontroliranih procesa mutacijom izazvane aktivacije i inaktivacije gena kojim stanice tumora steknu fenotipske prednosti u odnosu na normalne stanice, dopuštajući im da se razmnožavaju i sele na lokalnoj razini i u udaljene organe (53). Noviji podaci ukazuju na to da su neke od ključnih značajki nastanka malignosti slične normalnim procesima kod razvoja embrija, koji su programirani i dobro regulirani. U onkogenezi dolazi do disregulacije tih procesa što uzrokuje gubitak mehanizama kontrole proliferacije te se stvaraju stanice koje pokazuju svojstva embrionalnih matičnih stanica, a nazivaju se matične stanice raka. U njima se bilježi visoka aktivnost gena koji stimuliraju proliferaciju i dediferencijaciju stanica - onkogeni i niska aktivnost gena suprotnog učinka, antionkogeni. Onkogeni povezani sa stanjem pluripotentnosti uključuju različite proteine, kao što je npr fosfotidil inozitol-3-kinaza (PI3K)/AKT/BCL-2 put (54).

Transkripcijski faktori OCT 4, NANOG i SOX2, odnosno geni koji ih kodiraju, nazivaju se čimbenicima pluripotentnosti te imaju važnu ulogu u normalnom embrionalnom razvoju. Njihova međuregulacija s onkogenima jedan je od mehanizama zloupotrebe njihovog potencijala održavanja stanja matičnosti stanice za potrebe onkogeneze (55).



### 1.3.1. OCT4

#### 1.3.1.1. Osnove genetike i funkcije OCT4

Protein OCT4 (*eng. octamer-binding transcription factor 4*, transkripcijski oktamer vežući faktor 4) kodiran genom *POU5F1* na 6. kromosomu, bio je prvi bitni gen, otkriven prije 25 godina, koji je označen kao jedan od glavnih za osiguravanje svojstva matičnosti embrionalnih matičnih stanica glodavaca i primata (56). U literaturi ga se još može naći pod nazivima OCT3, OCT3/4, OTF3 ili NF-A3, a pripada obitelji POU (PIT, OCT, UNC) proteina koji sudjeluju u transkripciji (57). OCT4 regulira izraženost ciljnih gena vezanjem na oktamernu sekvencu ATGCAAAT unutar regija promotora, prema čemu je i dobio ime. Tijekom embrionalnog razvoja najveći skok koncentracije OCT4 proteina u stanici događa se na prijelazu morule u blastocistu, tijekom čijeg se razvoja visoka koncentracija OCT4 održava u embrioblastu, a pada na niske razine u stanicama trofoblasta (58–60). U murinim modelima OCT4 *-/-* embriji razvijaju se do stadija blastociste sastavljenih samo od stanica trofoblasta te propadaju u vrijeme implantacije. (61) Viša izraženost OCT4 je bitna za daljnje očuvanje pluripotentnosti embrionalne matične stanice i diferencijaciju prema primitivnom endodermu i mezodermu, a daljnji kontrolirani skokovi izraženosti omogućuju uspostavu tkivno-specifičnih linija, npr. kardiogene i neuronalne (62–64).

Funkcija OCT4 usko je vezana za druge transkripcijske faktore, kao što su SOX2 i NANOG. Oni surađuju na održavanju samoobnove i pluripotencije mišjih i ljudskih embrionalnih matičnih stanica te zajedno vezani za promotore svojih gena omogućuju njihovu aktivaciju. U embrionalnim stanicama, OCT4, SOX2 i NANOG tvore jezgru transkripcijske mreže koja utječe na mehanizam samoobnove matičnih stanica, a koji se mogu klasificirati u dvije skupine nizvodnih gena sa suprotnim funkcijama: jedna skupina uključuje aktivno prepisivane gene povezane s proliferacijom i transkripcijske faktore potrebne za održavanje embrionalnih matičnih stanica (Slika 2.). Druga skupina uključuje transkripcijski „tihe“ gene

koji kodiraju razvojne regulatore koji se aktiviraju samo kad se stanice diferenciraju i usmjeravaju prema određenim lozama (65).

#### 1.3.1.2. Uloga OCT 4 u onkogenezi

U tumorogenezi, OCT4 je općenito gledano, više eksprimiran u slabije diferenciranim tumorima te je povezan s višom sklonosti metastaziranju i lošijom prognozom, no postoji i značajan broj studija čiji rezultati ukazuju na suprotno (66).

Tako je u eksperimentalnom modelu stanica karcinoma dojke jača izraženost OCT4, uzrokovana višom koncentracijom TGF- $\beta$ , dovela do epitelnono-mezenhimalne tranzicije matičnih karcinomskih stanica, dok je njegova inaktivacija smanjila staničnu invazivnost *in vitro* (67). Epitelno-mezenhimska tranzicija je važan proces u kojem epitelne stanice raka gube polaritet i adhezivnost te poprimaju mezenhimska svojstva migracije i invazije (68).

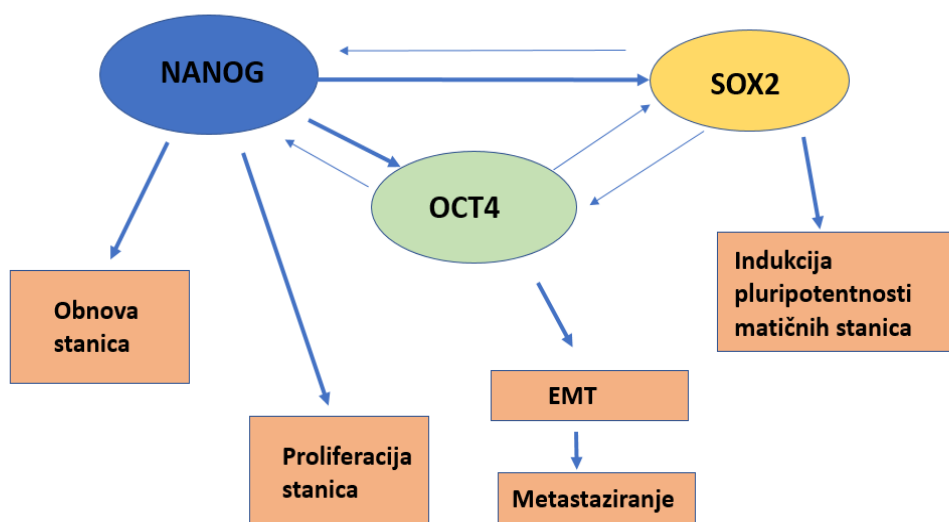
U nekoliko je eksperimentalnih modela istraživana utjecaj izraženosti OCT4 na otpornost na kemoterapijske lijekove. Stanice hepatocelularnog karcinoma s pojačanom izraženosti OCT4 pokazale su povećanu otpornost na cisplatinu i doksorubicin putem aktivacije G2 puta preko OCT4-AKT-ATP kompleksa, ali kemorezistencija nije primijećena u normalnim jetrenim stanicama, usprkos prekomjernoj izraženosti OCT4 (69). Druga je studija pokazala povezanost prekomjerne izraženosti OCT4 i NANOG s otpornosti na cisplatinu (70). Stanice melanoma s egzogenom izraženosti OCT4 imale su veću stopu proliferacije i bile su otpornije na cisplatinu u odnosu na kontrolne stanice (70). U istraživanju na staničnim linijama mezotelioma, izlaganje hipoksiji dovelo je do povećane rezistencije stanica na cisplatinu, pri čemu su one pojačano eksprimirale OCT4 (71).

U nekim je studijama suprimirana izraženost OCT4 kako bi se procijenio njegov učinak na otpornost na lijekove, pri čemu se pokazalo da *knockdown* OCT4 povećava osjetljivost na

cisplatinu i zračenje u stanicama raka pluća (72), kao i na liječenje EGFR inhibitorom gefitinbom u nesitnostaničnom karcinomu pluća (73). U stanicama glioma su se u SOX2 i OCT4 pokazali kritični u zadržavanju tumorigenosti staničnih linija i rezistenciji na kemoterapeutike, dok je *knockout* OCT4 povećao osjetljivost stanica glioma na temozolomid (74).

Izraženost OCT4 i kemorezistencija su negativno korelirali u tumoru zametnih stanica testisa, u kojem je izloženost cisplatinu smanjila izraženost OCT4 i povećala otpornost na lijekove (75). Novija su istraživanja za taj kontroverzni rezultat okrivila razlike u stupnjevima diferencijacije stanica u zametnim tumorima te se pokazalo kako izraženost OCT4 raste proporcionalno malignosti pojedinih subtipova tumora zametnih stanica (76), premda nije dokazana ovisnost izraženosti OCT4 i kemosenzitivnosti tumora zametnih stanica.

Na seriji pacijenata s kolorektalnim karcinomom Zhou i sur. su pokazali da se transkripcija i translacija OCT4 povećava postupno, od ne-tumorskih lezija, preko benignih tkiva polipa do karcinomskog tkiva. Izraženost OCT4 značajno je korelirala s gradusom i stadijem bolesti, a slučajevi s visokim razinama OCT 4 imali su značajno kraće srednje vrijeme preživljenja u odnosu na slučajeve bez OCT4 izraženosti (77). U karcinomu gušterače rezultati su suprotstavljeni– u jednoj je studiji dokazana značajno veća izraženost OCT4 u prekanceroznim lezijama u odnosu na tumorske stanice, dok je u drugima veća izraženost OCT4 korelirala s lošijim preživljenjem pacijenata (78). Krogh Peteresen i sur. su pokazali proporcionalnost izraženosti OCT4 i gradusa tumora u uzorcima glioblastoma, premda nije dokazan njen nezavisni prognostički utjecaj (79).



**Slika 2.** Shematski prikaz interakcija NANOG, OCT4 i SOX2 čimbenika pluripotentnosti i njihovih glavnih efektorskih puteva. EMT – epitelno-mezenhimska tranzicija; Prema Zhang i sur (80).

### 1.3.2. NANOG

#### 1.3.2.1. Osnove genetike i funkcije NANOG-a

NANOG je divergentni protein homebox domene, transkripcijski faktor matičnih stanica koji igra važnu ulogu u regulaciji sudbine stanica, njihovoj proliferaciji i apoptozi. Izvorno je opisan 2003. godine i dobio je ime po mitološkoj keltskoj zemlji, „Tir Na Nog“, („Zemlji uvijek mladih“) (81). Slično kao OCT4, tijekom embrionalnog razvoja počinje biti detektabilan u fazi morule, a njegova se izraženost pojačava u blastocisti, gdje pozitivno korelira sa smještajem stanica u unutarnju staničnu masu (kasnijim embrioblastom), dok je odsutan u stanicama trofoblasta (60). U kasnijem embrionalnom razvoju detektiran je u gonocitama, u kojima se najjača pratila oko 15. (u ovarijima) odnosno 20. (u testisima) tjedna gestacije, s postupnim padom prema kraju trudnoće (8.2) Više razine NANOG-a, kao

i OCT4, detekirane su i u kardiogenim matičnim stanicama (64). U zrelim, diferenciranim, somatskim stanicama NANOG je utišan, no aberantna izraženost NANOG -a detekirana je kod mnogih neoplazmi (83), a posebice je izražena u stanicama embrionalnih karcinoma (84).

#### 1.2.2.2 Uloga NANOG-a u onkogenezi

Izraženost NANOG-a detekirana je u značajnom postotku displazija grkljana, a preko polovice pacijenata s prekanceroznim lezijama grkljana s jakom citoplazmatskom NANOG reakcijom razvilo je rak grkljana tijekom 5 godina, u usporedbi sa samo 20% pacijenata s negativnim do umjerenom izraženosti NANOG-a. Izraženost nuklearnog NANOG pri tome nije pokazivala klinički značajnu korelaciju (85). U prekanceroznim lezijama probavnog sustava – želučanim metaplazijama i displazijama, kao i u adenomima debelog crijeva, izraženost NANOG-a je bila povećana u odnosu na zdravu sluznicu (86,87).

U gliomima je izraženost NANOG-a bila pojačana u usporedbi s normalnim tkivom mozga pokazujući pozitivnu korelaciju s malignitetom i gradusom, a pacijenti s astrocitomom i glioblastomom pokazali su značajno kraću stopu preživljavanja u slučaju visokih razina NANOG (88). Druga studija pokazala je više razine NANOG mRNA kod pacijenata s lošim odgovorom na kemoradioterapijsko liječenje (89).

Kod karcinoma pluća izraženost NANOG-a je pozitivno korelirala s TNM stadijem i diferencijacijom, prisutnošću pleuralne i vaskularne invazije te smanjenim ukupnim preživljenjem odnosno rezistencijom na kemoterapijsko liječenje. Podaci variraju od studije do studije te je izraženost NANOG-a detektirana u 30–93% uzoraka karcinoma pluća, ovisno o studiji. (90,91). Izraženost je bila veća u planocelularnim karcinomima u odnosu na adenokarcinome, uz njen izostanak u zdravom plućnom tkivu (92).

U mokraćnom sustavu, NANOG je detektiran u karcinomu bubrega i urotelnom karcinomu, a zabilježila se značajna razlika u izraženosti NANOG u stanicama karcinoma bubrega u

odnosu na okolna tkiva. Također, veća izraženost NANOG detektirana je u agresivnijim podtipovima karcinoma bubrega i urotelnog karcinoma, sugerirajući lošiju prognozu. (93)

.U malignomima probavnog sustava kolorektalnom, želučanom i karcinomu jednjaka, analiza izraženosti NANOG pokazala je pozitivnu korelaciju s višim stadijem, slabijom diferencijacijom, dubinom infiltracije i lošijim ukupnim preživljenjem. Kod raka želuca, izraženost *NANOG* gena bila je značajno viši u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom i bila je povezana s TNM stadijem, stupnjem diferencijacije tumora i skraćenim ukupnim preživljenjem (94). Izraženost NANOG proteina detektirana je samo u određenom postotku uzoraka karcinoma želuca – 10-25%, ovisno o studiji, dok je u okolnom tkivu bio slabo detektabilan u oko 85% slučajeva. (94,95) Izraženost *NANOG* gena bila je vrlo visoka u stanicama kolorektalnog karcinoma, dok je NANOG protein detektiran u oko 40% slučajeva. Njegova izraženost nije povezana s lošijom kliničkom prognozom (96).

Povećanje izraženosti NANOG povezano je s TNM stadijem u adenokarcinomu gušterače te lošijim preživljenjem (97). Izraženost NANOG proteina u karcinomskim stanicama kretao se od oko 30-50%, uz varijabilan intenzitet. U prekliničkim modelima istovremeni knockout NANOG i OCT4 značajno je smanjio sposobnost proliferacije, migracije, invazije, kemorezistencije i tumorigeneze stanica karcinoma gušterače (98).

Važnost istovremene izraženosti NANOG-a i OCT4 pokazana je i u stanicama hepatocelularnog karcinoma, gdje je vaskularna invazivnost karcinomskih stanica pozitivno korelirala s njihovom simultanom pojačanom aktivnošću. Izraženost NANOG-a neovisno je pozitivno korelirala s višim TNM stadijem i kliničkim ishodom (99).

U karcinomima jajnika zabilježena je visoka aktivnost NANOG u agresivnijim histološkim podtipovima, dok u prekanceroznim lezijama odnosno karcinomima bolje prognoze ona varira od potpuno negativne do umjerene, ovisno o studiji (100,101) .

### 1.3.3. SOX2

#### 1.3.3.1. Osnove genetike i funkcije SOX2

Obitelj proteina SOX (*eng. SEX determining factor Y homology box*) sastoji se od 20 članova podijeljenih u 9 podgrupa, od kojih je SOX2 najistraženiji.

Tijekom embrionalnog razvoja SOX2 je bitan za ispravan razvoj morule prema blastocisti i blastuli gastruli, odnosno za pravilnu diferencijaciju embrionalne matične stanice prema embrioblastu odnosno trofoblastu (102). Tijekom morulacije, izraženost SOX2 podudara se s pluripotentnim embrionalnim matičnim stanicama (ES) koje se kasnije premjeste u unutarnju staničnu masu blastule, odnosno embrioblast (103). U murinim modelima delecija *Sox2* u zigoti rezultira ranom embrionalnom smrću u periimplantacijskom razdoblju s vidljivim malformacijama epiblasta (104).

Funkcija SOX2 najbolje je proučena tokom razvoja neuralne cijevi, gdje se njegova izraženost prati od područja neuralnog grebena u kojem se razvijaju neuralne matične stanice, do subventrikularne zone lateralne komore i parahipokampalne regije, gdje se SOX2 pozitivne neuralne matične stanice nalaze u mozgu odraslih (102). SOX2 je također detektiran u području adenohipofize kao i u stanicama Ratkeove ciste što sugerira njegovu važnost u interakciji stanica neuralnog grebena i endoderma tijekom hipofizealnog razvoja (105). U diferencijaciji endoderma i formiranju primitivnog jednjaka, želuca i crijeva uloga *Sox2* je pokazana na murinom modelu gdje su jedinke bez njegove ekspresije imale značajne malformacije probavnog sustava, prvenstveno u smislu poremećene makro- i mikroarhitektonike te međudnosa keratiniziranih i mukoznih stanica, s poremećajem epitelne stratifikacije (106). U razvoju kože kod ljudi SOX2 je eksprimiran u mezenhimalnom sloju iz kojeg se razvijaju dermalni sloj i papile, dok se kod odraslih osoba

pozitivitet prati samo u multipotentnim kožnim stanicama sa sposobnošću mutilinijske diferencijacije (107). Rijedak genetski poremećaj SOX2 haploinsuficijencije koji se javlja kod ljudi manifestira se razvojem poremećajima oka, uha, hipofize te mentalnom zaostalošću (108).

Posebna uloga pripisuje se SOX2 u održavanju stanja pluripotentnosti u CSC (*eng. cancer stem cells*, matične stanice raka), staničnoj populaciji kojoj se pripisuje sposobnost formiranja i rasta tumora. Iako se još vode rasprave oko preciznog definiranja markera i metode kojima bi se sigurno diferencirale matične stanice raka od ostalih stanica, u nekoliko studija na uzorcima karcinoma glave i vrata, raka vrata maternice te meduloblastomu, među SOX2 pozitivnim stanicama u tumorskim tkivima češće su bile detektibilne one s karakteristikama MKS (109–111). Te se stanice, pokazalo se, nalaze u fazi mirovanja odnosno „spore cirkulacije“ te je njihova sposobnost repopulacije tumora nakon prekida kemoterapijskog liječenja jedan od mogućih uzroka rezistencije odnosno pojave relapsa bolesti (112).

#### 1.3.3.2. Uloga SOX2 u onkogenezi

Brojne su studije u posljednjih 15-ak godina proučavale izraženost SOX2 u uzorcima karcinoma raznih sijela. Rezultati dominantno govore u prilog pojačane izraženosti SOX 2 u slabije diferenciranim tumorima te njegove korelacije s lošijom prognozom.

Visoka izraženost SOX2 detektirana je u karcinomu jajnika visokog gradusa, najizraženije seroznom karcinomu. Jača izraženost SOX2 također je pozitivno korelirala s višim TNM/FIGO (*eng. International federation of gynecology and obstetrics*, međunarodna udruga ginekologije i porodništva) stadijem, kraćim vremenom do pojave povrata bolesti te lošijom ukupnom prognozom (113).



U karcinomu dojke, pojačana izraženost SOX2 povezana je s povećanom rezistencijom karcinomskih stanica na tamoxifen u in vitro modelima, a značajno veća izraženost SOX2 zabilježena je u uzorcima karcinoma dojke uzetih nakon progresije na hormonsku terapiju. (114). U studijama u kojima je istraživana izraženost SOX2 na resekcijskom materijalu rezultati pokazuju kako veća izraženost OCT4, ali ne i SOX2 utječe na slabiju diferencijaciju, viši TNM stadij i lošiju prognozu trostruko negativnog karcinoma dojke, dok je kod HER2 pozitivnih karcinoma pokazana veća izraženost SOX2, OCT4 i NANOG kod slabije diferenciranih karcinoma; niti ovdje nije bilo jasne korelacije SOX2 i preživljenja pacijentica (115,116).

Kod nesitnostaničnih karcinoma pluća jača izraženost zabilježena je u karcinomu pločastih stanica, dok je u adenokarcinomima bila slabija ili negativna. Zanimljivo je da je pojačana izraženost SOX2 u karcinomima pločastih stanica korelirala s mlađom dobi postavljanja dijagnoze, ali i s boljom prognozom i slabijim metastatskim potencijalom tumora (117). Viša izraženost SOX2 povezana je sa slabijim metastatskim potencijalom te boljom prognozom i kod karcinoma želuca (118), dok su kod karcinoma glave i vrata rezultati konfliktni: inicijalne su studije pokazivale značajno veću sklonost povratu bolesti i lošiju prognozu tumora s visokom izraženosti SOX2 (119), a noviji rezultati govore u prilog duljeg vremena do povrata bolesti i boljeg preživljenja tumora s visokom SOX2 izraženosti. (120)

U uzorcima karcinoma pankreasa SOX2 je bio izražen u preko 60% uzoraka, no samo u rijetkim uzorcima duktalne intraepitalne neoplazije, (121), dok je u karcinomu prostate izraženost direktno korelirala s Gleason bodovanjem te kastracijskom rezistencijom tumora (122). U skladu s mnogim izvješćima koja povezuju izraženost SOX2 s većim brojem metastaza, uočena je snažna veza između SOX2 i epitelno-mezenhimalne tranzicije u mnogim vrstama tumora, uključujući kolorektalni karcinom, karcinom jednjaka, larinksa, gušterače, pluća, raka želuca, dojke i prostate (123).

Za neke tumore, kao npr. planocelularni karcinom glave i vrata te karcinom jajnika, postoje studije čiji rezultati sugeriraju lošiju prognozu tumora s niskom izraženosti ili njenim gubitkom, u odnosu na one s visokom izraženosti SOX2 (120,124), što pokazuje potrebu za dodatnim preciziranjem uloge SOX2 u kancerogenezi.

#### 1.3.4. PI3K/AKT

##### 1.3.4.1. Struktura PI3K

PI3K (*eng. fosfoinositide 3-kinase*, fosfatidil inozitol 3 kinaza) je skupina lipidnih kinaza povezanih s plazma membranama, a sastoji se od tri podjedinice (125). PI3K je podijeljen u 3 klase: I, II i III. PI3K klase I sastoje se od klasa IA i klase IB, od kojih je klasa IA, heterodimer regulatorne podjedinice p58 i katalitičke podjedinice p110, tip koji je najjasnije povezan s karcinogenezom u ljudi. Klasa IA PI3K sadrži p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  i p110 $\delta$  katalitičke podjedinice kodirane genima PI3KCA, PI3KCB i PI3KCD (125,126).

##### 1.3.4.2. Struktura AKT

AKT je serinsko/treoninska kinaza, prethodno poznata kao protein kinaza B (PKB), koja se sastoji od tri izoforme (AKT1, AKT2 i AKT3), s ključnom ulogom u glavnim staničnim funkcijama uključujući rast stanice, kontrolu staničnog ciklusa, regulaciju metabolizma glukoze, stabilnost genoma, transkripciju, sintezu proteina i neovaskularizaciju. AKT potiče preživljavanje stanica posredovanjem staničnih faktora rasta i blokiranjem apoptoze inaktivacijom pro-apoptičnih proteina (127).

#### 1.3.4.3. Uloga PI3K/AKT signalnog puta

PI3K/AKT signalni put može biti aktiviran raznim stimulusima (uglavnom interakcijom tirozin kinaznih receptora i liganda) koji ih putem kaskade fosforilacije prevodi u nizvodne molekularne odgovore (126) .

Aktivacija signalnog puta započinje aktivacijom transmembranskog receptora PI3K pri čemu se katalizira fosforilacija PtdIns P2 (PIP2) kako bi nastao PtdIns P3 (PIP3). On dalje aktivira kaskadu, pri čemu se konačno različiti signalni proteini, između ostalih i AKT, mogu vezati na staničnu membranu kako bi aktivirali stanični rast i puteve preživljavanja. Najbitniji direktni regulator aktivnosti je PTEN (*eng. phosphatase and tensin homolog*, homolog fosfataze i tenzina), koji regulira put defosforiliranjem PIP3 u PIP2 i na taj način koči aktivaciju nizvodnih kinaza (121).

Najprimitivniji efekt ovog puta, prisutan u svim tkivima u organizmu, jest odgovor na prisutnost inzulina ili IGF-1 (*eng. insulin-like growth factor 1*, inzulinu sličan faktor rasta 1), odnosno aminokiselina, čije prisustvo na staničnoj membrani pokreće signalnu kaskadu stimulirajući mTOR, što rezultira pojačanim unosom glukoze preko GLUT-a (128) ili stimulira sintezu proteina aktivacijom ribosomskog S6 proteina mTORC1 kompleksom (129).

Osim ove osnovne, danas su poznate razne uloge PI3K/AKT signalnog puta, koji može biti aktiviran cijelim nizom receptorskih i nerekceptorskih tirozin kinaza, tirozin fosforiliranih adaptorskih proteina, G protein spregnutih receptora (GPCR) i malih GTPaza iz RAS superobitelji. (130) Posljedična aktivacija AKT može djelovati preko više od 100 poznatih signalnih supstrata, od kojih su najbitniji mTOR kompleks te transkripcijski faktori iz FOXO obitelji (131). MTOR je jedno od ključnih čvorišta balansa anabolizma i katabolizma stanice, a mTORC1 izravno regulira mnoge korake procesa autofagije. On također fosforilira i

mijenja aktivnost transkripcijskih faktora kako bi potisnuo izraženost gena potrebnih za stvaranje autofagosoma i lizosoma (132). FOXO transkripcijski faktori zaduženi su za regulaciju mehanizama diferencijacije stanica te proapoptotsko djelovanje, a aktivirani AKT djeluje na način da suprimira FOXO (130).

#### 1.3.4.4. Uloga PI3K/AKT u onkogenezi

U karcinogenezi, aktivacija PI3K i naknadna fosforilacija AKT-a neophodni su za ublažavanje inhibitorne regulacije kinaza ovisnih o ciklinima u staničnoj proliferaciji, čime se potiče ulazak stanica raka u stanični ciklus (133). Posljedičnim aktiviranjem mTOR-a u stanicama raka postiže se sinteza proteina i pojačan unos glukoze u stanicu s jedne strane te inhibicija autofagije i degradacije proteina inhibicijom lizosoma s druge strane (132).

Kako je u tumorima zbog promjene staničnog metabolizma na energetski bitno neprofitabilniji put anaerobne glikolize značajno povećana potreba za glukozom, njen povećani unos u stanicu uvelike je posredovan signalizacijom inzulina-PI3K, uz aktivaciju nizvodnih signalnih puteva. Mutacije, uglavnom mutacije povezane s povećanjem funkcije, u genima koji kodiraju komponente ovog puta rezultiraju povećanom signalnom aktivnošću. Stoga inzulin igra bitnu ulogu u rastu tumora putem signalnog puta PI3K (134,135).

Uloga PI3K puta dobro je proučena u limfomima i leukemijama pa tako podvrsta difuznog B velikostaničnog limfoma (GCB DLBCL), T-ALL (T- akutna limfoblastična leukemija) u dječjoj dobi, kronična limfocitna leukemija (CLL), folikularni limfom (FL) i drugi ovise o mutacijama PIK3 gena ili PTEN (136). Razvijeno je nekoliko lijekova koji djeluju na PI3K i koriste se u liječenju hematoloških malignoma, pa tako idelalisib i umbralisib blokiraju PI3K $\delta$ , dok copanlisib djeluje kao pan-PI3K inhibitor (131).

U solidnim tumorima PI3K se u nekim studijama povezuje sa slabijim preživljenjem i rezistencijom na kemoprateutike i biološku terapiju kod pacijenata s karcinomom kolona (137,138), dok je u drugima jača izraženost PI3K korelirala sa slabijom skonošću stvaranja peritonealnih metastaza. Istraživanja karcinoma dojke su pokazala da su mutacije u *PI3KCA* češće kod karcinoma dojke pozitivnih na hormonske receptore i HER2 (139), dok su podatci o ukupnom prognstičkom značaju PI3K kontradiktorni. Neki rezultati govore u prilog slabijeg terapijskog odgovora te lošijeg preživljenja pacijenata s *PI3K* mutacijom, dok u drugim istraživanjima ta razlika nije potvrđena ili pak govori u prilog pozitivnog prognstičkog značaja *PI3K* mutacija (140,141). Za liječenja bolesnica s HR+, HER2-karcinomom dojke s dokazanom *PI3K* mutacijom dokazana je učinkovitost PI3K $\alpha$  inhibitora apelisiba u kombinaciji s fulvestrantom, uz zadovoljavajući toksični profil (142).

U karcinomu pluća *PI3K* mutacije nisu česte, a malobrojna istraživanja sugeriraju lošije preživljenja pacijenata, dok u karcinomima glave i vrata te karcinomu jednjaka, čini se, te mutacije daju bolju prognozu (138). U istraživanjima uzoraka glioblastoma pokazalo se kako je pojačana aktivnost PI3K/AKT puta povezana s agresivnijim ponašanjem bolesti, no u nekim se in vitro modelima povećana izraženost AKT3 povezivao s boljim ishodom i sporijom progresijom tumora (143). U karcinomu prostate zabilježena je pojačana aktivnost PI3K/AKT puta, s dominantno nizvodnom aktivacijom mTOR, ali uz značajne varijacije u posttranskripcijskim modifikacijama izraženosti pojedinih komponenti signalnog puta te bez jasne povezanosti s dinamikom tumorskog rasta (144).

### 1.3.5. BCL2

#### 1.3.5.1. Osnove genetike i funkcije BCL2

BCL2 (*eng. B cell lymphoma 2*) je jedan od glavnih antiapoptotičkih faktora u ljudskim stanicama te jedan od prvih uopće otkrivenih u staničnoj biologiji. Prvi puta je otkriven u folikularnom limfomu, gdje kromosomska translokacija između kromosoma 14 i 18, t(14:18), uzrokuje pojačanu transkripciju BCL-2, što dovodi do većeg preživljenja stanica raka (145).

Jedan od glavnih aktivacijskih puteva BCL-2 povezan je s PI3K/AKT putem, čija aktivacija potiče BCL2, BCL-XL i BAD, što dovodi do izbjegavanja apoptotskih procesa (146).

Dokazan je i mehanizam kojim BCL2 regulira AKT (147) pa možemo zaključiti da postoji AKT-BCL2 signalna mreža kompleksnija od klasične nizvodne regulacije.

BCL-2 može inhibirati apoptozu stvaranjem heterodimera s BAX-om i osigurati preživljavanje stanice reguliranjem koncentracije kalcijevih iona i antioksidativnim učinkom (148). Osim toga, također može inhibirati aktivnosti kaspaza 9, 3, 6 i 7, čime inhibira apoptozu, produžujući vrijeme preživljavanja tumorskih stanica i uzrokujući malignu transformaciju stanica (149). Osim u tumorskim, uloga BCL-2 dokazana je i u drugim patofiziološkim procesima, pa se tako pokazalo kako aktivnost PI3K/AKT/BCL2 puta igra važnu ulogu u mehanizmima hipertrofije miokarda (150).

#### 1.3.5.2. Uloga BCL2 u onkogenezi

BCL2 istražen je u mnogim sjelima raka, kao što su rak dojke, želuca, prostate, pluća, limfom te hepatocelularni karcinom.

Kod pacijenata s rakom želuca pokazalo se da BCL2 ne samo da inhibira apoptozu, već djeluje i kao antagonist tumor-supresorskih gena. Tako je izraženost BCL2 bila najveća u ranoj fazi raka želuca i postupno se smanjivao tijekom daljnjeg razvoja raka (149). Visoka izraženost BCL2 povezana je s većom rezistencijom na kemoterapiju (151). U karcinomu dojke BCL2 je također usko povezan s pojavom i proliferacijom stanica raka. Pokazalo se da BCL2 može inhibirati apoptozu te produžiti stanični ciklus, a zatim odgoditi proliferaciju tumorskih stanica. Zato smanjena izraženost BCL-2 može dovesti do indukcije raka dojke (152), a zabilježeno je da je bolest kod pacijentica s visokom izraženosti gena BCL2 pokazivala benigniji tijek, što se može koristiti kao jedan od molekularno-bioloških pokazatelja za predviđanje razvoja metastaza u limfnim čvorovima (153).

Prekomjerna izraženost BCL2 rani je događaj u razvoju raka pluća, a neke studije su naglašavale razine izraženosti BCL2 kao prognostički indikator za liječenje (154). EGFR put može modulirati ulogu kaskade BAX/BCL2 u nesitnostaničnom karcinomu pluća, pri čemu inhibicija EGFR (*eng. epidermal growth factor receptor*, receptor za epidermalni čimbenik rasta) rezultira u regulaciji pro-apoptotskih proteina koji stimuliraju apoptozu aktiviranjem apoptotskih puteva (155) .

BCL-2 može spriječiti apoptozu stanica hepatocelularnog karcinoma blokiranjem puta apoptoze Fas/FasL i stvaranjem kompleksa s BAX-om. BCL-2 inhibira apoptozu, a njegova prekomjerna izraženost i fosforilacija sudjeluju u regulaciji stanične proliferacije, igrajući izuzetno važnu ulogu u nastanku samog tumora i otpornosti na lijekove (156).

#### 1.4. Svrha rada

Svrha ovog rada je analizirati izraženost gena i proteina čimbenika pluripotencije SOX-2, OCT-4 i NANOG te signalnog puta PI3K/AKT/BCL2 u bioptičkim i operativnim uzorcima DMPM-a. Također će se ispitati razlika izraženosti navedenih gena i proteina među pojedinim histološkim podtipovima te analizirati međusobnu povezanost izraženosti gena u uzorcima.

Kako bi se definirala klinička značajnost dobivenih rezultata, analizirat će se utjecaj izraženosti pojedinih gena i proteina na preživljavanje pacijenata, u kontekstu drugih kliničkih podataka.

Naši će rezultati pružiti nove spoznaje o aktivnosti transkripcijskih faktora i signalnih puteva u malignom pleuralnom mezoteliomu, koje će se moći koristiti u daljnim istraživanjima, s krajnjim ciljem razjašnjavanja onkogenetskih mehanizama te kliničkih ishoda pacijenata s DMPM-om.



## **2. HIPOTEZA**

Snažnija ekspresija transkripcijskih faktora SOX2, OCT4 i NANOG te signalnog puta PI3K/AKT/BCL2 u stanicama malignog pleuralnog mezotelioma korelira s lošijim preživljenjem bolesnika.

## **3. CILJEVI**

### **3.1 Opći cilj**

Istražiti korelaciju između ekspresije gena SOX2, OCT4 i NANOG u stanicama malignog mezotelioma, aktivacije onkogenog puta PI3K/AKT/BCL2 i ishoda liječenja bolesnika.

### **3.2. Specifični ciljevi**

- 1) Ispitati razinu ekspresije transkripcijskih faktora SOX2, OCT4 i NANOG te komponenti signalnog puta PI3K/AKT/BCL2 u uzorcima malignog pleuralnog mezotelioma bolesnika
- 2) Ispitati povezanost ekspresije transkripcijskih faktora sa stupnjem diferencijacije tumora i histološkim podtipovima
- 3) Istražiti korelaciju ekspresije transkripcijskih faktora i aktivnosti signalnog puta PI3K/AKT/BCL2, te korelaciju ekspresije PI3K/AKT/BCL2 s preživljenjem bolesnika

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Uzorci**

Provedeno je retrospektivno istraživanje na uzorcima tkiva mezotelioma pleure iz arhive Odjela za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb, pacijenta liječenih na Klinici za plućne bolesti Jordanovac odnosno na KBCu Zagreb, Klinici za plućne bolesti. Uzorci korišteni u istraživanju obuhvatili su razdoblje od 2000. do 2018. godine.

Kako bi se izbjegli problemi s mogućom dugotrajnom RNA nestabilnosti, za PCR analizu koristili smo normalne kontrole pleure, dobivene ručnom mikrodisekcijom te uzorke mezotelioma dijagnosticiranih i liječenih na Klinici za plućne bolesti KBC Zagreb između 2016. i 2018. godine.

### **4.2. Imunohistokemijska analiza izraženosti proteina**

Imunohistokemija je korištena za određivanje izraženosti proteina OCT4, NANOG, PI3K, AKT, SOX2, i BCL2 na stanicama mezotelioma. Imunohistokemijska detekcija je obavljena korištenjem EnVision Flex sustava (Dako, Danska) na sobnoj temperaturi, a kao pozitivna kontrola je korišten 3,3-diaminobenzidin tetrakloridom (DAB, Dako, Danska).

Iz parafinskih blokova učinjeni su rezovi od 3-4  $\mu\text{m}$ , koji su zatim deparafinizirani i predigestirani u termo kupelji (DAKO, Danska) uz primjenu "EnVision target retrieval solution" (DAKO, Danska). Imunohistokemijsko bojenje učinjeno je koristeći automatizirani imunohistokemijski sistem (DAKO autostainer, DAKO, Danska). Radi imunohistokemijskog bojenja korištena su primarna monoklonska antitijela kunića: anti-OCT4 (1/500, Abcam, ab200834), anti-NANOG (1/100, Abcam, ab109250), anti-PI3 kinaza p85 alfa (fosfo Y607;

1/200, Abcam, ab182651) i anti-AKT1 (fosfo S473; 1/200, Abcam, ab81283), te mišje monoklonsko antitijelo anti-SOX2 (1/200, Abcam, ab171380). Uzorci bez primarnih antitijela služili su kao negativne kontrole. Kao pozitivne kontrole za antitijela korištena su odgovarajuća tkiva. Fiksirana tkiva su zatim inkubirana 30 minuta u sekundarnom antitijelu (EnVision HRP, Agilent) i obojena s DAB-om kroz 1 minutu. Reakcija je snimljena kamerom postavljenom na svjetlosni mikroskop za uzorke tkiva. Intenzitet DAB bojenja u stanicama određen je korištenjem softvera ImageJ (NIH) na način da se od intenziteta svjetlosti pozadine oduzima intenzitet svjetlosti iznad određenih dijelova stanica (jezgre za SOX2, odnosno citosola za druge proteine).

Veća vrijednost intenziteta DAB bojenja ukazuje na veću izraženost pojedinog proteina. Imunohistokemijski (Im) indeks, kao semikvantitativna vrijednost, korišten je za analizu izraženosti proteina u uzorcima ljudskog tkiva. On se određuje množenjem postotka pozitivno obojenih stanica (0 = nema pozitivnih stanica; 1 = manje od 10%; 2 = 10–50% i 3 = više od 50% pozitivnih stanica) s intenzitetom bojenja (0 = nema bojenja; 1 = slabo; 2 = umjereno i 3 = jako bojenje).

### 4.3. qPCR analiza izraženosti gena

Provedena je kvantitativna PCR analiza, na način da je RNA ekstrahirana iz uzoraka mezotelioma koristeći High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche). Koncentracija ekstrahirane RNA mjerena je spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (Nano Drop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Reverzna je transkripcija izvedena pomoću kompleta za reverznu transkripciju cDNA visokog kapaciteta (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) u Thermal Cycler ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema programu: 10 min na 25 °C; 120 min na 37 °C; 5 min na 85 °C; ∞ na 4°C. Reakcijska smjesa bila je sastavljena od: 1 µg RNA, 2 µl nasumičnih početnica za reverznu transkripciju, 2 µl pufera za reverznu transkripciju, 0.8 µl mješavine deoksinukleotida, 1 µl MultiScribe reverzne transkriptaze, 1 µl inhibitora RNaza te destilirane vode bez RNaza/DNAza do konačnog volumena od 20 µl.

Izraženost gena analizirana je instrumentom Cobas z 480 (Roche) prema uputama proizvođača. Relativna izraženost odabranih gena korigirana je u odnosu na endogenu kontrolu, RPLP0. Sljedeći testovi izraženosti gena dobiveni su od Thermo Fisher Scientific: POU5F1 (Hs00999632\_g1), NANOG (Hs04260366\_g1), SOX2 (Hs01053049\_s1), PI3KCA (Hs00907957\_m1), PI3KCD (Hs00192399\_m1), AKT1 (Hs00178289\_m1), AKT2 (Hs01086102\_m1), AKT3 (Hs00987350\_m1) i BCL2 (Hs00608023\_m1)

Kako bi se odredile razlike u izraženosti, uspoređene su razine izraženosti istraživanih gena u stanicama mezozeleoma odnosno mezotela. Korištena je  $\Delta\Delta C_t$  metoda koja koristi formulu  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $C_t$  (*eng. threshold cycle*) je vrijednost koja označava broj ciklusa koji je potreban da fluorescencija signalnih molekula testa za sekvenciju određenog gena, povezana s njenom amplifikacijom, dosegne prag detekcije.  $C_t$  vrijednost je obrnuto proporcionalna početnoj količini amplikona u uzorku.

Konačni se rezultat prikazuje kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrijednost odnosno faktor promjene izraženosti gena (*eng. fold-change*), broj koji označava koliko puta je promijenjena izraženost gena ispitivanog uzorka u odnosu na kontrolni uzorak (157).

#### **4.4. Statistička analiza podataka**

Razlika u izraženosti ispitivanih proteina u imunohistokemijskim uzorcima analizirana je korištenjem neparametrijskih testova za nezavisne uzorke - Mann-Whitney U test za usporedbu 2 uzorka, odnosno Kruskal Wallis test za usporedbu 3 ili više uzoraka. Uzeta je vrijednost statističke pogreške  $p < 0.05$  kao granica statističke značajnosti.

Analiza međuodnosa izraženosti gena provedena je korištenjem Pearsonove metode korelacije za kontinuirane varijable. Ovisno o vrijednosti Pearsonovog koeficijenta rezultati su podijeljeni u one jake korelacije (Pearsonov koeficijent  $\geq 0.50$ ) srednje korelacije (za vrijednost Pearsonovog koeficijent između 0.3 i 0.49) te niske korelacije (za vrijednost Pearsonovog koeficijent 0.29 i nižu). Kao granična vrijednost statistički značajne korelacije uzeta je vrijednost  $p < 0.05$ .

Kako bismo utvrdili utjecaj izraženosti ispitivanih gena i proteina na preživljenje pacijenata, korištena je neparametrijska, Kaplan – Meierova analiza preživljenja. Značajnost razlika preživljenja pojedinih podskupina testirana je pomoću X-kvadrat log-rank testa, pri čemu je kao granica statističke značajnosti uzeta vrijednost  $p < 0.05$ .

Za statističku analizu korišten je program SPSS proizvođača IBM, licenca 2012., verzija 20.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opće karakteristike pacijenata

U istraživanju su analizirani uzorci 99 pacijenata s malignim pleuralnim mezoteliomom, s medianom dobi od 64 godine, a veliku većinu, preko 90%, činili su pacijenti muškog spola. Tek oko 10% pacijenata imalo je lokaliziranu bolest kod postavljanja dijagnoze, a kirurška resekcija učinjena je kod njih 15%.

Oko 95% pacijenta imalo je dijagnosticiran neki od epiteloidnih podtipova mezotelioma, dok je 6 pacijenata dijagnosticirano sa sarkomatoidnim podtipom. Detalji karakteristika pacijenata nalaze se u Tablici 3.

**Tablica 3.** Kliničke karakteristike pacijenata s malignim pleuralnim mezoteliomom čiji su uzorci korišteni u istraživanju

<b>Ukupan broj pacijenata</b>		99
<b>Dob (median; min-max)</b>		64 (27-82)
<b>Spol</b>	Muški	91 (91.9%)
	Ženski	8 (8.1%)
<b>Stadij bolesti pri postavljanju dijagnoze</b>	II	9 (9.1%)
	III	22(22.2%)
	IV	57 (57.6%)
	Neodređen, neresektabilan	11 (11.1%)
<b>Kirurški resecirani</b>		15 (15.15%)
<b>Histološki podtip</b>	Epiteloidni	93 (93.3%)
	Sarkomatoidni	6(6.7%)
	<b>Podtipovi epiteloidnog MPM</b>	Ukupan broj i udio u ukupnom broju EMPM
	Solidni	36 (38.7%)
	Tubulopapilarni	22 (23.6 %)
	Trabekularni	16 (17.2 %)
	Pleomorfni	12 (12.9 %)
	Mikropapilarni	3 (3.2%)
	Mikrocistični	2 (2.1%)

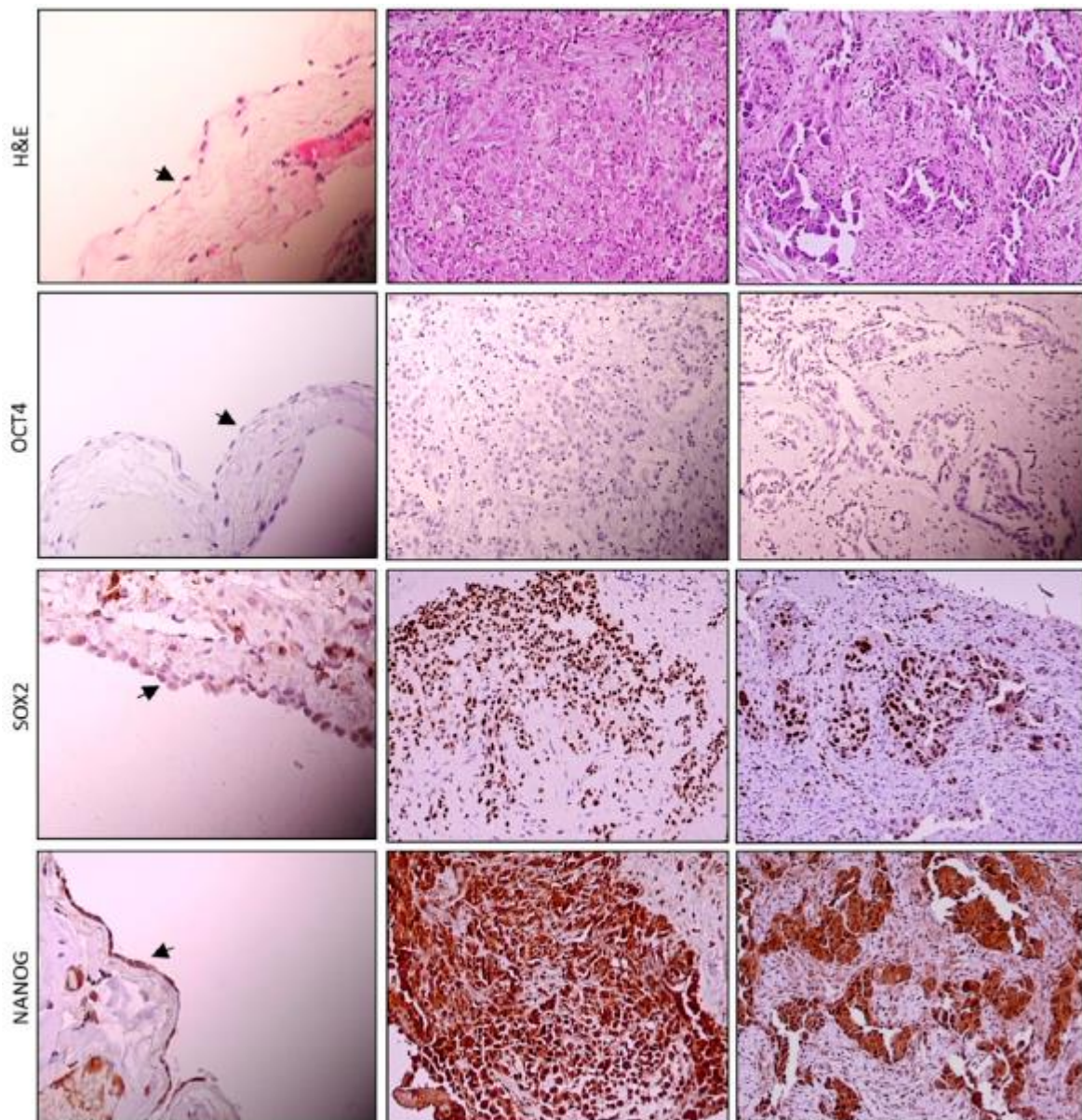
## 5.2. Izraženost OCT4, NANOG i SOX2 u histološkim podtipovima MPM i u zdravoj pleuri

### 5.2.1. OCT4

Imunohistokemijskom se analizom nije detektirala izraženost OCT4 proteina u stanicama mezotelioma, a izraženost nije nađena niti u stanicama zdravog mezotela (slika 3).

Gen *POU5F1* odgovoran za kodiranje OCT4 proteina, bio je izražen i u ljudskom mezotelu kao i u stanicama mezotelioma (Slika 3.), pri čemu je jača izraženost gena detektirana u stanicama mezotela ( $X$ -kvadrat=5.694,  $p < 0.001$ ) (Slika 4.).





**Slika 3.** Imunohistokemijska bojenja tkiva pleure (1. stupac slika), solidnog mezotelioma (2.stupac) i tubulo-papilarnog mezotelioma (3. stupac). U prvom redu prikazani su preparati bojani hemalaun eozinom (H&E), u drugom anti-OCT4 protutijelom, u trećem anti-SOX2 protutijelom te u četvrtom anti-NANOG protutijelom.

### 5.2.2. NANOG

Izraženost NANOG proteina detektirana je u svim analiziranim uzorcima mezotelioma, uz izuzetak jednog, i to i u citosolu i u jezgri tumorskih stanica (Slika 3.).

Između uzoraka varirao je postotak pozitivnih stanica, dok je intenzitet bojenja bio konstantno jak (intenzitet 3) u svim uzorcima..

NANOG protein detektiran je i u stanicama mezotela, gdje je bio značajno manje izražen u odnosu na mezoteliom.

Izraženost NANOG proteina bila je značajno veća u pleomorfnom u odnosu na tubulopapilarni podtip, dok se između solidnog i pleomornog kao niti između tubulopapilarnog i solidnog nije uočila statistički značajna razlika. (Tablica 4.) (Slika 4.)

**Tablica 4.** Rezultati analize razlike u izraženosti NANOG između pojedinih histoloških podtipova DMPM-a

<b>NANOG</b>	<b>Pleomorfni vs Tubulopapilarni</b>	<b>Pleomorfni vs Solidni</b>	<b>Solidni vs Tubulopapilarni</b>
Mann-Whitney U p-vrijednost	52.000, p =0.012	93.5 p =0.123	181.00, p = 0.472

Izraženost NANOG gena bila je značajno jača u stanicama pleure u odnosu na uzorke MPM-a ( $X^2=3.045$ ,  $p = 0.003$ ) (slika 3.), dok između pojedinih histoloških podtipova nije nađena razlika u genskoj izraženosti. ( $X^2 = 1.157$ ,  $p = 0.763$ ) (slika 4.)

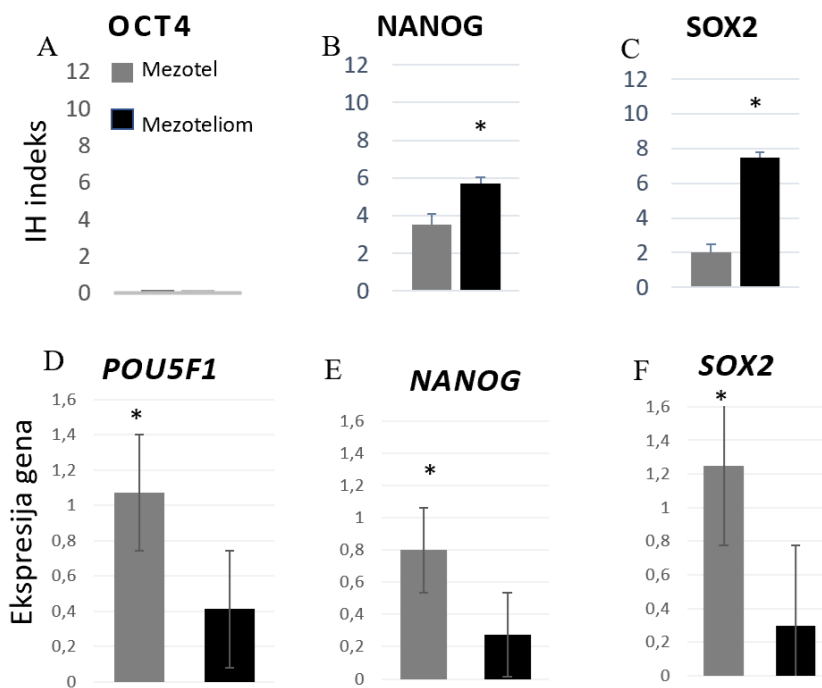
### 5.2.3. SOX2

Izraženost SOX2 proteina bila je dominantno nuklearna, a detektiran je u stanicama zdravog mezotela kao i u mezoteliomu (slika 4), pri čemu je u mezoteliomskim stanicama bio jače eksprimiran ( $X$ -kvadrat = 96.0,  $p < 0.001$ ). Nije nađena statistički značajna razlika u izraženosti SOX2 proteina između 3 najčešća histološka podtipa, kao niti između svih podtipova međusobno. Najveći postotak uzoraka s visokom izraženosti SOX2 nađen je kod solidnih te tubulopapilarnih histoloških varijanti. U tablici 5 je prikazan odnos ekspresije SOX2 između tri najčešća histološka podtipa (slika 5).

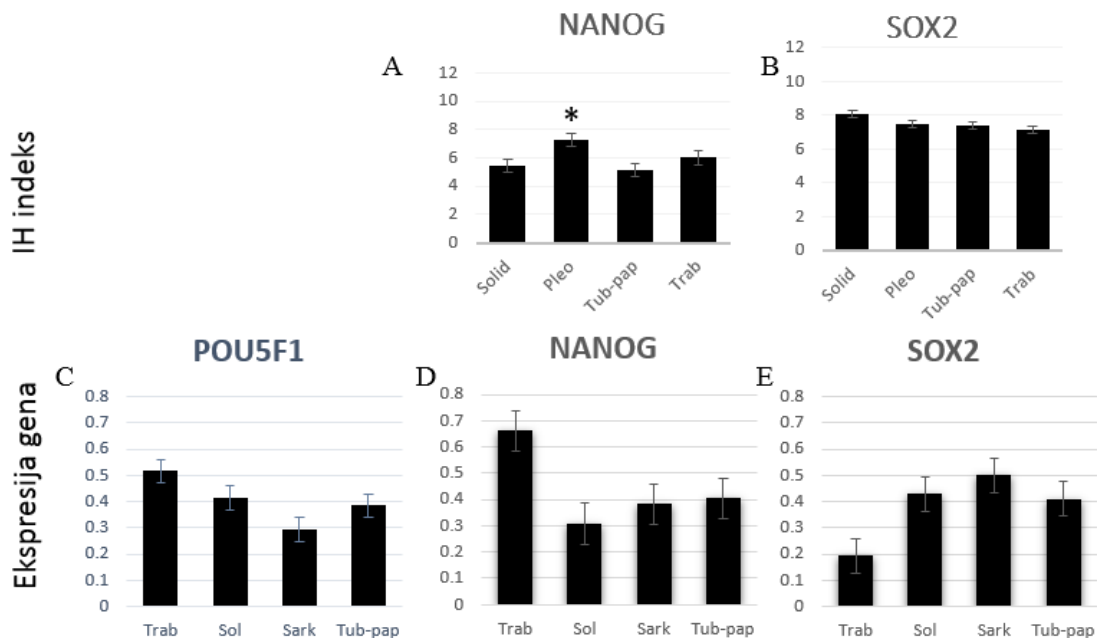
**Tablica 5.** Rezultati analize razlike u izraženosti SOX2 između pojedinih histoloških podtipova DMPM

<b>SOX 2</b>	<b>Pleomorfni vs Tubulopapilarni</b>	<b>Pleomorfni vs Solidni</b>	<b>Solidni vs Tubulopapilarni</b>
Mann-Whitney U p-vrijednost	99.0 p = 0.723	108.0 p = 0.208	184.500 p = 0.46

Izraženost SOX2 gena detektirana je i u mezoteliomskim i u stanicama zdrave pleure, bez značajne razlike ( $X$ -kvadrat = 1.861,  $p=0.101$ ) (Slika 4). Također, nije detektirana razlika u ekspresiji SOX2 gena između pojedinih histoloških podtipova mezotelioma. ( $X$ -kvadrat = 1.868,  $p=0.60$ ) (Slika 5.)



**Slika 4.** Grafički prikaz odnosa izraženosti OCT4 (A), NANOG (B) i SOX2 (C) u mezotelu i mezoteliomu. Usporedba izraženosti gena *POU5F1* (D), *NANOG* (E) i *SOX2* (F) u mezotelu i u mezoteliomu. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ).



**Slika 5.** Grafički prikaz usporedbe izraženosti proteina NANOG (A) i SOX2 (B) te gena *POU5F1* (C) *NANOG* (D) i *SOX2* (E) između pojedinih histoloških varijanti DMPM. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. Izraženost komponenti signalnog puta PI3K, AKT i BCL-2

Uzorci mezotelioma korišteni za testiranje izraženosti OCT4, NANOG i SOX2 također su korišteni za određivanje izraženosti fosforiliranog (aktiviranog) PI3K (Tyr607; p-PI3K), fosforiliranog/aktiviranog AKT (Ser473; p-AKT) te BCL2.

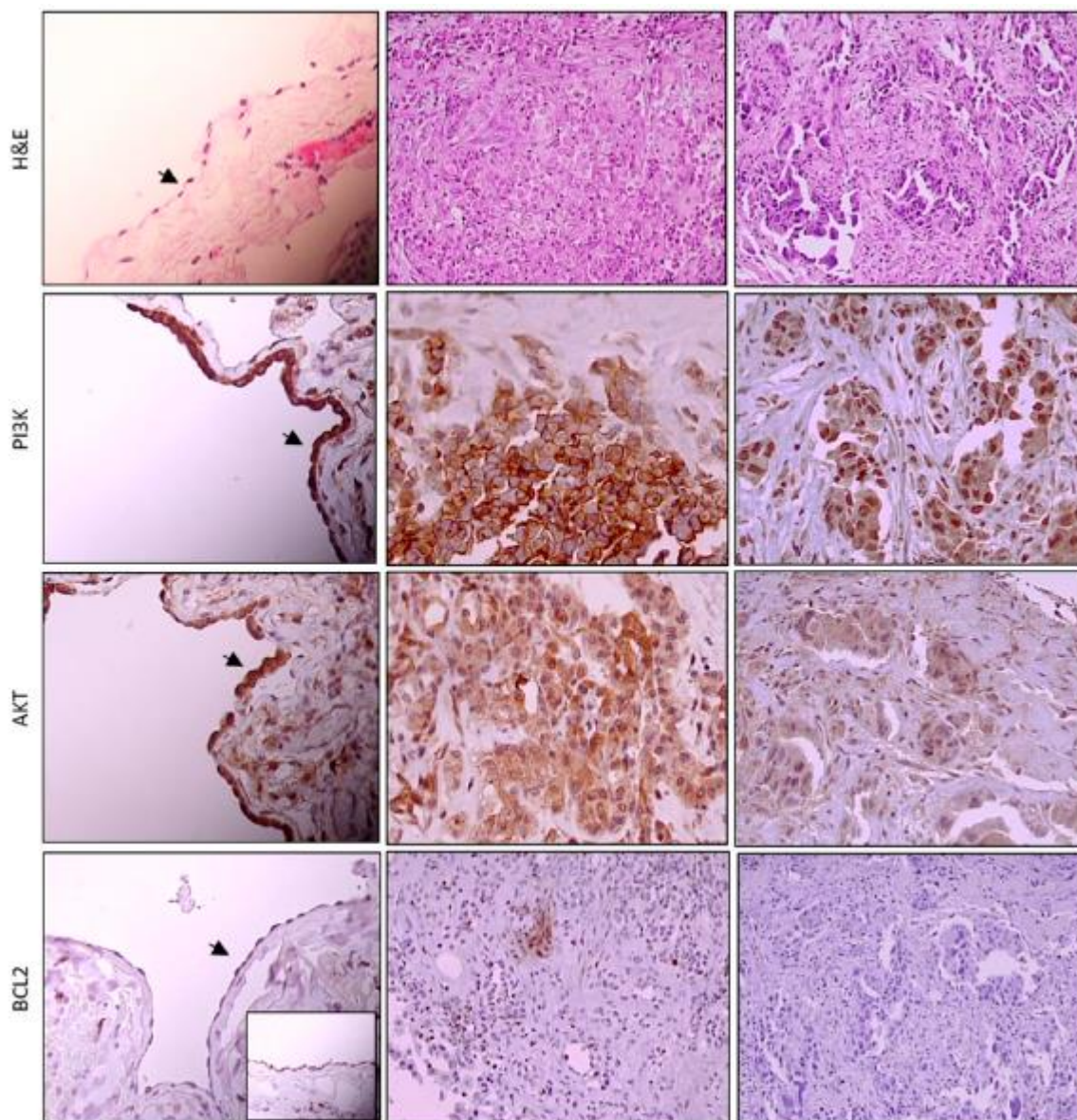
#### 5.3.1. PI3K

Izraženost PI3K proteina detektirana je u mezotelnim kao i u u stanicama MPM, pri čemu nije bilo značajne razlike između PI3K u zdravom i tumorskom tkivu. Jačina izraženosti bila je podjednaka u svim uzorcima DMPM te se nije dokazalo statistički značajne razlike u izraženosti PI3K između pojedinih histoloških podtipova (Tablica 6., Slika 6.).

**Tablica 6.** Rezultati analize razlike u izraženosti PI3K između pojedinih histoloških podtipova DMPM-a

<b>PI3K</b>	<b>Pleomorfni vs Tubulopapilarni</b>	<b>Pleomorfni vs Solidni</b>	<b>Solidni vs Tubulopapilarni</b>
Mann-Whitney U p vrijednost	91.00, p = 0.465	122.0 p = 0.592	181.00 p = 0.472

Analizom PIK3CA te PIK3CD gena nije nađeno razlike između histoloških podtipova MPM (redom, X-kvadrat 2.39, p=0.496; X-kvadrat 2.11, P= 0.55). U usporedbi sa zdravom pleurom, detektirana je slabija izraženost PIK3CA i PIK3CD gena u stanicama DMPM u odnosu na stanice pleure. (X-kvadrat 3.54, odnosno 5.345, p<0.001) (Slike 7. i 8.)



**Slika 6.** Imunohistokemijska bojenja tkiva pleure (1. stupac slika), solidnog mezotelioma (2.stupac) te tubulo-papilarnog mezotelioma (3. stupac). U prvom redu prikazani su preparati bojani hemalaun eozinom (H&E), u drugom anti-PI3 protutijelom, u trećem anti-AKT1 protutijelom te u četvrtom anti-BCL2 protutijelom.

### 5.3.2. AKT

Izraženost AKT proteina prosječno je bila najviša u mikrocističnom, a najniža u pleomorfnom podtipu. No, s obzirom na mali broj uzoraka mikrocističnog podtipa, statistički značajna razlika u izraženosti zabilježena je između uzoraka solidne te tubulopapilarne histologije. Usporedbe izraženosti AKT prikazane su u tablici 7.

**Tablica 7.** Rezultati analize razlike u izraženosti AKT između pojedinih histoloških podtipova. Zvezdicom (\*) je označena statistički značajna razlika

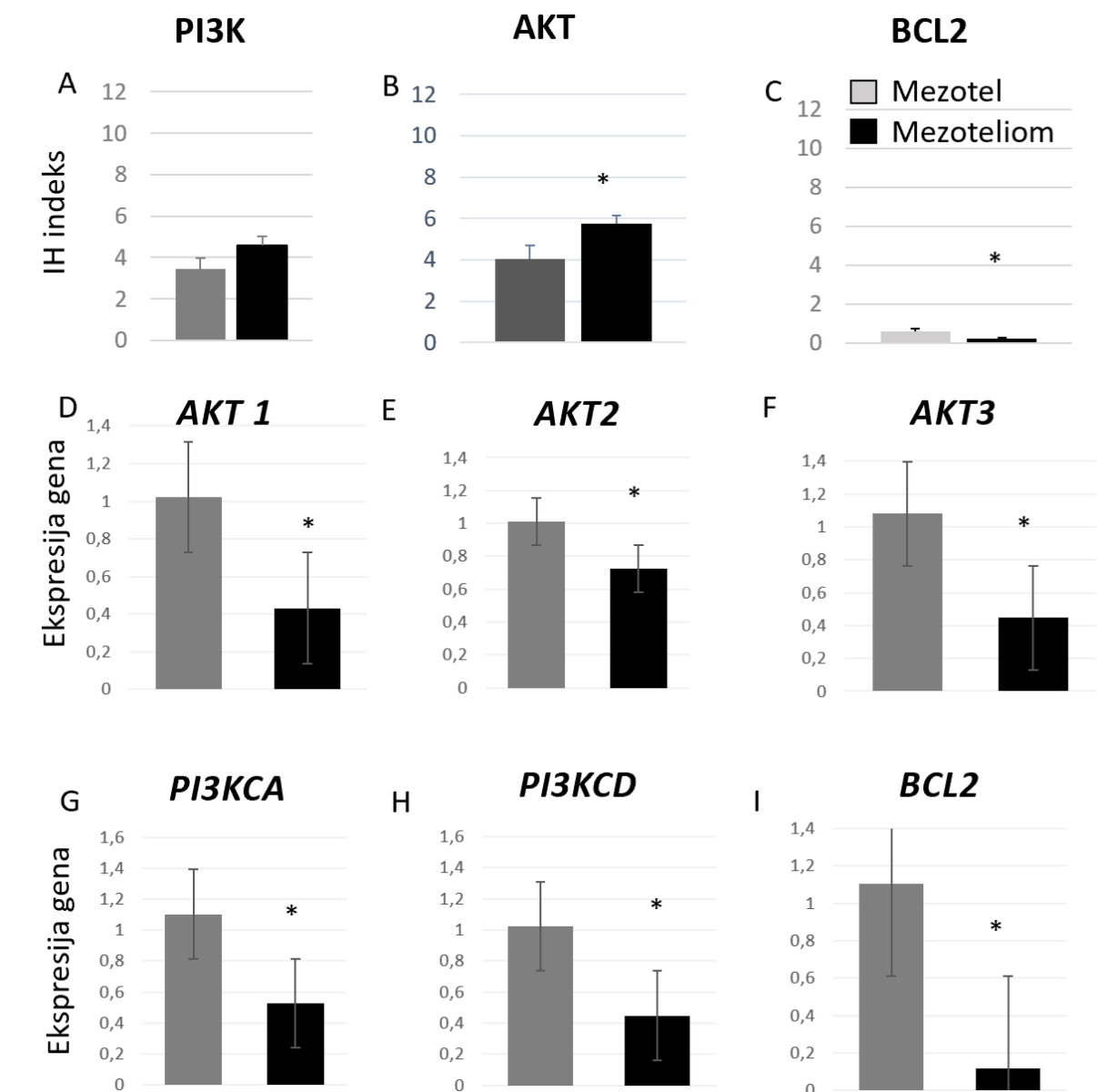
<b>AKT</b>	<b>Pleomorfni vs Tubulopapilarni</b>	<b>Pleomorfni vs Solidni</b>	<b>Solidni vs Tubulopapilarni</b>
Mann-Whitney U p vrijednost	97.500 p = 0.662	93.500 p = 0.123	115.00, p = 0.011*

Sva tri AKT gena (*AKT1*, *AKT2* i *AKT3*) bila su izražena u stanicama mezotelioma, kao i stanicama zdravog mezotela. Izraženost u mezotelu bila je viša u odnosu na mezoteliomske stanice (vrijednosti X-kvadrata redom 9.15, 4.13, 4.72;  $p < 0.001$ ) (Slike 7 i 8).

### BCL2

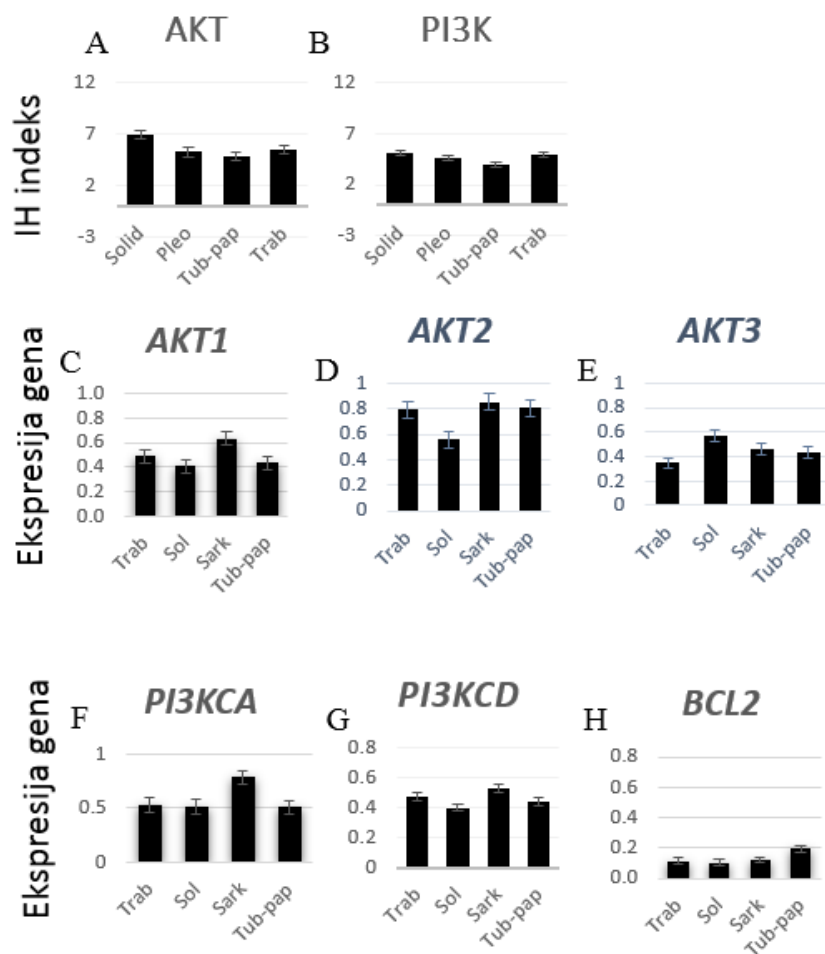
Od svih testiranih uzoraka, tek se u nekoliko pokazao blagi pozitivitet za BCL2, od kojih u većini slabog intenziteta, u malom broju stanica. Možemo zaključiti kako nema ovom metodom detektabilne izraženosti BCL2 proteina u stanicama mezotelioma.

Izraženost BCL2 gena također nije bila značajna u uzorcima mezotelioma, kao i zdravog mezotela (Slike 7. i 8.).



**Slika 7.** Grafički prikaz usporedbe izraženosti proteina PI3K (A), AKT (B) i BCL2 (C) te gena *AKT1* (D), *AKT2* (E), *AKT3* (F), *PI3KCA* (G), *PI3KCD* (H) i *BCL2* (I) između mezotela i mezotelioma. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ).





**Slika 8.** Grafički prikaz usporedbe izraženosti proteina AKT (A) i PI3K (B) te gena *AKT1* (C), *AKT2* (D), *AKT3* (E), *PI3KCA* (F), *PI3KCD* (G) i *BCL2* (H) između pojedinih podtipova mezotelioma. Zvezdica (\*) označava statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ).

## 5.4. Korelacija genskog izražaja

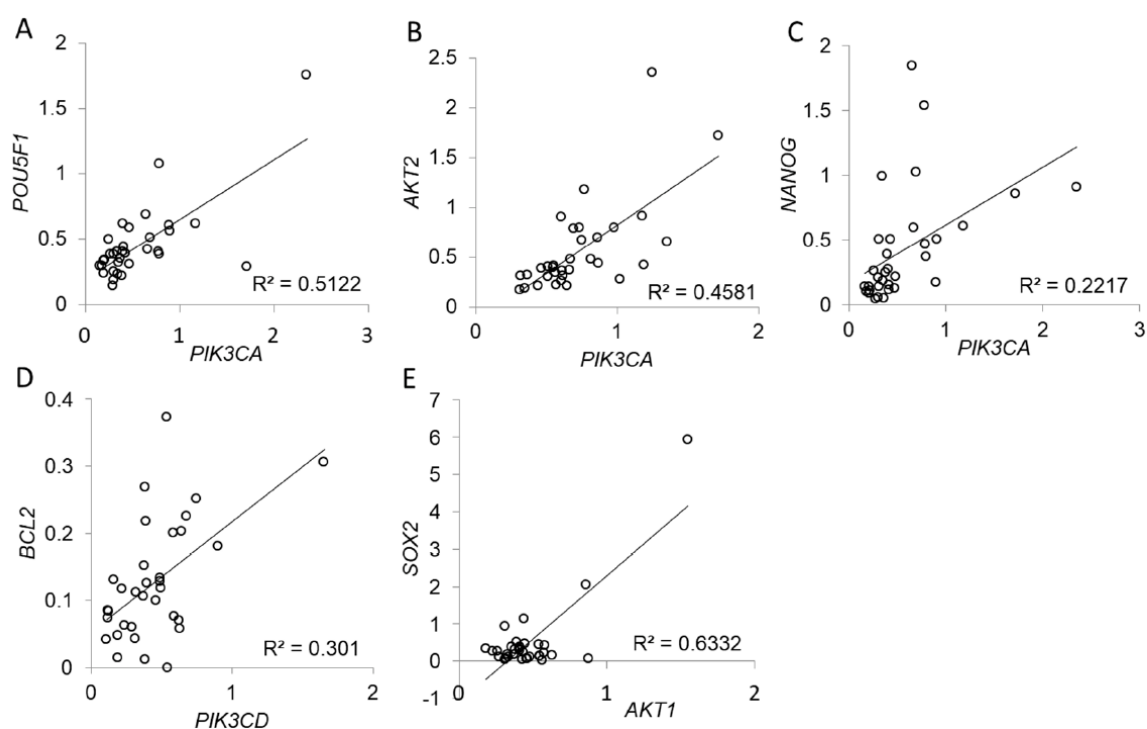
Kako bi se utvrdila povezanost izraženosti pojedinih gena faktora pluripotencije međusobno te između komponenata PI3K/AKT/ BCL2 puta, istražili smo međusobnu korelaciju njihovih izraženosti. Rezultati su prikazani u tablici 8. Za svaki je par napisan Pearsonov koeficijent korelacije (gorni red) te p vrijednost (donji red) Ovisno o p vrijednosti, parovi su označeni bez zvjezdice ( ) ( $p > 0.05$ ), jednom zvjezdicom (\*) ( $0.01 > p > 0.05$ ) ili s dvije zvjezdice (\*\*)  $p < 0.01$ . Granica statističke značajnosti je  $p < 0.05$ .

**Tablica 8.** Prikaz korelacije između izraženosti pojedinih gena. U gornjem redu je naveden Pearsonov koeficijent korelacije, a u donjem p vrijednost. Ovisno o vrijednosti p rezultati su označeni s dvije zvjezdice, jednom zvjezdicom) odnosno bez zvjezdice.

	<b>POU5F1</b>	<b>NANOG</b>	<b>SOX2</b>	<b>PI3KCA</b>	<b>PI3KCD</b>	<b>AKT1</b>	<b>AKT2</b>	<b>AKT3</b>	<b>BCL2</b>
<b>POU5F1</b>	X	0.294 <i>0.092</i>	0.027 <i>0.879</i>	0.711 ** <i>&lt;0.001</i>	0.304 <i>0.080</i>	0.117 <i>0.511</i>	0.454** <i>0.007</i>	0.407* <i>0.017</i>	0.263 <i>0.133</i>
<b>NANOG</b>	0.294 <i>0.092</i>	X	0.149 <i>0.400</i>	0.456** <i>0.007</i>	0.175 <i>0.323</i>	0.121 <i>0.496</i>	0.565** <i>&lt;0.001</i>	0.471** <i>0.005</i>	0.121 <i>0.496</i>
<b>SOX2</b>	0.027 <i>0.879</i>	0.149 <i>0.400</i>	X	0.443** <i>0.009</i>	0.228 <i>0.196</i>	0.796** <i>&lt;0.001</i>	0.581** <i>&lt;0.001</i>	0.496** <i>0.003</i>	0.077 <i>0.666</i>
<b>PI3KCA</b>	0.711** <i>&lt;0.001</i>	0.456** <i>0.007</i>	0.443** <i>0.009</i>	X	0.511** <i>0.002</i>	0.500** <i>0.003</i>	0.676** <i>&lt;0.001</i>	0.508** <i>0.002</i>	0.470** <i>0.005</i>
<b>PI3KCD</b>	0.304 <i>0.080</i>	0.175 <i>0.323</i>	0.228 <i>0.196</i>	0.511** <i>0.002</i>	X	0.479** <i>0.004</i>	0.207 <i>0.240</i>	0.275 <i>0.115</i>	0.547** <i>0.001</i>
<b>AKT1</b>	0.117 <i>0.511</i>	0.121 <i>0.496</i>	0.796** <i>&lt;0.001</i>	0.500** <i>0.003</i>	0.479** <i>0.004</i>	X	0.565** <i>&lt;0.001</i>	0.471** <i>0.005</i>	0.373* <i>0.033</i>
<b>AKT2</b>	0.454** <i>0.007</i>	0.565** <i>&lt;0.001</i>	0.581** <i>&lt;0.001</i>	0.676** <i>&lt;0.001</i>	0.207 <i>0.240</i>	0.565** <i>&lt;0.001</i>	X	0.345* <i>0.046</i>	0.268 <i>0.125</i>
<b>AKT3</b>	0.407* <i>0.017</i>	0.471** <i>0.005</i>	0.496** <i>0.003</i>	0.508** <i>0.002</i>	0.275 <i>0.115</i>	0.471** <i>0.005</i>	0.345* <i>0.046</i>	X	0.024 <i>0.891</i>
<b>BCL2</b>	0.263 <i>0.133</i>	0.121 <i>0.496</i>	0.077 <i>0.666</i>	0.470** <i>0.005</i>	0.547** <i>0.001</i>	0.373* <i>0.033</i>	0.268 <i>0.125</i>	0.024 <i>0.891</i>	X

Kako je iz tablice 8 vidljivo, postoje značajne korelacije izraženosti pojedinih gena. Tako sva 3 AKT gena (*AKT 1*, *AKT 2* i *AKT 3*) te geni *PI3K* (*PI3KCA* i *PI3KCD*) imaju međusobno snažnu korelaciju izraženosti. Vrlo visoka korelacija postoji i između *PI3KCA* te *AKT1*, *2* i *3*, dok izraženost *BCL2* korelira s *PI3KCA*, i *AKT 1*, no ne i drugim komponentama signalnog puta.

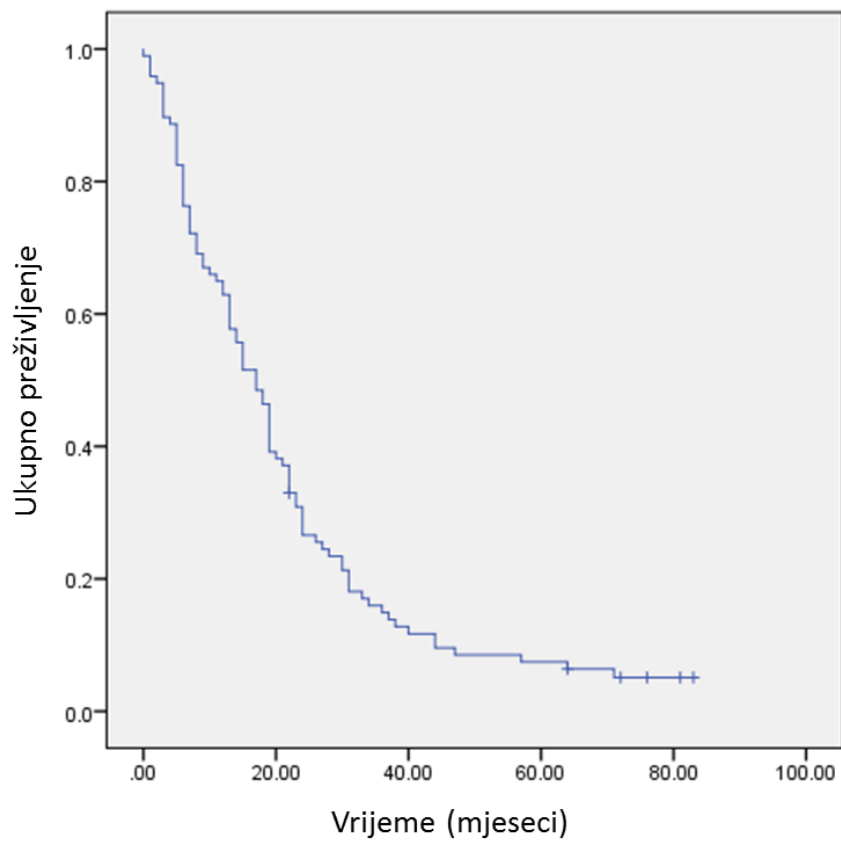
Izraženost gena *NANOG*, *SOX2* i *POU5F1* snažno korelira s *PI3KCA*, dok s *PI3KCD* nije izražena. Također, nije detektirana međusobna povezanost izraženosti gena pluripotencije *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2*. Grafovi najvažnijih rezultata prikazani su na Slici 9.



**Slika 9.** Prikaz najvažnijih rezultata korelacije genske izraženosti na grafovima rasipa (*eng. scatter plot*). Prikazane su korelacije izraženosti *POU5F1* i *PIK3CA* (A), *AKT2* i *PIK3CA* (B), *NANOG* i *PIK3CA* (C), *BCL2* i *PIK3CD* (D) te *SOX2* i *AKT1* (E).

## 5.5. Analiza preživljenja

Median preživljenja svih pacijenata u istraživanju iznosio je 17 mjeseci, s 95% intervalom pouzdanosti između 13.95 i 20.47 mjeseci.(Slika 10.) .



**Slika 10.** Prikaz krivulje ukupnog preživljenja pacijenata u istraživanju

Učinjena je analiza ovisno o spolu pacijenata te dobi kod postavljanja dijagnoze. Median preživljenja varirao je od 15 do 19 mjeseci, pri čemu su najlošije preživljenje imali bolesnici u najmlađoj odnosno najstarijoj dobnoj skupini, no bez statističke značajnosti između pojedinih podskupina (Tablica 9, Slika 11).

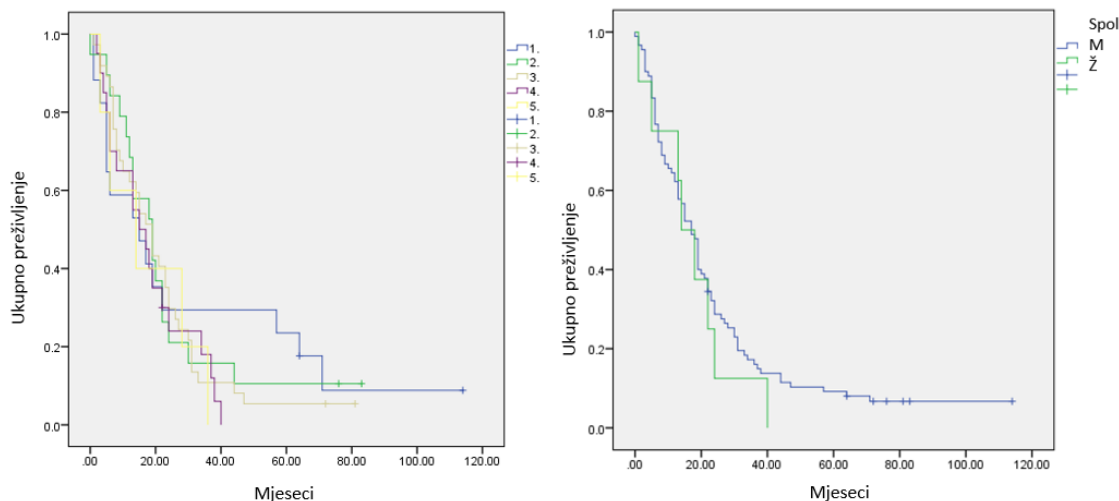
**Tablica 9.** Usporedba preživljenja pacijenata prema dobnim skupinama kod postavljanja dijagnoze

<b>Dob</b>	<b>Skupina</b>	<b>Median preživljenja (mjeseci)</b>	<b>95% interval pouzdanosti</b>
<50g	1	15.0	0.21-29.7
50-60g	2	19.0	10.56-27.43
60-70g	3	19.0	14.07-23.9
70-80g	4	15.0	6.23-23.76
>80g	5	14.0	0.1-20.0

Također, nije nađena statistička značajnost između pojedinih podskupina ovisno o spolu pacijenata (Tablica 10., Slika 11.) .

**Tablica 10.** Usporedba preživljenja pacijenata prema spolu

<b>Spol</b>	<b>Median preživljenja (mjeseci)</b>	<b>95% interval pouzdanosti</b>
Muški	17.0	13.9-20.09
Ženski	14.0	7.07-20.93
Log rank X-kvadrat	0.502, p =0.479	



**Slika 11.** Prikaz krivulja preživljenja prema dobi (graf 1) i spolu (graf 2). (Graf 1 – 1=dobna skupina <50 g, 2 = 50-60 g, 3 = 60-70 g, 4=70-80 g, 5 = 80+g)

Analizirano je preživljenje pacijenata ovisno o histološkom podtipu. Usporedbom sarkomatoidnog i epitelioidnog podtipa DMPM nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju, premda rezultati pokazuju tendenciju lošijeg preživljenja pacijenata sa sarkomatoidnom histologijom.

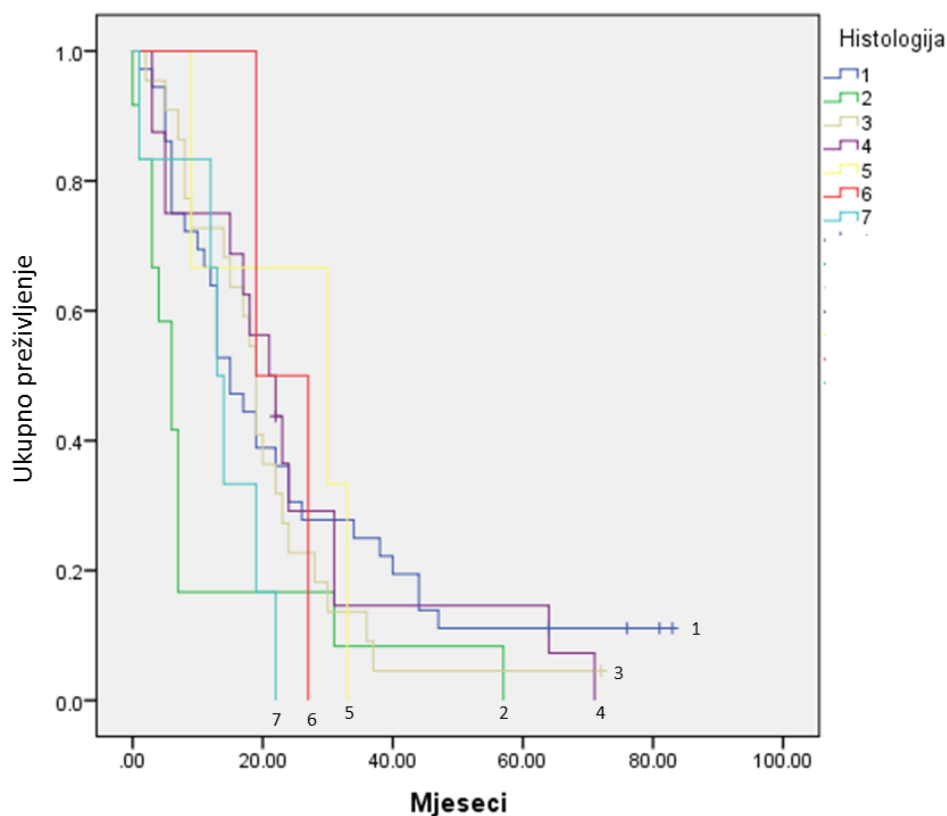
**Tablica 11.** Usporedba preživljenja pacijenata ovisno o histološkom podtipu DMPM

	<b>Median preživljenja (mjeseci)</b>	<b>95% interval pouzdanosti</b>
Epitelioidni	17	13.87-20.13
Sarkomatoidni	13	10.6-15.4
Log rank test	1,96, p=0.161	

Također, učinjena je analiza preživljenja varijanti epitelioidnog DMPM. U tablici 12 je prikazano kako su prosječno najdulje preživljenje imali pacijenti s mikropapilarnim, a najkraće s pleomorfni mezoeliomom, no bez statistički značajne razlike.

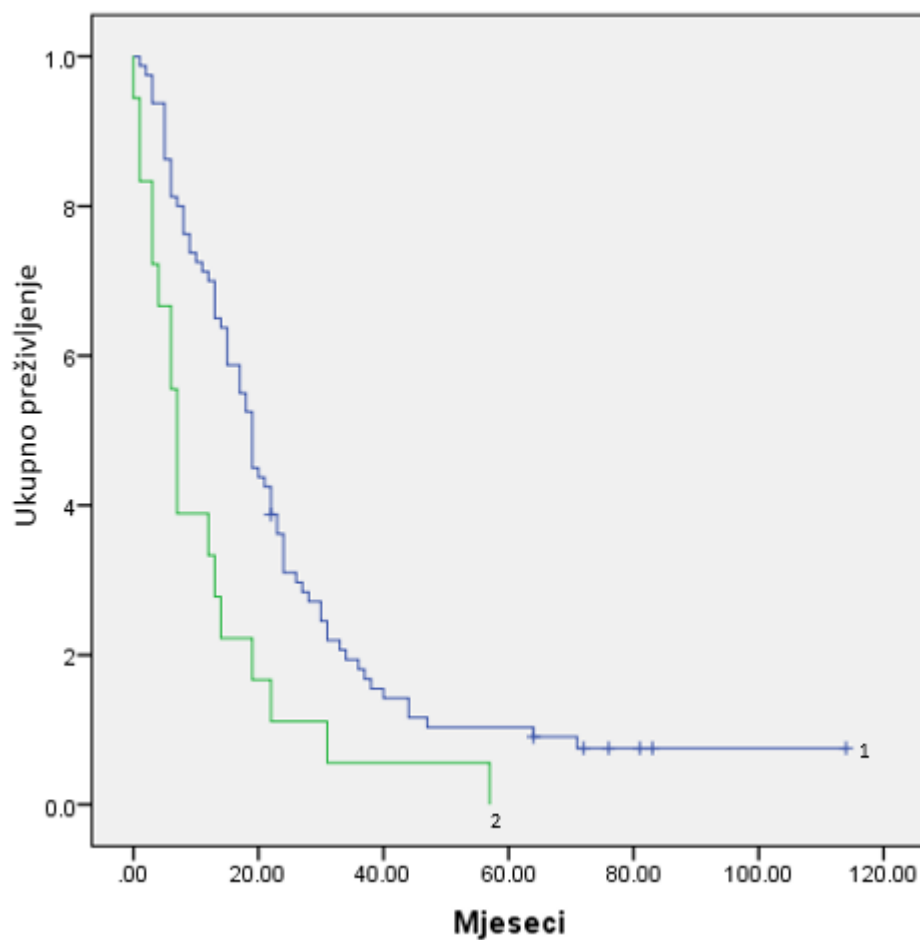
**Tablica 12.** Usporedba preživljenja pacijenata s epiteoloidnim podtipom DMPM ovisno o patohistološkoj varijanti

Patohistološki podtip	Median preživljenja u mjesecima (95% interval pouzdanosti)		
Solidni	15 (10.8-19.1)		
Tubulopapilarni	19 (16.74 – 21.26)		
Trabekularni	21 (13.16– 28.84)		
Pleomorfni	6 (2.65 – 9.34)		
Mikropapilarni	30 (0 – 63.6)	X-kvadrat (Log- rank)	p - vrijednost
Mikrocistični	19 (N/A)	9.61	0.142



**Slika 12** Prikaz krivulja preživljenja pacijenata ovisno o histološkom podtipu malignog pleuralnog mezotelioma. (1- solidni, 2 -pleomorfni, 3- tubulopapilarni, 4 – trabekularni, 5- sarkomatoidni, 6 – mikropapilarni, 7 – mikrocistični). Nije nađena statistički značajna razlika između pojedinih skupina.

Uspoređeno je preživljenje pacijenata sa sarkomatoidnim podtipom i najslabije diferenciranom, pleomorfnom varijatnom epiteloidnog DMPM s jedne te ostalih varijanti s druge strane. Rezultati pokazuju značajno kraće preživljenje pacijenata sa sarkomatoidnom/pleomorfnom histologijom (19 naprema 7 mjeseci, 95% IP 16.8 -211 naprama 5.6-8.3;  $p=0.002$  (Slika 13.).



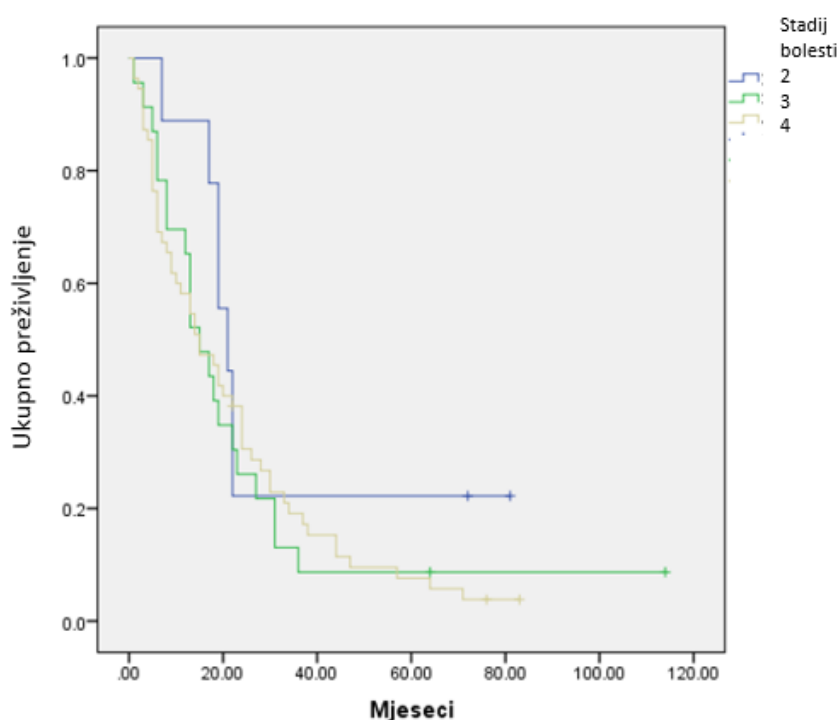
**Slika 13.** Prikaz krivulja preživljenja pacijenata sa sarkomatoidnom i pleomorfnom histologijom (krivulja 2) i pacijenata s ostalim varijantama epiteloidnog DMPM (krivulja 1).



Pacijenti su podijeljeni u podskupine ovisno o stadiju bolesti kod postavljanja dijagnoze (Tablica 13). Pacijenti u 2. stadiju bolesti imali su najdulje preživljenje, prosječno 21 mjesec, dok je preživljenje kod pacijenata s 3. i 4. stadijem bolesti bilo podjednako. Nije bilo statistički značajne razlike između podskupina (Tablica 13, Slika 14).

**Tablica 13.** Usporedba preživljenja pacijenata ovisno o stadiju bolesti kod postavljanja dijagnoze

Stadij bolesti	Broj pacijenata (postotak)				
2.	9 (10.31%)				
3.	23 (26.44%)				
4.	55 (63.21%)				
Stadij bolesti	Median preživljenja (mjeseci)	95% interval pouzdanosti			
II	21	5.16 -26.84			
III	15	10.30 -19.70		X kvadrat	p vrijednost
IV	15	8.54 – 21.45	Log rank	1.604	0.448

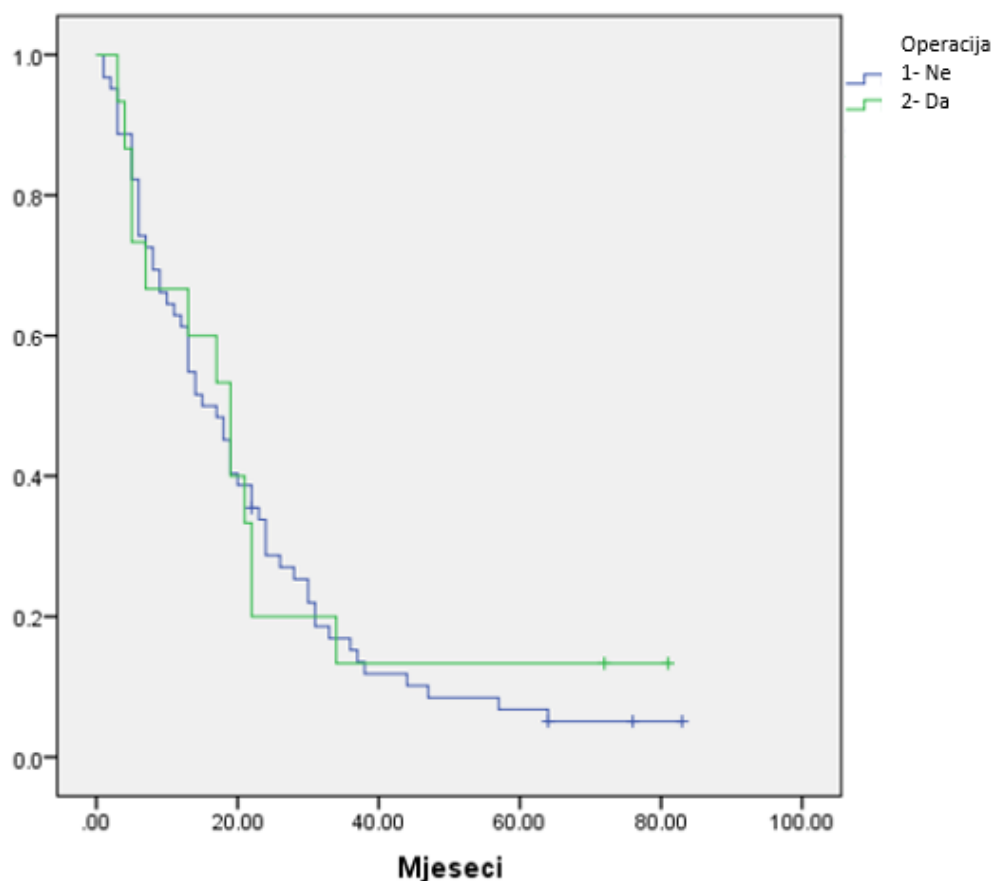


**Slika 14.** Prikaz krivulja preživljenja pacijenata ovisno o stadiju bolesti kod postavljanja dijagnoze

Pacijenti su podijeljeni na one kod kojih je učinjen kirurški zahvat s kurativnom intencijom, u odnosu na one koji, zbog stadija bolesti ili općeg stanja, nisu bili kandidati za kiruršku reskekciju. (Tablica 14) Nije nađeno razlike u preživljenju pacijenata između skupina (Slika 15).

**Tablica 14.** Usporedba preživljenja pacijenata ovisno o provedenom kirurškom liječenju

Kirurška reskekcija	Median preživljenja (mjeseci)	95% interval pouzdanosti		X kvadrat	p vrijednost
Učinjena	19	11.56 -26.43			
Nije učinjena	15	10.84 -19.15	Log rank	0.81	0.775



**Slika 15.** Prikaz krivulja preživljenja pacijenata ovisno o provedenom kirurškom liječenju. 0 - nije provedeno kirurško liječenje, 1- provedeno je kirurško liječenje

Uzorci kod kojih je imunohistokemijski analizirana izraženost proteina podijeljeni su u 3 skupine, ovisno o imunohistokemijskom indeksu (IHi) koji je određen množenjem postotka pozitivno obojenih stanica (0 = nema pozitivnih stanica; 1 = manje od 10%; 2 = 10–50% i 3 = više od 50% pozitivnih stanica), s intenzitetom bojenja (0 = nema bojenja; 1 = slabo; 2 = umjereno i 3 = jako bojenje). Tako dobiveni umnožak raspoređen je u tri podskupine radi određivanja stupnja izraženosti; pri tome su uzorci s IHi 1-3 klasificirani kao oni niske izraženosti, s IHi 4-6 srednje, a 7-9 visoke izraženosti.

Iz rezultata je vidljivo kako ne postoji razlika u preživljenju između pacijenata u čijim je uzorcima tumorskog tkiva detektirana visoka odnosno onih u kojima je detektirana niska ili srednja izraženost analiziranih proteina. S obzirom na slabu izraženost BCL2 te odsutnost izraženosti OCT4 u analiziranim uzorcima, nije rađena analiza preživljenja temeljena na njihovoj izraženosti (Tablica 15.).

**Tablica 15.** Usporedba preživljenja pacijenata ovisno o izraženosti ispitivanih proteina NANOG, SOX2, PI3K i AKT

		Median preživljenja u mjesecima (95% interval pouzdanosti)	X-kvadrat	p - vrijednost
<b>NANOG</b>	Niska izraženost	13 (2.04 – 23.95)		
	Srednja izraženost	9 (1.52 – 16.4)	1.697	0.638
	Visoka izraženost	11 (2.72- 19.27)		
<b>SOX2</b>	Niska izraženost	/		
	Srednja izraženost	7 (4.5-9.4)	2.998	0.392
	Visoka izraženost	15 (8.5 – 21,4)		
<b>PI3K</b>	Niska izraženost	15 (1.09- 29.9)		
	Srednja izraženost	15 (10.61 - 19.38)	3.79	0.75
	Visoka izraženost	7 (4.07 – 9.92)		
<b>AKT</b>	Niska izraženost	8 (2.95 – 13.04)		
	Srednja izraženost	17 (2.04 – 31.9)	7.502	0.277
	Visoka izraženost	9 (3.51 – 14.48)		

## 6. Rasprava

Maligni pleuralni mezoteliom je zloćudni tumor mezotelijalnog porijekla kojeg karakterizira loša prognoza i ograničene mogućnosti liječenja. Radi se o rijetkoj bolesti, s prosječnom incidencijom od oko 20 slučajeva na 1 000 000 stanovnika, čija pojavnost je dominantno povezana s izloženosti azbestu, a klinički manifestna bolest javlja se s latencijom od nekoliko desetljeća (5-8). Prognoza bolesnika s mezoteliomom je loša usprkos pomacima u dijagnostičkim metodama i terapijskim opcijama te se median preživljenja, ovisno o radu iz literature, kreće oko 12-15 mjeseci, s petogodišnjim preživljenjem ispod 10% (50,52).

Klinička slika malignog pleuralnog mezotelioma je nespecifična, a od simptoma se najčešće javljaju umor, otežano disanje i pleuritična bol (35). Prognozu kod pacijenata određuju stadij bolesti te histološki podtip, pri čemu pacijenti s epiteloidnim tipom malignog pleuralnog mezotelioma imaju povoljniju prognozu u odnosu na pacijente sa sarkomatoidnim tipom (22).

Liječenje pacijenata s mezoteliomom ovisi o stadiju bolesti i histološkom podtipu. Kirurško liječenje najčešće uključuje operativni zahvat ekstrapleuralne pneumektomije ili pleurektomije/dekortikacije pleure, koji se mogu primijeniti kod manjeg broja pacijenata s ograničenim stadijem bolesti i boljim općim stanjem organizma. Nema jasnih pokazatelja iz randomiziranih studija koji bi pokazivali jasan benefit u preživljenju pacijenata nakon kirurškog liječenja u usporedbi s drugim metodama, a često su praćeni ozbiljnim morbiditetom i mogućim smrtnim ishodom (35-38). Optimalan pristup liječenju nakon operativnog zahvata uključuje dodatak radioterapije i kemoterapije, koji kompletiraju trimodalno liječenje. Objektivne poteškoće takvog pristupa su relativno visoka toksičnost za pacijenta te tehnička zahtjevnost koordinacije i provedbe svih modaliteta liječenja (28,44). Kod pacijenata s proširenom bolesti standard liječenja je kemoterapija bazirana na platini, s ili bez dodatka VEGF inhibitora (45,46). Dualna imunoterapija ipilimumabom i

nivolumabom u registracijskoj je studiji pokazala bolji učinak u usporedbi sa standardnom kemoterapijom te će se vjerojatno iskristalizirati kao prva terapijska opcija, uz sada još uvijek ograničenu dostupnost (47). S obzirom na ograničene terapijske opcije, istraživanje onkogenih mehanizama radi razumijevanja procesa nastanka i rasta stanica mezotelioma te otkrivanje novih potencijalnih ciljnih proteina za liječenje ostaje imperativ.

OCT4, NANOG i SOX2 su transkripcijski faktori čija je glavna funkcija regulacija procesa tokom embrionalnog razvoja te održavanje svojstava matičnosti stanica (58,81). Karakterizira ih sposobnost unakrsne aktivacije i inhibicije djelovanja, kao i sposobnost samostalne promocije vlastitih gena (67,103). Aktivacija tih mehanizama tokom onkogeneze jedan je od načina kojim stanice raka održavaju svoju invazivnost i sposobnost umnožavanja (56,85).

Uloga OCT4, NANOG i SOX2 nije dovoljno proučena u mezoteliomu niti zdravom mezotelu, a rijetki objavljeni radovi istraživali su njihovu izraženost prvenstveno u in vitro istraživanjima na staničnim linijama. To uključuje izraženost OCT4 proteina u eksperimentalnim modelima (66), izraženost gena *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2* u staničnim linijama (155,156) te u matičnim stanicama raka (157). Druge su pak studije pokazale kako u staničnim linijama mezotelioma nema izraženosti *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2* (158). U našim rezultatima pokazali smo da je *POU5F1* izražen, za razliku od OCT4 čija ekspresija nije bila detektirana.

Tako je u ovom istraživanju po prvi puta na uzorcima ljudskog mezotela i mezotelioma pokazano da stanice malignog pleuralnog mezotelioma izražavaju NANOG i SOX2 proteine te gene *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2*. OCT4 protein nije bio detektiran niti u zdravom mezotelu niti u stanicama mezotelioma.

Izostanak izraženosti OCT 4 uz dokazanu transkripciju *POU5F1* sugerira na postojanje posttranskripcijske blokade sinteze proteina. Diskrepanca genske i proteinske izraženosti,

iako se ne radi o rijetkom fenomenu, još uvijek ostaje nedovoljno istražena (158). Najnovija ispitivanja na stanicama imunološkog sustava, koristeći napredne tehnike sekvencioniraja mRNA pojedinih stanica, nisu dala jasne odgovore (159), što sugerira da bi za istraživanja tih mehanizama na stanicama solidnih tumora, čija je dostupnost značajno manja u odnosu na imunološke, trebalo uložiti dodatne napore.

U usporedbi s normalnim mezotelom, mezoteliom je pokazao veću izraženost NANOG proteina, što se podudara s dosadašnjim spoznajama o nižoj izraženosti NANOG-a u zdravim tkivima i prekanceroznim lezijama u odnosu na stanice karcinoma u slučajevima glioblastoma, karcinoma bubrega, urotelnog karcinoma te karcinoma pluća (88,89,92). Ovo sugerira da bi veća izraženost čimbenika pluripotencije mogla biti povezana sa slabijm diferencijacijom mezotelioma, što upućuje i na agresivnije ponašanje. I SOX2 je bio pojačano eksprimiran u mezotelijskim stanicama u odnosu na kontrole mezotela u našoj studiji, prateći tako ranije detektirane trendove u karcinomima gušterače i prostate (121,122).

Istovremeno, *NANOG* i *SOX2* geni bili su slabije eksprimirani u mezotelijskim u odnosu na stanice mezotela, a jača izraženost *POU5F1* je također zabilježena u stanicama zdravog mezotela u odnosu na mezotelijske stanice.

Slabo diferencirani histološki podtipovi mezotelioma, prvenstveno pleomorfni podtip, imali su veću izraženost NANOG-a od podtipova s većim stupnjem diferencijacije kao što je tubulopapilarni. Ovo ponovno upućuje da bi veća izraženost NANOG-a mogla poticati slabiju diferencijaciju mezotelioma, a time i agresivnije ponašanje koje dovodi do slabijeg preživljenja pacijenata s pleomorfnim u usporedbi s tubulo-papilarnim podtipom. Izraženost SOX2 nije pokazala razliku između pojedinih podtipova mezotelioma, dok OCT4 nije uopće detektiran.

Dok je mezoteliom imao suprimiranu izraženost testiranih gena *PI3K*, *AKT* i *BCL2*, *PI3K* protein je bio nepromijenjen, *AKT* pojačano izražen, a *BCL2* protein smanjene izraženost u mezoteliomu u odnosu na mezotel.

Najviša izraženost *AKT* zabilježena je u mikrocističnom i tubulopapilarnom podtipu, pri čemu je zabilježena značajna razlika u izraženosti *AKT* između tubulopapilarnog i solidnog podtipa. Kako se radi o dva dobro diferencirana podtipa (21), moguće je da razlike u izraženosti *AKT*-a proizlaze iz drugih mehanizama, a da nisu odraz stupnja diferencijacije mezotelioma. Intenzitet izraženosti *PI3K* i *BCL2* gena i njihovih proteina nije se razlikovao među pojedinim histološkim podtipovima.

Utvrđena je značajna korelacija izraženosti gena puta *PI3K-AKT* s izraženosti gena *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2*, kao i korelacija izraženosti gena *PI3K* i *BCL2*. Ovi rezultati sugeriraju moguću povezanost u regulaciji *PI3K/AKT* signalnog puta i izraženosti čimbenika pluripotencije, interakcije koju su u svojem istraživanju pokazali Yoon i sur. (160), a o kojoj se raspravlja niže u tekstu.

Iako je izraženost *NANOG* i *SOX2* gena smanjena u mezoteliomu u usporedbi s mezotelom, izraženost njihovih proteina je pojačana u mezoteliomskim stanicama. Takvi kontradiktorni rezultati između gena i proteina vjerojatno odražavaju posttranskripcijsku i translacijsku regulaciju te kontrolu razgradnje proteina (161).

Budući da je izraženost proteina izravnije povezana sa staničnim fenotipom u odnosu na izraženost gena, naši rezultati, koji pokazuju da mezoteliom ima pojačanu izraženost faktora pluripotencije *NANOG* i *SOX2* u usporedbi s mezotelom, tkivom njegovog porijekla, ukazuju na dediferencijaciju mezotelioma u odnosu na stanice zdravog mezotela. Štoviše, slabo diferencirana varijanta epiteloidnog podtipa, pleomorfni mezoteliom, pokazao je veću izraženost *NANOG* od bolje diferencirane tubulopapilarne histologije te u odnosu na sve



ostale histološke podtipove. Ovo dodatno pokazuje da povećana izraženost NANOG korelira sa slabom diferencijacijom mezotelioma. Dosadašnja istraživanja pokazala su da visoke izraženosti faktora pluripotencije koreliraju sa slabijim stupnjem diferencijacije različitih vrsta raka te lošijim kliničkim ishodom(162).

Signalni put PI3K/AKT jedna je od najbolje istraženih signalnih puteva u solidnim i u hematološkim tumorima (132–134). Bitan je za ulazak stanice u stanični ciklus i izbjegavanje kontrolnih mehanizama kinaza ovisnih o ciklinima te regulaciju metabolizma glukoze u tumorskim stanicama (130).

Put PI3K-AKT je disreguliran u ljudskom mezoteliomu (163) i potiče proliferaciju mezoteliomskih stanica (164). U našem smo istraživanju pokazali da se geni PI3K i AKT te njihovi proteini ekspimiraju i u mezotelu i u mezoteliomu. Iako su geni PI3K i AKT suprimirani u mezoteliomu, protein AKT je pojačano ekspimiran, što sugerira njegovu povećanu aktivnost koja pridonosi malignom fenotipu mezotelioma. Većina studija pokazuje da put PI3K-AKT aktivira OCT4 (165), NANOG (166) i SOX2 (166), no postoji mogućnost i da OCT4 i NANOG djeluju uzvodno u kaskadi u odnosu na put PI3K-AKT (167). Također, jedna je studija pokazala da se nakon fosforilacije OCT4 pomoću AKT, OCT4 odvojio od AKT1 promotora, stimulirajući njegovu izraženost (55). Ovdje smo prvi puta pokazali da je u ljudskom mezoteliomu izraženost gena *PI3K* i *AKT* u značajnoj pozitivnoj korelaciji s izraženosti *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2*, sugerirajući pozitivnu regulaciju na razini izraženosti gena. Naši rezultati pokazuju da je povećana aktivnost puta PI3K-AKT vjerojatno povezana s pozitivnom regulacijom, odnosno aktivacijom *NANOG* i *SOX2* u mezoteliomu. Kako u eksperimentalom modelu, u kojem je in vitro inhibirana aktivnost puta PI3K/AKT, nije zabilježeno posljedično smanjenje izraženosti SOX2 i NANOG proteina (168), to upućuje na zaključak da put PI3K/AKT ne regulira gene pluripotencije u mezoteliomu te da faktori pluripotencije djeluju uzvodno od njega.

Izraženost *BCL2* bila je u korelaciji s *PI3KCA* i *PI3KCD*, što ukazuje na povezanost između izraženosti ovih gena. Međutim, *BCL2* gen te *BCL2* protein bili su smanjeno eksprimirani u mezoteliomu. Iako bi bilo logično zaključiti da bi, zbog svoje anti-apoptotičke aktivnosti, niska izraženost *BCL2* bila povezana sa smanjenim potencijalom onkogeneze, studije pokazuju različite rezultate. Neki povezuju visoku izraženost *BCL2* s lošim preživljenjem u određenim vrstama karcinoma (169), dok drugi ukazuju na dobru prognozu bolesnika s visokom izraženosti *BCL2*, kao što je pokazano u studiji s peritonealnim mezoteliomom (170). Smanjena regulacija *BCL2* u mezoteliomu bi mogla potaknuti onkogenezu, ali, budući da je *BCL2* u našoj studiji slabo izražen i u normalnom mezotelu i u stanicama mezotelioma, vjerojatnije je da njegova izraženost ne igra značajnu ulogu u mezoteliomu.

Čimbenici koji utječu na preživljenje pacijenata oboljelih od malignih bolesti su kompleksni te čine skup zavisnih i nezavisnih varijabli koje se u istraživanjima pokušava matematički opisati. Obuhvaćaju karakteristike samog tumora kao što su njegova genetika, pre- i posttranslacijski faktori, izraženost proteina te histološka slika; potom proširenost bolesti te kliničke karakteristike pacijenata, kao što su dob, komorbiditeti, metode liječenja i druge.

Konačno, glavni pokazatelj težine bolesti te median preživljenja svih pacijenata u istraživanju, od trenutka postavljanja dijagnoze, iznosio je 17 mjeseci, što je podatak koji se podudara s podacima objavljenima u drugim studijama (171,172).

Analizirajući preživljenje po spolu, nije se našlo statistički značajne razlike između muških i ženskih pacijenata. Iako literaturni podatci sugeriraju bolju prognozu bolesti kod ženskih pacijenata (16), median preživljenja pacijentica u našem istraživanju bio je nešto niži nego kod muških pacijenata (14 prema 17 mjeseci,  $p=0.479$ ). Jedan od ograničavajućih faktora u ovoj analizi je sigurno diskrepanca između udjela od 8% ženskih pacijenata u našem

istraživanju, u usporedbi s epidemiološkim podacima prema kojima oko 20 -30% oboljelih od mezotelioma čine žene (16,17).

Analizom se nije utvrdila razlika u preživljenju između dobnih skupina, premda bi bilo za očekivati da preživljenje pacijenata pada s višom životnom dobi u trenutku postavljanja dijagnoze. (173). Razlozi za ovakve rezultate vjerojatno leže u činjenici da je u istraživanju bio relativno velik postotak pacijenata mlađih od 50 godina s očito agresivnim tijekom bolesti, čije je prosječno preživljenje iznosilo 13 mjeseci. No i kod pacijenata starijih od 80 godina prati se dobro preživljenje od 18 mjeseci, pa bi za detaljnije razjašnjenje ovih podataka bilo zanimljivo učiniti podanalize, koje retrospektivna priroda istraživanja onemogućava.

U našim rezultatima, najkraći mediani preživljenja zabilježeni su kod pacijenata sa sarkomatoidnom te pleomorfnom histologijom, a najbolji kod dobro diferenciranih varijanti epitelnog podtipa poput trabekularnog i mikropapilarnog. Ipak, statistički nije bilo razlike u preživljenju pacijenata sa sarkomatoidnim podtipom u odnosu ne one s epiteloidnim, kao niti između pojedinih varijanti epiteloidnog podtipa. Imajući u vidu literaturne podatke koji sugeriraju lošu prognozu pacijenata sa pleomorfnom histologijom, bližu onoj pacijenata sa sarkomatoidnim podtipom (21,24), analizirali smo razliku u preživljenju navedenih bolesnika u usporedbi s drugim, iskustveno povoljnijim podtipovima. Rezultati su pokazali značajno lošije preživljenje pacijenata sa sarkomatoidnim i pleomorfnim podtipom, što podupire tezu kako pleomorfnu epiteloidnu mezoteliomu u kliničko - prognostičko – terapijskom kontekstu ima smisla staviti u istu grupu sa sarkomatoidnim.

Uz histološku sliku, glavni čimbenik koji određuje prognozu bolesnika s mezoteliomom je stadij bolesti (38). U našem je istraživanju većina bolesnika dijagnosticirana u 4. stadiju bolesti, dok je tek oko 10% pacijenata otkriveno u 2. stadiju. Premda je prosječni median

preživljenja bio dulji kod bolesnika s 2. stadijem bolesti, ta razlika, s obzirom na širok interval pouzdanosti, nije bila značajna. Objektivni razlozi za takve rezultate leže, između ostalog, i u tehničkoj zahtjevnosti preciznog određivanja stadija mezotelioma pleure, gdje je razlika između 3. i 4. stadija bolesti invazija mišićne stijenke, što je klasičnim CT pregledom ponekad teže razlučivo, a preciznije dijagnostičke metode poput MR i PET CT su teže dostupne (174).

Kirurška resekcija je jedina potencijalno kurativna metoda liječenja malignog pleuralnog mezotelioma te se preporuča u smjernicama za liječenje ograničene bolesti (39). Razlikuju se dva glavna pristupa – poštenija varijanta pleurektomije/dekortikacije (P/D), pri čemu se resekcira zahvaćena pleura te radikalnija, ekstrapleuralna pneumektomija (EPP), tijekom koje se kirurški odstranjuje pluće sa zahvaćenom pleurom, a ponekad i dijafragma odnosno perikard. Usprkos agresivnosti navedenih zahvata, pogotovo EPP, ostaje kontroverzan njihov efekt na preživljenje pacijenata. Podatci randomiziranih studija nisu dostupni, no pojedini kohortni rezultati sugeriraju nedovoljnu radikalnost E/P, značajniji perioperativni rizik EPP te ukupno odsutnost dokaza benefita torakokirurškog liječenja u pogledu produljenja ukupnog preživljenja (42,171). Naši rezultati podudaraju se s tim podacima, budući da nije zabilježena razlika u preživljenju između pacijenata koji su kirurški liječeni, u odnosu na one kod kojih nije bio indiciran kirurški zahvat.

U mnogim kliničkim i pretkliničkim studijama uspoređivana su preživljenja pacijenata ovisno o izraženosti gena pluripotencije NANOG, OCT4 i SOX 2 te njihovih proteina u uzorcima tumora. Tako je pojačani izražaj NANOG-a povezan s lošijm preživljenjem pacijenata s nesitnostaničnim karcinomom pluća, karcinomom želuca (94) i gušterače, dok kod kolorektalnog karcinoma nije utvđena povezanost izraženosti NANOG s preživljenjem, usprkos detektiranim visokim stopama izraženosti proteina u uzorcima tumora (90,94,96,97).

Prema literaturi, preživljenje pacijenata s kolorektalnim karcinomom visoke izraženosti OCT4 bilo je značajno kraće od onih s OCT 4 negativnim tumorima (77), a jača izraženost OCT4 pokazala se i kao negativan prediktivni čimbenik preživljenja kod trostruko negativnog karcinoma dojke (115). Podatci za karcinom gušterače su konfliktni budući da neke studije sugeriraju bolji, a neke lošiji ishod kod karcinoma s visokom izraženosti OCT4 (78), pri čemu je bitno naglasiti da se radi o podacima iz pretkliničkih studija. Usprkos in vitro pokazateljima utjecaja OCT4 na rezistenciju na kemoterapeutike, nije dokazana povezanost izraženosti OCT4 s preživljenjem u drugim tumorskim sijelima kao što su hepatocelularni karcinom, melanom i karcinom pluća (69,70,72). Visoka izraženost SOX 2 u karcinomu jajnika pozitivno je korelirala s lošijom ukupnom prognozom (113), kao i u karcinomu prostate. (122) U karcinomu dojke jasne povezanosti između preživljenja pacijentica i izraženosti SOX 2 nije bilo, iako postoje i pretkliničke i kliničke studije koje jasno govore u prilog npr. smanjene osjetljivosti na hormonske blokatore SOX2 pozitivnih tumora. (114). U studijama u kojima je istraživana izražaj SOX 2 na operativnom materijalu trostruko negativnog karcinoma dojke, nije dokazan utjecaj SOX 2 na preživljenje pacijentica, kao niti kod HER2 (+) karcinoma (115,116).

U našim se rezultatima nije detektirala značajna razlika između preživljenja pacijenata s visokom, srednjom, odnosno niskim izraženosti NANOG. S obzirom na gotovo jednake mediane preživljenja u sve tri podskupine, možemo zaključiti kako NANOG nije neovisan prediktor preživljenja pacijenata s DMPM. OCT4 nije detektiran u tkivima mezotelioma pa se analiza preživljenja ovisno o njegovoj izraženosti nije mogla učiniti.

Također, u istraživanju se nije pokazala razlika u preživljenju pacijenata ovisno o izraženosti SOX2 proteina, iako su pacijenti s visokom izraženosti imali i dvostruko dulji median preživljenja u odnosu na srednje ekspresore. Ipak, statistički značajna razlika između podskupina nije dokazana s obzirom na široke intervale pouzdanosti.

Utjecaj aktivnosti PI3K/AKT puta opsežno je istražen u mnogim tumorskim sijelima, kao što su karcinom pluća, dojke i debelog crijeva. U karcinomu pluća veća aktivnost puta povezana je s lošijom prognozom(131), kao i u karcinomu kolona (131,137), dok su u karcinomu dojke rezultati kontradiktorni pa tako neki govore u prilog slabijeg terapijskog odgovora i lošijeg preživljenja pacijenata s PI3K mutacijom, dok u drugim istraživanjima ta razlika nije potvrđena ili pak govori u prilog pozitivnog prognostičkog značaja PI3K mutacija (137,138). U našem istraživanju nije bilo razlike u preživljenju između podskupina, s tim da se kod pacijenata s visokom izraženosti PI3K uočio trend kraćeg preživljenja.

BCL-2 je regulatorni protein istražen u mnogim sijelima raka, kao što su rak dojke, želuca, prostate, pluća, limfom te hepatocelularni karcinom. Pojačana aktivnost BCL-2 povezana je s agresivnijom biologijom limfoma, smanjenim odgovorom na terapiju nesitnostaničnog raka pluća i hepatocelularnog karcinoma (127, 130, 131). Istovremeno, njegova aktivnost u karcinomu dojke obrnuto je korelirala sa sklonošću metastaziranja u limfne čvorove (128). U našim uzorcima BCL-2 nije bio značajno eksprimiran pa analiza preživljenja ovisno o izraženosti nije učinjena.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Pokazana je izraženost gena pluripotencije *POU5F1*, *NANOG* i *SOX 2* te transkripcijskih faktora *NANOG*, *SOX2* u stanicama mezotela i stanicama difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.
2. Pokazana je značajno viša izraženost navedenih proteina u stanicama mezotelioma te značajno viša izraženost navedenih gena u stanicama mezotela.
3. Pokazana je izraženost proteina i gena signalnog puta *PI3K/AKT/BCL2* u malignom mezoteliomu i u mezotelu.
4. Pokazana je značajno viša izraženost *PI3K* i *AKT* u stanicama mezotelioma te značajno viša izraženost *PIK3CA*, *PIK3CD*, *AKT1*, *AKT2* i *AKT3* u stanicama mezotela.
5. Nije dokazana izraženost *OCT4* proteina u podtipovima mezotelioma. Nije dokazna statistički značajna razlika u izraženosti *POU5F1* gena između pojedinih histoloških podtipova mezotelioma.
6. Prisutna je statistički značajno viša izraženost *NANOG* proteina u pleomorfnoj varijanti malignog pleuralnog mezotelioma u odnosu na druge podtipove. Nije dokazana statistički značajna razlika u izraženosti *NANOG* gena između pojedinih histoloških podtipova mezotelioma.
7. Nije dokazana statistički značajna razlika u izraženosti *SOX2* proteina te *SOX2* gena između pojedinih histoloških podtipova mezotelioma, kao niti razlika u izraženosti *PI3K* proteina te *PI3KCA* i *PI3KCD* gena između pojedinih histoloških podtipova mezotelioma.
8. Pokazana je veća izraženost *AKT* proteina u solidnom u odnosu na tubulopapilarni histološki podtip. Nije bilo razlike u izraženosti *AKT1*, *AKT2* i *AKT3* gena između pojedinih podtipova mezotelioma.

9. Pokazana je značajna korelacija izraženosti *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2* gena s genima *PI3KCA* i *PI3KCD* te korelacija izraženosti *POU5F1*, *NANOG* i *SOX2* gena s genima *AKT2* i *AKT3*.
10. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju bolesnika ovisno o dobi ili spolu. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju između bolesnika sa sarkomatoidnim i epiteloidnim podtipom mezotelioma kao niti između bolesnika s raznim varijantama epiteloidnog podtipa .
11. Pokazana je statistički značajna razlika u preživljenju između bolesnika s sarkomatoidnim i pleomorfnim podtipom u usporedbi s bolesnicima s bolje diferenciranim podtipovima mezotelioma.
12. Nije dokazana statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika ovisno o stadiju bolesti. Nije bilo razlike u preživljenju bolesnika koji su liječeni kirurški u usporedbi s onima kod kojih nije provedeno kirurško liječenje.
13. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju bolesnika ovisno o izraženosti *NANOG* i *SOX2* proteina, kao niti ovisno o izraženosti *PI3K* i *AKT*



## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Maligni pleuralni mezoteliom je zloćudni tumor mezotelnog porijekla, čija dijagnostika i liječenje još uvijek predstavljaju izazov. OCT4, NANOG i SOX2 su čimbenici pluripotencije čija je aktivnost ključna za procese dijeljenja i sazrijevanja stanica tijekom embrionalnog razvoja, a koji se istražuju radi njihove uloge tokom onkogeneze. Signalni put PI3K/AKT/BCL2 jedna je od bolje proučenih kaskada prijenosa unutarstaničnih signala, čijom aktivnošću stanice raka izbjegavaju procese apoptoze i time si omogućavaju preživljenje.

**Materijali i metode:** U istraživanju su korišteni uzorci pacijenata s malignim pleuralnim mezoteliomom. Učinjene su imuohistokemijske i PCR analize radi detekcije proteina odnosno gena čimbenika pluripotencije OCT4, NANOG i SOX2 i puta PI3K/AKT/BCL2.

**Rezultati:** U ovom smo istraživanju dokazali aktivnost proteina i gena čimbenika pluripotencije u mezoteliomu pleure te u zdravom mezotelu. Aktivnost gena *NANOG*, *SOX2* i *OCT4* bila je viša u stanicama mezotela, dok je izraženost proteina bila viši u mezoteliomskim stanicama. Izraženost NANOG-a povezan je sa slabije diferenciranim podtipom mezotelioma. U istraživanju smo pokazali izraženost PI3K i AKT i BCL2 u mezoteliomu i u pleuri, pri čemu je aktivnost gena bila viša u stanicama pleure, a proteina AKT i BCL2 u stanicama mezotelioma.

Najlošije preživljenje imali su pacijenti sa sarkomatoidnim i pleomorfnim mezoteliomom, dok utjecaj izraženosti NANOG, OCT4 i SOX 2 te PI3K i AKT na preživljenje nije dokazan.

**Zaključak:** Zaključujemo kako su navedeni signalni mehanizmi aktivni u mezoteliomu pleure, a potrebna su dodatna istraživanja radi otkrivanja preciznih prediktivnih faktora u ovoj bolesti.

## 9. SUMMARY

### **Analysis of the transcription factors SOX2, OCT4 and NANOG expression and the PI3K/AKT/BCL2 pathway in malignant pleural mesothelioma**

**Fran Seiwerth, 2023**

**Introduction:** Malignant pleural mesothelioma is a malignant tumor of mesothelial origin, the diagnosis and treatment of which still represent a challenge. OCT4, NANOG and SOX2 are pluripotency factors whose activity is crucial for the processes of cell division and maturation during embryonic development, and which are being investigated for their role during oncogenesis. The PI3K/AKT/BCL2 signaling pathway is one of the better-studied intracellular signal transmission cascades, with the activity of which cancer cells avoid the processes of apoptosis and thus enable their survival.

**Materials and methods:** The study used samples from patients with malignant pleural mesothelioma. Immunohistochemical and PCR analyzes were performed to detect proteins or genes of the pluripotency factors OCT4, NANOG and SOX2 and the PI3K/AKT/BCL2 pathway.

**Results:** In this study, we demonstrated the activity of pluripotency factor proteins and genes in pleural mesothelioma and in healthy mesothelium. NANOG, SOX2 and OCT4 gene activity was higher in mesothelial cells, while protein expression was higher in mesothelioma cells. NANOG expression is associated with a less differentiated subtype of mesothelioma. In the research, we showed the expression of PI3K and AKT and BCL2 in mesothelioma and in the pleura, whereby gene activity was higher in pleural cells, and AKT and BCL2 proteins in mesothelioma cells.

Patients with sarcomatoid and pleomorphic mesothelioma had the worst survival, while the influence of the expression of NANOG, OCT4 and SOX 2 and PI3K and AKT on survival was not proven.

**Conclusion:** We conclude that the above signaling mechanisms are active in pleural mesothelioma, and additional research is needed to reveal precise predictive factors in this disease.

## 10. POPIS LITERATURE

1. AL. M. Junqueira's basic histology. 12th ed. Singapore: The McGraw- Hill Company, Inc; 2010.
2. Charalampidis C, Youroukou A, Lazaridis G, Baka S, Mpoukovinas I, Karavasilis V, i sur.. Pleura space anatomy. *J Thorac Dis.* 2015 Feb;7(Suppl 1):S27-32.
3. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Osnove histologije.* 7th ed. Zagreb: Školska knjiga; 1999.
4. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M editors. . Z. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, editors. *Patologija, peto, prerađeno i dopunjeno izdanje.* 5. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. In: *Patologija, peto, prerađeno i dopunjeno izdanje 5,* Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
5. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North western cape province. *Brit J Ind Med [Internet].* 1960;260. Available from: <http://oem.bmj.com/>
6. Delgermaa V, Takahashi K, Park E-K, Le GV, Hara T, Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Health Organ.* 2011 Oct;89(10):716–24, 724A-724C.
7. Abdel-Rahman O. Global trends in mortality from malignant mesothelioma: Analysis of WHO mortality database (1994-2013). *Clin Respir J.* 2018 Jun;12(6):2090–100.
8. Odgerel C-O, Takahashi K, Sorahan T, Driscoll T, Fitzmaurice C, Yoko-O M, i sur. Estimation of the global burden of mesothelioma deaths from incomplete national mortality data. *Occup Environ Med.* 2017 Dec;74(12):851–8.
9. Opitz I, Scherpereel A, Berghmans T, Psallidas I, Glatzer M, Rigau D, i sur. ERS/ESTS/EACTS/ESTRO guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur J cardio-thoracic Surg Off J Eur Assoc Cardio-thoracic Surg.* 2020 Jul;58(1):1–24.
10. Berry G, de Klerk NH, Reid A, Ambrosini GL, Fritschi L, Olsen NJ, i sur. Malignant pleural and peritoneal mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom, Western Australia. *Occup Environ Med.* 2004 Apr;61(4):e14.
11. Menon L., Franklin P., Olsen N., Segal A., De Klerk N.H., Musk A.W. *BFJH.* 60 years of the Western Australian Mesothelioma Registry. *Proc Thorac Soc Aust New Zealand; Melbourne, Aust.* 2021;93.
12. Brown LM, Howard RA, Travis LB. The risk of secondary malignancies over 30 years after the treatment of non-Hodgkin lymphoma. Vol. 107, *Cancer.* United States; 2006. p. 2741–2; author reply 2742.
13. Horwich A, Fossa SD, Huddart R, Dearnaley DP, Stenning S, Aresu M, i sur. Second cancer risk and mortality in men treated with radiotherapy for stage I seminoma. *Br J Cancer.* 2014 Jan;110(1):256–63.

14. de Klerk N, Alfonso H, Olsen N, Reid A, Sleith J, Palmer L, i sur. Familial aggregation of malignant mesothelioma in former workers and residents of Wittenoom, Western Australia. *Int J cancer*. 2013 Mar;132(6):1423–8.
15. Carbone M, Ferris LK, Baumann F, Napolitano A, Lum CA, Flores EG, i sur. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med*. 2012 Aug;10:179.
16. Taioli E, Wolf AS, Camacho-Rivera M, Flores RM. Women with malignant pleural mesothelioma have a threefold better survival rate than men. *Ann Thorac Surg*. 2014 Sep;98(3):1020–4.
17. Consonni D, Migliore E, Barone-Adesi F, Dallari B, De Matteis S, Oddone E, i sur. Gender differences in pleural mesothelioma occurrence in Lombardy and Piedmont, Italy. *Environ Res*. 2019 Oct;177:108636.
18. Alilović M, Peros-Golubčić T, Bekić A, Tekavec-Trkanjec J, Ivčević A. Epidemiology of malignant pleural mesotheliomas in Croatia in the period from 1989 to 1998. *Coll Antropol*. 2002 Dec;26(2):551–6.
19. Decković-Vukres V, Coric T, Tomić B, Erceg M, Mihel S, Uhernik A, i sur. Pojavnost bolesti uzrokovanih azbestom u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2002. do 2007. *Arch Ind Hyg Toxicol (arhiv@imi.hr)*; Vol60 NoSupplement. 2023;
20. Curin K, Sarić M, Strnad M. Incidence of malignant pleural mesothelioma in coastal and continental Croatia: epidemiological study. *Croat Med J*. 2002 Aug;43(4):498–502.
21. Brcic L, Kern I. Clinical significance of histologic subtyping of malignant pleural mesothelioma. *Transl lung cancer Res*. 2020 Jun;9(3):924–33.
22. Galetta D, Catino A, Misino A, Logroscino A, Fico M. Sarcomatoid mesothelioma: future advances in diagnosis, biomolecular assessment, and therapeutic options in a poor-outcome disease. *Tumori*. 2016;102(2):127–30.
23. Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, et al: Diffuse malignant mesothelioma. In: Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al (eds). *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 2015;
24. Kadota K, Suzuki K, Sima CS, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD. Pleomorphic epithelioid diffuse malignant pleural mesothelioma: a clinicopathological review and conceptual proposal to reclassify as biphasic or sarcomatoid mesothelioma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2011 May;6(5):896–904.
25. Alchami FS, Attanoos RL, Bamber AR. Myxoid variant epithelioid pleural mesothelioma defines a favourable prognosis group: an analysis of 191 patients with pleural malignant mesothelioma. *J Clin Pathol*. 2017 Feb;70(2):179–82.
26. Brčić L, Jakopović M, Brčić I, Klarić V, Milošević M, Sepac A, i sur. Reproducibility of histological subtyping of malignant pleural mesothelioma. *Virchows Arch*. 2014 Dec;465(6):679–85.
27. Ordóñez NG. Pleomorphic mesothelioma: report of 10 cases. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2012 Jul;25(7):1011–22.

28. Zhang W, Wu X, Wu L, Zhang W, Zhao X. Advances in the diagnosis, treatment and prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Ann Transl Med.* 2015 Aug;3(13):182.
29. Segal, A.; Whitaker, D.; Henderson, D.; Shilkin KI. Pathology and mesothelioma. In: *Mesothelioma*; Robinson, BWS, Chinanian, AP, Eds; Martin Dunitz: 2002. p. 143–184.
30. Musti M, Kettunen E, Dragonieri S, Lindholm P, Cavone D, Serio G, i sur. Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Oct;170(1):9–15.
31. Dacic S. Pleural mesothelioma classification-update and challenges. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2022 Jan;35(Suppl 1):51–6.
32. Sauter JL, Dacic S, Galateau-Salle F, Attanoos RL, Butnor KJ, Churg A, i sur. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Pleura: Advances Since the 2015 Classification. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2022 May;17(5):608–22.
33. Hjerpe A, Ascoli V, Bedrossian CWM, Boon ME, Creaney J, Davidson B, i sur. Guidelines for the Cytopathologic Diagnosis of Epithelioid and Mixed-Type Malignant Mesothelioma: a secondary publication. *Cytopathology.* 2015 Jun;26(3):142–56.
34. Muruganandan S, Alfonso H, Franklin P, Shilkin K, Segal A, Olsen N, i sur. Comparison of outcomes following a cytological or histological diagnosis of malignant mesothelioma. *Br J Cancer.* 2017 Mar;116(6):703–8.
35. Hoon SN, Lawrie I, Qi C, Rahman N, Maskell N, Forbes K, i sur. Symptom Burden and Unmet Needs in Malignant Pleural Mesothelioma: Exploratory Analyses From the RESPECT-Meso Study. *J Palliat Care.* 2021 Apr;36(2):113–20.
36. Yildirim H, Metintas M, Entok E, Ak G, Ak I, Dundar E, i sur. Clinical value of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography in differentiation of malignant mesothelioma from asbestos-related benign pleural disease: an observational pilot study. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2009 Dec;4(12):1480–4.
37. Sundaralingam A, Bedawi EO, Rahman NM. *Diagnostics in Pleural Disease. Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2020 Dec;10(12).
38. Berzenji L, Van Schil PE, Carp L. The eighth TNM classification for malignant pleural mesothelioma. *Transl lung cancer Res.* 2018 Oct;7(5):543–9.
39. NCCN Guidelines Version 1.2023 Mesothelioma: Pleural [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/meso\\_pleural.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/meso_pleural.pdf).
40. Hasani A, Alvarez JM, Wyatt JM, Bydder S, Millward M, Byrne M, i sur. Outcome for patients with malignant pleural mesothelioma referred for Trimodality therapy in Western Australia. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2009 Aug;4(8):1010–6.
41. Friedberg JS. The state of the art in the technical performance of lung-sparing operations for malignant pleural mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;25(2):125–43.

42. van Gerwen M, Wolf A, Liu B, Flores R, Taioli E. Short-term outcomes of pleurectomy decortication and extrapleural pneumonectomy in mesothelioma. *J Surg Oncol*. 2018 Dec;118(7):1178–87.
43. Zhou N, Rice DC, Tsao AS, Lee PP, Haymaker CL, Corsini EM, i sur. Extrapleural Pneumonectomy Versus Pleurectomy/Decortication for Malignant Pleural Mesothelioma. *Ann Thorac Surg*. 2022 Jan;113(1):200–8.
44. Blomberg C, Nilsson J, Holgersson G, Edlund P, Bergqvist M, Adwall L, i sur. Randomized Trials of Systemic Medically-treated Malignant Mesothelioma: A Systematic Review. *Anticancer Res*. 2015 May;35(5):2493–501.
45. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, i sur. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Jul;21(14):2636–44.
46. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, i sur. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2016 Apr;387(10026):1405–14.
47. Baas P, Scherpereel A, Nowak AK, Fujimoto N, Peters S, Tsao AS, i sur. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2021 Jan;397(10272):375–86.
48. Popat S, Baas P, Faivre-Finn C, Girard N, Nicholson AG, Nowak AK, i sur. Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(☆). Vol. 33, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. England; 2022. p. 129–42.
49. Abdel-Rahman O, Kelany M. Systemic therapy options for malignant pleural mesothelioma beyond first-line therapy: a systematic review. *Expert Rev Respir Med*. 2015 Oct;9(5):533–49.
50. Brims F. Epidemiology and Clinical Aspects of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Aug 20 [cited 2021 Aug 29];13(16):4194. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/16/4194>
51. <https://seer.cancer.gov/>, accessed 31/08/2021.
52. Glodić G., Koprivanac A., Mažuranić A., Dujmović T., Marušić A. i sur.. Clinical characteristics and survival of patients with malignant pleural mesothelioma: a single center study. *Liječ Vjesn* 2020;142:306–314.
53. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*. 2012 Mar;21(3):283–96.
54. Choi YJ, Anders L. Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene*. 2014 Apr;33(15):1890–903.
55. Lin Y, Yang Y, Li W, Chen Q, Li J, Pan X, i sur. Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell*. 2012 Nov;48(4):627–40.

56. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*. 2014;3(2):74–82.
57. Yeom YI, Ha HS, Balling R, Schöler HR, Artzt K. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev*. 1991 Nov;35(3):171–9.
58. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 2001;19(4):271–8.
59. Jerabek S, Merino F, Schöler HR, Cojocaru V. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1839(3):138–54.
60. Hambiliki F, Ström S, Zhang P, Stavreus-Evers A. Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Oct;29(10):1021–8.
61. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998 Oct;95(3):379–91.
62. Shimosaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development*. 2003 Jun;130(11):2505–12.
63. Zeineddine D, Papadimou E, Chebli K, Gineste M, Liu J, Grey C, et al. Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell*. 2006 Oct;11(4):535–46.
64. Garikipati VNS, Singh SP, Mohanram Y, Gupta AK, Kapoor D, Nityanand S. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human fetus heart. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192244.
65. Christophersen NS, Helin K. Epigenetic control of embryonic stem cell fate. *J Exp Med*. 2010 Oct;207(11):2287–95.
66. Zhang Q, Han Z, Zhu Y, Chen J, Li W. The Role and Specific Mechanism of OCT4 in Cancer Stem Cells: A Review. *Int J stem cells*. 2020 Nov;13(3):312–25.
67. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014 Nov;5(21):10803–15.
68. Zhao Z, Lu P, Zhang H, Xu H, Gao N, Li M, et al. Nestin positively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res*. 2014 Jul;16(4):408.
69. Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):528–39.
70. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*. 2012 Nov;31(47):4898–911.
71. Kim M-C, Hwang S-H, Kim N-Y, Lee H-S, Ji S, Yang Y, et al. Hypoxia promotes acquisition of aggressive phenotypes in human malignant mesothelioma. *BMC*



- Cancer. 2018 Aug;18(1):819.
72. Chen Y-C, Hsu H-S, Chen Y-W, Tsai T-H, How C-K, Wang C-Y, i sur. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*. 2008 Jul;3(7):e2637.
  73. Li B, Yao Z, Wan Y, Lin D. Overexpression of OCT4 is associated with gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Nov;7(47):77342–7.
  74. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, i sur. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem*. 2011 Dec;286(48):41434–41.
  75. Abada PB, Howell SB. Cisplatin induces resistance by triggering differentiation of testicular embryonal carcinoma cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e87444.
  76. Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell*. 2003 Nov;4(5):361–70.
  77. Zhou H, Hu YU, Wang W, Mao Y, Zhu J, Zhou B, i sur. Expression of Oct-4 is significantly associated with the development and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2015 Aug;10(2):691–6.
  78. Lin H, Sun L-H, Han W, He T-Y, Xu X-J, Cheng K, i sur. Knockdown of OCT4 suppresses the growth and invasion of pancreatic cancer cells through inhibition of the AKT pathway. *Mol Med Rep*. 2014 Sep;10(3):1335–42.
  79. Krogh Petersen J, Jensen P, Dahl Sørensen M, Winther Kristensen B. Expression and Prognostic Value of Oct-4 in Astrocytic Brain Tumors. *PLoS One*. 2016;11(12):e0169129.
  80. Zhang W, Sui Y, Ni J, Yang T. Insights into the Nanog gene: A propeller for stemness in primitive stem cells. *Int J Biol Sci*. 2016;12(11):1372–81.
  81. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020 Mar;245(5):456–64.
  82. Høi-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, Brask Sonne S, Graem N, Skakkebaek NE, i sur. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):48–56.
  83. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*. 2015 Sep;54(9):679–87.
  84. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, i sur. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May;113(5):643–55.
  85. Rodrigo JP, Villaronga MÁ, Menéndez ST, Hermida-Prado F, Quer M, Vilaseca I, i sur. A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci Rep*. 2017 Sep;7(1):11110.
  86. Zhang J, Wang X, Chen B, Xiao Z, Li W, Lu Y, i sur. The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor

- development. *Oncol Lett.* 2010 May;1(3):457–63.
87. Osama A, Sabry D, Hassany SM, Abdelmoneim SS, Sabry A. SIRT-1 expression is associated with expression of NANOG in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer Biomark.* 2016 Jun;17(2):155–63.
  88. Elsir T, Edqvist P-H, Carlson J, Ribom D, Bergqvist M, Ekman S, i sur. A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: identification of Nanog as a predictor of survival. *Int J cancer.* 2014 Mar;134(5):1123–31.
  89. Soni P, Qayoom S, Husain N, Kumar P, Chandra A, Ojha BK, i sur. CD24 and Nanog expression in Stem Cells in Glioblastoma: Correlation with Response to Chemoradiation and Overall Survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Aug;18(8):2215–9.
  90. Sławek S, Szmyt K, Fularz M, Dziudzia J, Boruckowski M, Sikora J, i sur. Pluripotency transcription factors in lung cancer-a review. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2016 Apr;37(4):4241–9.
  91. Gialmanidis IP, Bravou V, Petrou I, Kourea H, Mathioudakis A, Lilis I, i sur. Expression of Bmi1, FoxF1, Nanog, and  $\gamma$ -catenin in relation to hedgehog signaling pathway in human non-small-cell lung cancer. *Lung.* 2013 Oct;191(5):511–21.
  92. Park E, Park SY, Sun P-L, Jin Y, Kim JE, Jheon S, i sur. Prognostic significance of stem cell-related marker expression and its correlation with histologic subtypes in lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2016 Jul;7(27):42502–12.
  93. Rasti A, Mehrazma M, Madjd Z, Abolhasani M, Saeednejad Zanjani L, Asgari M. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci Rep.* 2018 Aug;8(1):11739.
  94. Liang C, Zhao T, Ge H, Xu Y, Ren S, Yue C, i sur. The clinicopathological and prognostic value of Nanog in human gastrointestinal luminal cancer: A meta-analysis. *Int J Surg.* 2018 May;53:193–200.
  95. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tc11, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anat Cell Biol.* 2014 Mar;47(1):1–11.
  96. You L, Guo X, Huang Y. Correlation of Cancer Stem-Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG with Clinicopathological Features and Prognosis in Operative Patients with Rectal Cancer. *Yonsei Med J.* 2018 Jan;59(1):35–42.
  97. Gao S, Pan Y, Song L, Dong L, Weng LI, Wang P, i sur. Nanog Predicts Poor Prognosis in Human Pancreatic Cancer and Is Downregulated by QingyihuaJi Formula in Pancreatic Cancer Stem Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:7028289.
  98. Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, i sur. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 2013 Oct;340(1):113–23.
  99. Liang C, Zhang K, Ge H, Li W, Li G, Wu J. Prognostic and clinicopathological value of Nanog in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2018 Feb;477:24–31.

100. Kenda Šuster N, Frković Grazio S, Virant-Klun I, Verdenik I, Smrkolj Š. Cancer Stem Cell-Related Marker NANOG Expression in Ovarian Serous Tumors: A Clinicopathological Study of 159 Cases. *Int J Gynecol cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc.* 2017 Nov;27(9):2006–13.
101. Lee M, Nam EJ, Kim SW, Kim S, Kim JH, Kim YT. Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc.* 2012 Nov;22(9):1489–96.
102. Zhao S, Nichols J, Smith AG, Li M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Nov;27(3):332–42.
103. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, i sur. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):625–35.
104. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan;17(1):126–40.
105. Alatzoglou KS, Andoniadou CL, Kelberman D, Buchanan CR, Crolla J, Arriazu MC, i sur. SOX2 haploinsufficiency is associated with slow progressing hypothalamo-pituitary tumours. *Hum Mutat.* 2011 Dec;32(12):1376–80.
106. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam K-T, Kurotani R, Morrisey EE, i sur. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development.* 2007 Jul;134(13):2521–31.
107. Fernandes KJL, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, i sur. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1082–93.
108. Hagstrom SA, Pauer GJT, Reid J, Simpson E, Crowe S, Maumenee IH, i sur. SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am J Med Genet A.* 2005 Oct;138A(2):95–8.
109. Liu X-F, Yang W-T, Xu R, Liu J-T, Zheng P-S. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e87092.
110. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, i sur. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature.* 2014 Jul;511(7508):246–50.
111. Vanner RJ, Remke M, Gallo M, Selvadurai HJ, Coutinho F, Lee L, i sur. Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell.* 2014 Jul;26(1):33–47.
112. Kurtova A V, Xiao J, Mo Q, Pazhanisamy S, Krasnow R, Lerner SP, i sur. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature.* 2015 Jan;517(7533):209–13.
113. Zhang J, Chang DY, Mercado-Uribe I, Liu J. Sex-determining region Y-box 2 expression predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2012 Sep;43(9):1405–12.

114. Piva M, Domenici G, Iriando O, Rábano M, Simões BM, Comaills V, i sur. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2014 Jan;6(1):66–79.
115. Zhang J-M, Wei K, Jiang M. OCT4 but not SOX2 expression correlates with worse prognosis in surgical patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2018 Jul;25(4):447–55.
116. Yang F, Zhang J, Yang H. OCT4, SOX2, and NANOG positive expression correlates with poor differentiation, advanced disease stages, and worse overall survival in HER2(+) breast cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2018;11:7873–81.
117. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl A-C, Scheble VJ, Maier S, i sur. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2011 Jul;24(7):944–53.
118. Chen Y, Huang Y, Zhu L, Chen M, Huang Y, Zhang J, i sur. SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Jun;142(6):1221–30.
119. Lee SH, Oh S-Y, Do SI, Lee HJ, Kang HJ, Rho YS, i sur. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Nov;111(11):2122–30.
120. Bayo P, Jou A, Stenzinger A, Shao C, Gross M, Jensen A, i sur. Loss of SOX2 expression induces cell motility via vimentin up-regulation and is an unfavorable risk factor for survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2015 Oct;9(8):1704–19.
121. Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic int. *Pancreas*. 2006 Mar;32(2):164–70.
122. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, i sur. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e53701.
123. Wuebben EL, Rizzino A. The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*. 2017 Jul;8(27):44917–43.
124. Belotte J, Fletcher NM, Alexis M, Morris RT, Munkarah AR, Diamond MP, i sur. Sox2 gene amplification significantly impacts overall survival in serous epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci*. 2015 Jan;22(1):38–46.
125. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep;27(41):5497–510.
126. Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, i sur. Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase &#x3b3; Cell [Internet]. 2000 Dec 8;103(6):931–44. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00196-3)
127. Nitulescu Mihai G, Van De Venter M, Nitulescu G, Ungurianu A, Juzenas P, Peng Q, i sur. The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *Int J Oncol*

- [Internet]. 2018;53(6):2319–31. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4597>
128. Míinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peränen J, i sur. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J*. 2005 Oct;391(Pt 1):87–93.
  129. Meyuhas O. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;320:41–73.
  130. Madsen RR. PRINCIPLES OF PI3K BIOLOGY AND ITS ROLE IN LYMPHOMA. In: O’Conner OA, Ansell SM, Seymour JF, editors. Hoboken (NJ); 2023.
  131. Vanhaesebroeck B, Perry MWD, Brown JR, André F, Okkenhaug K. PI3K inhibitors are finally coming of age. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Oct;20(10):741–69.
  132. Dossou AS, Basu A. The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep;11(10).
  133. Nam S, Gupta VK, Lee H-P, Lee JY, Wisdom KM, Varma S, i sur. Cell cycle progression in confining microenvironments is regulated by a growth-responsive TRPV4-PI3K/Akt-p27(Kip1) signaling axis. *Sci Adv*. 2019 Aug;5(8):eaaw6171.
  134. Orgel E, Mittelman SD. The links between insulin resistance, diabetes, and cancer. *Curr Diab Rep*. 2013 Apr;13(2):213–22.
  135. Kyo S, Nakayama K. Endometrial Cancer as a Metabolic Disease with Dysregulated PI3K Signaling: Shedding Light on Novel Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug;21(17).
  136. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel S-S, Wolf A, Wollert-Wulf B, i sur. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul;110(30):12420–5.
  137. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, i sur. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 2009 Mar;69(5):1851–7.
  138. Alqahtani A, Ayesh HSK, Halawani H. PIK3CA Gene Mutations in Solid Malignancies: Association with Clinicopathological Parameters and Prognosis. *Cancers (Basel)*. 2019 Dec;12(1).
  139. Hu Z-Y, Xie N, Tian C, Yang X, Liu L, Li J, i sur. Identifying Circulating Tumor DNA Mutation Profiles in Metastatic Breast Cancer Patients with Multiline Resistance. *EBioMedicine*. 2018 Jun;32:111–8.
  140. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, i sur. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER $\alpha$ , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res*. 2012 Feb;14(1):R28.
  141. Wu H, Wang W, Du J, Li H, Wang H, Huang L, i sur. The distinct clinicopathological and prognostic implications of PIK3CA mutations in breast cancer patients from Central China. *Cancer Manag Res*. 2019;11:1473–92.
  142. Narayan P, Prowell TM, Gao JJ, Fernandes LL, Li E, Jiang X, i sur. FDA Approval Summary: Alpelisib Plus Fulvestrant for Patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Clin cancer Res an Off J*

- Am Assoc Cancer Res. 2021 Apr;27(7):1842–9.
143. Joy A, Kapoor M, Georges J, Butler L, Chang Y, Li C, i sur. The role of AKT isoforms in glioblastoma: AKT3 delays tumor progression. *J Neurooncol.* 2016 Oct;130(1):43–52.
  144. Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ, Pearson HB. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun;21(12).
  145. Correia C, Schneider PA, Dai H, Dogan A, Maurer MJ, Church AK, i sur. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood.* 2015 Jan;125(4):658–67.
  146. Pilling AB, Hwang C. Targeting prosurvival BCL2 signaling through Akt blockade sensitizes castration-resistant prostate cancer cells to enzalutamide. *Prostate.* 2019 Aug;79(11):1347–59.
  147. Mortenson MM, Galante JG, Gilad O, Schlieman MG, Virudachalam S, Kung H-J, i sur. BCL-2 functions as an activator of the AKT signaling pathway in pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 2007 Dec;102(5):1171–9.
  148. Park H-A, Broman K, Jonas EA. Oxidative stress battles neuronal Bcl-xL in a fight to the death. *Neural Regen Res.* 2021 Jan;16(1):12–5.
  149. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol.* 2015 Mar;89(3):289–317.
  150. Meng X, Cui J, He G. Bcl-2 Is Involved in Cardiac Hypertrophy through PI3K-Akt Pathway. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6615502.
  151. Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, Ohfuji S, Ito H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Virchows Arch.* 1996 Jul;428(4–5):229–35.
  152. Merino D, Lok SW, Visvader JE, Lindeman GJ. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene.* 2016 Apr;35(15):1877–87.
  153. Raha P, Thomas S, Thurn KT, Park J, Munster PN. Combined histone deacetylase inhibition and tamoxifen induces apoptosis in tamoxifen-resistant breast cancer models, by reversing Bcl-2 overexpression. *Breast Cancer Res.* 2015 Feb;17(1):26.
  154. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, i sur. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jul;89(1):55–64.
  155. Alam M, Alam S, Shamsi A, Adnan M, Elsbali AM, Al-Soud WA, i sur. Bax/Bcl-2 Cascade Is Regulated by the EGFR Pathway: Therapeutic Targeting of Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2022;12:869672.
  156. Chang YC, Xu YH. Expression of Bcl-2 inhibited Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells. *Cell Res.* 2000 Sep;10(3):233–42.
  157. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
158. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*. 2015 Jun;5:10775.
  159. Li J, Zhang Y, Yang C, Rong R. Discrepant mRNA and Protein Expression in Immune Cells. *Curr Genomics*. 2020 Dec;21(8):560–3.
  160. Yoon C, Lu J, Yi BC, Chang KK, Simon MC, Ryeom S, i sur. PI3K/Akt pathway and Nanog maintain cancer stem cells in sarcomas. *Oncogenesis*. 2021 Jan;10(1):12.
  161. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar;13(4):227–32.
  162. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, i sur. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):499–507.
  163. Cedrés S, Montero MA, Martínez P, Martínez A, Rodríguez-Freixinós V, Torrejon D, i sur. Exploratory analysis of activation of PTEN-PI3K pathway and downstream proteins in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung Cancer*. 2012 Jul;77(1):192–8.
  164. Xu W-F, Liu F, Ma Y-C, Qian Z-R, Shi L, Mu H, i sur. Baicalin Regulates Proliferation, Apoptosis, Migration, and Invasion in Mesothelioma. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2019 Oct;25:8172–80.
  165. Almozyan S, Colak D, Mansour F, Alaiya A, Al-Harazi O, Qattan A, i sur. PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int J cancer*. 2017 Oct;141(7):1402–12.
  166. Jeong C-H, Cho Y-Y, Kim M-O, Kim S-H, Cho E-J, Lee S-Y, i sur. Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010 Dec;28(12):2141–50.
  167. Yu K-R, Yang S-R, Jung J-W, Kim H, Ko K, Han DW, i sur. CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells*. 2012 May;30(5):876–87.
  168. Svaguša T, Martinić M, Martinić M, Kovačević L, Šepac A, Miličić D, i sur. Mitochondrial unfolded protein response, mitophagy and other mitochondrial quality control mechanisms in heart disease and aged heart. *Croat Med J*. 2020 Apr;61(2):126–38.
  169. Honma N, Horii R, Ito Y, Saji S, Younes M, Iwase T, i sur. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer*. 2015 Oct;15:698.
  170. Pillai K, Pourgholami MH, Chua TC, Morris DL. Does the expression of BCL2 have prognostic significance in malignant peritoneal mesothelioma? *Am J Cancer Res*. 2013;3(3):312–22.
  171. Taioli E, van Gerwen M, Mihalopoulos M, Moskowitz G, Liu B, Flores R. Review of malignant pleural mesothelioma survival after talc pleurodesis or surgery. *J Thorac*

Dis. 2017 Dec;9(12):5423–33.

172. Sayan M, Bas A, Turk MS, Ozkan D, Celik A, Kurul İC, i sur. Survival Effect of Complete Multimodal Therapy in Malignant Pleural Mesothelioma. *J chest Surg.* 2022 Oct;55(5):405–12.
173. Shavelle R, Vavra-Musser K, Lee J, Brooks J. Life Expectancy in Pleural and Peritoneal Mesothelioma. *Lung cancer Int.* 2017;2017:2782590.
174. Cardinale L, Ardisson F, Gned D, Sverzellati N, Piacibello E, Veltri A. Diagnostic Imaging and workup of Malignant Pleural Mesothelioma. *Acta Biomed.* 2017 Aug;88(2):134–42.



## 11. ŽIVOTOPIS

Fran Seiwerth, doktor medicine, rođen je 9. rujna 1987. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao je u Zagrebu te je završio Klasičnu gimnaziju, također u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2006. godine, a diplomirao 2012. godine.

Pripravnički staž odradio je u KBC Zagreb, a nakon položenog stručnog ispita 2013. godine bio je zaposlen u Zavodu za hitnu medicinu Istarske županije, od ožujka do rujna 2014. godine..

Od listopada 2014. zaposlen je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Klinici za plućne bolesti Jordanovac kao specijalizant pulmologije. Specijalistički ispit položio je u ožujku 2020. godine te je od tada na istoj Klinici zaposlen kao specijalist.

Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ pohađao je u razdoblju od 2014.- 2019. godine.

Aktivno sudjeluje na stručnim i znanstvenim domaćim i međunarodnim kongresima i izradi znanstvenih radova te prisustvuje poslijediplomskim tečajevima trajne medicinske izobrazbe liječnika.

Autor je i koautor više znanstvenih članaka koji su objavljeni u indeksiranim časopisima.

Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.