

Geni uključeni u senescenciju stanica glioma

Težak, Jan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:105:289902>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Jan Težak

Geni uključeni u senescenciju stanica glioma

Diplomski rad



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

Popis kratica:

AKT/PKB: Proteinska kinaza B (engl. *Protein Kinase B*)

AMPK: AMP-aktivirana proteinska kinaza (engl. *AMP-Activated Protein Kinase*)

AP2M1: Podjedinica 1 adaptorskog proteinskog kompleksa 2 Mu (engl. *Adaptor Related Protein Complex 2 Mu 1 Subunit*)

ARF: Alternativni okvir čitanja ((engl. *Alternative Reading Frame*)

ATM: ATM Serin/Treonin Kinaza ili Mutiran u Ataksiji telangiektaziji (engl. *Ataxia Telangiectasia Mutated*)

ATP: Adenozin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

ATR: Ataksija telangiektazija i Rad3-srodni protein (engl. *Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein*)

BH3: Bcl-2 homologija 3 (engl. *Bcl-2 Homology 3*)

Bcl-2: B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell Lymphoma 2*)

CAR-T: T-stanice s kimeričnim antigenskim receptorom (engl. *Chimeric Antigen Receptor T-cell*)

CCL-12: Kemokin (C-C motiv) ligand 12 (engl. *Chemokine (C-C motif) Ligand 12*)

CCN1: Faktor stanične komunikacijske mreže 1 (engl. *Cellular Communication Network Factor 1*)

CD8+: Klaster diferencijacije 8 (pozitivne T-stanice) (engl. *Cluster of Differentiation 8*)

CDC25a: Stanični ciklus 25A (engl. *Cell Division Cycle 25A*)

CDK: Ciklin-ovisna kinaza (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*), npr. CDKN2, CDKN4, CDKN6,

...

CDKN2A: Inhibitor ciklin-ovisne kinaze 2A (engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*), poznat i kao p16INK4A

CNA: Promjena broja kopija (engl. *Copy Number Alteration*)

CPTAC: Program za analizu proteoma tumora (engl. *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium*)

DDR: Odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA Damage Response*)

DNA: Deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

DSB: Dvolančani lom DNA (engl. *Double-Strand Break*)

E2F: Transkripcijski faktor E2F (engl. *E2F Transcription Factor*)

EGFR: Receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*)

EGFR^{vIII}: Varijanta III epidermalnog faktora rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III*)

EZH2: Pojačivač zeste homolog 2 (engl. *Enhancer of Zeste Homolog 2*)

GBM: Glioblastoma multiforme (engl. *Glioblastoma Multiforme*)

Gy: Grej (jedinica doze zračenja) (engl. *Gray*)

HER2: Ljudski epidermalni faktor rasta 2 (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)

HGF: Čimbenik rasta hepatocita (engl. *Hepatocyte Growth Factor*)

HGG: Gliom visokog stupnja (engl. *High-Grade Glioma*)

HUGO: Organizacija za ljudski genom (engl. *Human Genome Organization*)

ICB: Blokada imunoloških kontrolnih točaka (engl. *Immune Checkpoint Blockade*)

IDH: Izocitrat dehidrogenaza (engl. *Isocitrate Dehydrogenase*)

IGFBP3: Vezni protein 3 za inzulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3*)

IGFBP4: Vezni protein 4 za inzulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4*)

IGFBP7: Vezni protein 7 za inzulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 7*)

IL-6: Interleukin 6 (engl. *Interleukin 6*)

IL-8: Interleukin 8 (engl. *Interleukin 8*)

IL13R α 2: Receptor alfa 2 za interleukin 13 (engl. *Interleukin 13 Receptor Alpha 2*)

LGG: Gliom niskog stupnja (engl. *Low-Grade Glioma*)

MDM2: Mišji homolog double minute 2 (engl. *Mouse Double Minute 2 Homolog*)

mRNA: Glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *Messenger Ribonucleic Acid*)

mTOR: Mehanički cilj rapamicina (engl. *Mechanistic Target of Rapamycin*)

miDAS: Senescencija povezana s disfunkcijom mitohondrija (engl. *Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence*)

NAD: Nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NADH: Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NF- κ B: Nuklearni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor Kappa B*)

NK: Prirodne stanice ubojice (engl. *Natural Killer Cells*)

OV: Onkolitički virus (engl. *Oncolytic Virus*)

p16INK4A: (vidi CDKN2A)

p21: Inhibitor ciklin-ovisne kinaze 1 (engl. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1*)

PD-1: Programirana smrt-1 (engl. *Programmed Death-1*)

PD-L1: Ligand za programiranu smrt-1 (engl. *Programmed Death-Ligand 1*)

PDGF-AA: Faktor rasta AA potekao iz trombocita (engl. *Platelet-Derived Growth Factor AA*)

PI3K: Fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *Phosphoinositide 3-Kinase*)

pRb: Retinoblastomski protein (engl. *Retinoblastoma Protein*)

ROS: Reaktivni spojevi kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SAHF: Heterokromatinski fokusi pridruženi senescenciji (engl. *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*)

SASP: Sekretorni fenotip pridružen senescenciji (engl. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

SERPINE1: Član 1 obitelji serinskih proteaza E (engl. *Serpin Family E Member 1*)

SIPS: Prijevremenasenescencija stanice izazvana stresom (engl. *Stress-Induced Premature Senescence*)

SLC1A5: Član obitelji nosača otopljenih tvari 1, član 5 (engl. *Solute Carrier Family 1 Member 5*)

STAT3: Transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)

SŽS: Središnji živčani sustav (engl. *Central Nervous System, CNS*)

TAA: Tumor-pridruženi antigen (engl. *Tumor-Associated Antigen*)

TCGA: Atlas genoma raka (engl. *The Cancer Genome Atlas*)

TNFRSF11B: Član 11B superobitelji receptora tumorske nekroze (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11B*)

TNFRSF1A: Član 1A superobitelji receptora tumorske nekroze (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A*)

TP53: tumor supresorski gen p53 (engl. *tumor suppressor gene p53*)

TP53BP1: Protein 1 koji veže tumorski protein p53 (engl. *Tumor Protein p53 Binding Protein 1*)

TSA: Tumor-specifični antigen (engl. *Tumor-Specific Antigen*)

WHO: Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

Sadržaj

Sažetak	1
Summary	2
Uvod.....	3
<i>Gliomi</i>	3
<i>Stanična senescencija</i>	8
<i>Senescencija u gliomima</i>	17
Hipoteza	19
Ciljevi rada.....	19
Materijali i metode.....	20
Rezultati	25
<i>Zbirne promjene prema tipu glioma</i>	25
<i>Promjene gena TP53</i>	27
<i>Promjene gena CDKN2A</i>	28
<i>Promjene gena EGFR</i>	29
<i>Promjene gena ATM</i>	30
<i>Promjene gena TNFRSF1A</i>	31
<i>Promjene gena IGFBP7</i>	32
<i>Promjene gena TP53BP1</i>	34
<i>Promjene gena HGF</i>	35
<i>Promjene gena SERPINE1</i>	36
Zbirni rezultati prema stupnju malignosti	37
Rasprava.....	40
Zaključci	46
Zahvale.....	46
Literatura.....	47
Životopis	57

Sažetak

Geni uključeni u senescenciju stanica glioma

Jan Težak

Uvod: Stanična senescencija je proces u kojem se stanice trajno prestaju dijeliti, a koji ima ključnu ulogu u kontroli tumorskog rasta i odgovoru na terapiju. Gliomi su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava, a prognoza im je često nepovoljna zbog agresivnog kliničkog tijeka i česte rekurencije nakon terapije. Sve više istraživanja upućuje na značaj senescentnih stanica glioma na takav klinički tijek ovih tumora. Cilj ove studije je analizirati učestalost i tip promjena gena uključenih u staničnu senescenciju u različitim tipovima glioma.

Materijali i metode: Analizirali smo 3425 uzoraka glioma koristeći podatke s cBioPortala za genomiku tumora. Odabrali smo 10 najčešće promijenjenih gena povezanih sa senescencijom: *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *ATM*, *TNFRSF1A*, *IGFBP7*, *TNFRSF11B*, *TP53BP1*, *HGF* i *SERPINE1*. *In silico* analiza podataka uključivala je određivanje učestalosti mutacija, amplifikacija, delecija i višestrukih promjena u svakom tipu glioma.

Rezultati: Rezultati su pokazali da su u ukupnom uzorku *TP53*, *CDKN2A* i *EGFR* najčešće promijenjeni geni. *CDKN2A*, *EGFR*, *ATM*, *IGFBP7*, *TP53BP1* i *HGF* su imali veći postotak promjena u gliomima visokog stupnja (HGG), dok su *TP53*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF11B* i *SERPINE1* bili češće promijenjeni u gliomima nižeg stupnja (LGG). Statistički značajna razlika u promjenama između HGG i LGG skupina je utvrđena za *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *IGFBP7* te *TNFRSF11B*.

Zaključak: Pokazali smo kako su proučavani geni češće promijenjeni u gliomima viših gradusa. Obrasci promjena odgovaraju dosadašnjim spoznajama iz literature. Ovi nalazi naglašavaju važnost specifičnih genetskih promjena u regulaciji stanične senescencije i njihov utjecaj na malignost glioma. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se bolje razumjeli mehanizmi kojima ovi geni utječu na senescenciju i klinički tijek glioma.

Ključne riječi: stanična senescencija, gliom, cBioPortal, SASP, *in silico* analiza

Summary

Genes Involved in Glioma Cellular Senescence

Jan Težak

Introduction: Cellular senescence is a process in which cells permanently cease to divide, playing a key role in controlling tumor growth and response to therapy. Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system, often with a poor prognosis due to aggressive clinical behavior and frequent recurrence after therapy. Increasing research indicates the significance of senescent glioma cells in shaping the clinical profile of these tumors. The aim of this study was to analyze the frequency and type of alterations in genes involved in cellular senescence in different types of gliomas.

Materials and Methods: We analyzed 3425 glioma samples using data from the cBioPortal for Cancer Genomics. We selected and studied the 10 most frequently altered genes related to senescence: *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *ATM*, *TNFRSF1A*, *IGFBP7*, *TNFRSF11B*, *TP53BP1*, *HGF* and *SERPINE1*. Data analysis included determining the frequency of mutations, amplifications, deletions, and multiple alterations in each type of glioma.

Results: The results showed that *TP53*, *CDKN2A*, and *EGFR* were the most frequently altered genes. *CDKN2A*, *EGFR*, *ATM*, *IGFBP7*, *TP53BP1*, and *HGF* had a higher percentage of alterations in high-grade gliomas (HGG), while *TP53*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF11B* and *SERPINE1* were more frequently altered in low-grade gliomas (LGG). A statistically significant difference in alterations between the HGG and LGG groups was found for *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *IGFBP7* and *TNFRSF11B*.

Conclusion: We have shown that the studied genes are more frequently altered in high-grade gliomas. The patterns of alterations correspond to the existing knowledge in the literature. The results highlight the importance of specific gene changes in cellular senescence and their association to glioma grade. Further research is needed to better understand the mechanisms by which these genes influence senescence and the clinical course of gliomas.

Key Words: cellular senescence, glioma, cBioPortal, SASP, *in silico* analysis

Uvod

Gliomi

Gliomi su tumori porijeklom iz glijalnih stanica (1) te su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava (SŽS-a)(2). Gliomi čine oko 30% svih tumora središnjeg živčanog sustava, ali kad govorimo o malignim tumorima, gliomi čine čak 80 % (3). Iako incidencija primarnih tumora SŽS-a čini svega 2% incidencije svih primarnih tumora, primarni tumori SŽS-a odgovorni su za 7% smrti od tumora u osoba mlađih od 70 godina (4). Za kliničku praksu je, na temelju biologije samog tumora, uobičajena podjela na gliome niskog stupnja malignosti (engl. *low grade glioma*, LGG), i gliome visokog stupnja malignosti (engl. *high grade glioma*, HGG) (5,6).

Klasifikacija

Kad govorimo o gliomima, zapravo govorimo o više različitih vrsta tumora koje povezuje određena histološka sličnost s glijalnim stanicama. Iako se radi o stanicama glijalnog porijekla, još uvijek ne postoji konsenzus o tome iz kojih točno ishodišnih stanica nastaju tumorske stanice glioma – normalnih glijalnih stanica, prekursorskih glijalnih stanica, matičnih stanica, itd. (7)

Ovisno o specifičnoj patohistologiji, Klasifikacija tumora središnjeg živčanog sustava Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2007. godine kao glavne skupine glioma navodi: astrocitome, oligodendrogliome, oligoastrocitome, ependimome, i neuronalne i miješane neuronalno-glijalne tumore (8). Unutar tih skupina na temelju stanične morfologije, dodatno se ovisno o raznim citološkim i histološkim parametrima malignosti (npr. stanična atipija, mitotska aktivnost, vaskularizacija) određuje gradus, te se određuje o kojem se tumoru radi (9). Treba naglasiti da su klasifikacije obnavljane, revidirane i ažurirane s novim spoznajama u više izdanja.

No, u praksi su još od prve Klasifikacije iz 1979. godine uočeni problemi s ovakvom, patohistološkom podijelom, jer ostavlja prostora za veliku varijabilnost između promatrača-dijagnostičara. Patohistološka klasifikacija koja se oslanja na individualnu vizualnu procjenu

mikroskopom jako ovisi o iskustvu promatrača, i čini metodu razmjerno subjektivnom (10). Posljedica toga bile su velike razlike u dijagnostici, terapiji, i prognozi u liječenju ovih tumora.

U međuvremenu, znanstveni napredak koji se dogodio nakon klasifikacije iz 2007. godine promjenio je paradigmu sistematizacije tumora središnjeg živčanog sustava zbog spoznaja o važnosti specifičnih genetskih i molekularnih karakteristika tumora, uz već uvažena patohistološka obilježja (2).

Otkriće važnosti određenih genotipskih karakteristika, kao što su na primjer mutacija izocitrat-dehidrogenaze (IDH) ili kodelecija kromosomskih krakova 1p/19q, omogućilo je bolje kliničke ishode, primarno zbog veće preciznosti dijagnostike, i omogućavanja razvoja ciljane terapije (11). Iz tog je razloga 2016. Svjetska zdravstvena organizacija objavila novu Klasifikaciju tumora središnjeg živčanog sustava koja se po prvi put temeljila na kombinaciji genotipskih, kao i fenotipskih karakteristika tumora. S daljnjim znanstvenim napretkom, sistematizacija je dodatno produbljena te SZO 2021. godine objavljuje novu, petu po redu, Klasifikaciju tumora središnjeg živčanog sustava, koja ima za cilj ažurirati i pojednostaviti prethodnu iz 2016. (12)

Prema toj je klasifikaciji, koja je još uvijek na snazi, osnovna podjela glioma odrasle dobi na: difuzne gliome (astrocitome s IDH mutacijom (gradus 2, 3, ili 4), oligodendrogliome s IDH-mutacijom i 1p/19q kodelecijom (gradus 2 ili 3), i glioblastome (GBM) IDH divljeg tipa (gradus 4)), i ograničene astrocitne gliome unutar kojih su svrstani pilocitični astrocitom i drugi manje učestali tipovi (13). U ovom radu analiziramo gliome podijeljene prema njihovom patohistološkom tipu, pritom se vodeći najnovijom klasifikacijom iz 2021. godine te uspoređujemo tumore podijeljene u skupine niskog (LGG) i visokog (HGG) stupnja malignosti.

Tablica 1. Usporedba histologije glioma, podjele prema klasifikacijama WHO-a iz 2016. i 2021. godine, te pridruženi gradusi.

Izrađeno prema Huang LE. *Impact of CDKN2A/B Homozygous Deletion on the Prognosis and Biology of IDH-Mutant Glioma*. *Biomedicine*. 2022 Jan 24;10(2):246.

Rad je dostupan na poveznici: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8869746/>.

Tablica je izmijenjena na temelju CC 4.0 licence dostupne na <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Histologija	SZO 2016.	Gradus 2016.	SZO 2021.	Gradus 2021.
Oligodendrogliom	Oligodendrogliom, IDH-mutant i 1p/19q kodeletiran	SZO gradus II	Oligodendrogliom, IDH-mutant i 1p/19q kodeletiran	SZO gradus 2
Anaplastični oligodendrogliom	Anaplastični oligodendrogliom, IDH-mutant i 1p/19q kodeletiran	SZO gradus III	Oligodendrogliom, IDH-mutant i 1p/19q kodeletiran	SZO gradus 3
Difuzni astroцитom	Difuzni astroцитom, IDH-divlji tip ili IDH-mutant	SZO gradus II	Astroцитom, IDH-mutant	SZO gradus 2
Anaplastični astroцитom	Anaplastični astroцитom, IDH-divlji tip ili IDH-mutant	SZO gradus III	Astroцитom, IDH-mutant	SZO gradus 3
Glioblastom	Glioblastom, IDH-divlji tip ili IDH-mutant	SZO gradus IV	Glioblastom, IDH-divlji tip	SZO gradus 4
Astroцитom			Astroцитom, IDH-mutant i CDKN2A/B homozigotna delecija	SZO gradus 4
Astroцитom			Glioblastom, IDH-divlji tip & TERT promotor mutacija, EGFR amplifikacija, ili gubitak/dobitak kromosoma 7/10	SZO gradus 4

Klinička slika

Pacijenti s primarnim tumorima mozga mogu imati fokalne ili generalizirane simptome, ovisno o brzini rasta i lokaciji tumora. Tumori se ponekad otkriju i slučajno, prilikom snimanja mozga iz drugih razloga.

Opći simptomi tumora mozga uključuju epileptičke napadaje (kod 50-80% pacijenata)(14), glavobolje (kod 30%) (15), i simptome povećanog intrakranijalnog tlaka kao što su noćne glavobolje, jutarnja mučnina, povraćanje, pospanost, zamućen vid i dvostruka slika (15).

Tumori u određenim dijelovima mozga uzrokuju specifičnije simptome. Na primjer, tumori u frontalnom režnju mogu uzrokovati slabost ili probleme s govorom; u parijetalnom režnju utrnulost ili prostornu dezorijentaciju; a tumori u optičkim putevima mogu uzrokovati probleme s vidom. Tumori u prefrontalnom ili temporalnom režnju te žuljevitom tijelu često uzrokuju suptilnije probleme poput promjena osobnosti, poremećaja raspoloženja i kratkotrajne memorije. Infratentorijski tumori mogu izazvati kombinaciju problema s kranijalnim živcima, koordinacijom i dugim živčanim putevima (16).

Terapija

U liječenju primarnih tumora mozga neovisno o njihovom specifičnom tipu i histologiji, prvi korak je gotovo uvijek kirurška resekcija (17). Iako se do nedavno smatralo kako je maksimalna sigurna kirurška resekcija povezana s najboljim ishodom u svim slučajevima primarnih tumora mozga, recentnija istraživanja pokazuju kako ovisno o tipu tumora to nije istina, te kako neki gliomi nižih gradusa ne pokazuju bolje ishode proporcionalno opsežnosti kirurškog zahvata, te postoje naznake kako bi za neke pacijente bili primjereniji pošteniji zahvati – naravno u kombinaciji s drugim modalitetima terapije (18). Resekcijom tumora postiže se terapijski učinak zbog uklanjanja tumorske mase, ali resekcija je također i ključan korak u preciznoj dijagnostici tumora, jer omogućava detaljnu analizu izvađenog tumorskog tkiva (17).

Uz kiruršku resekciju, u liječenju primarnih tumora mozga koriste se i radioterapija i kemoterapija, a u novije vrijeme sve više i imunoterapija. Postoje razlike u specifičnim protokolima radioterapije i kemoterapije u liječenju glioma niskog stupnja, no načelno su slični

standardiziranom protokolu u terapiji glioblastoma – Stuppovom protokolu. Stuppov protokol obuhvaća: u prvom koraku kirurški zahvat (maksimalnu sigurnu resekciju, što može značiti biopsiju, *debulking*, ili parcijalnu resekciju - ovisno o anatomskoj lokaciji tumora) s ciljem što opsežnijeg uklanjanja tumorske mase; zatim radioterapiju (60 Gy u 30 frakcija) i kemoterapiju konkurentnim i adjuvantnim temozolomidom (19).

Unatoč multimodalnoj terapiji, prognoza je u velikom broju slučajeva vrlo nepovoljna. U gliomima nižeg gradusa (1 i 2), 10-godišnje preživljenje je 47%, s medijanom vremena preživljenja od 11.6 godina (20). Za gliome gradusa 3, medijan ukupnog preživljenja je 3 godine, a kod gradusa 4 samo 15 mjeseci (21). Veliki problem kod glioma, a posebice glioblastoma, je njegova tendencija da se opetovano vraća nakon terapije (22).

U razmatranju terapije kao problem se više ne prepoznaje samo efikasnost terapije, nego i sigurnost odnosno dugoročni utjecaj na kvalitetu života. Zbog bolje i objektivnije dijagnostike na temelju suvremene, molekularne klasifikacije tumora, dolazi do napretka u preživljenju pacijenata – no samim time i do veće izloženosti dugoročnim štetnim posljedicama agresivne radioterapije i kemoterapije (18). Područje koje se zato intenzivno razvija u novije vrijeme je imunoterapija. Prema Mahmoudu i suradnicima (23), samo za glioblastom je u 2022. u tijeku bilo više od 88 kliničkih studija (dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/>, koje istražuju imunoterapeutike.

No što je u stvari imunoterapija tumora? Radi se o postupcima koji za liječenje raka koriste pacijentov imunološki sustav i usmjeravaju ga da prepoznaje i uništava stanice raka. Postoji nekoliko vrsta imunoterapija, uključujući blokade imunoloških kontrolnih točaka (ICB – engl. *immune checkpoint blockades*), adoptivne stanične terapije, terapijska cjepiva, onkolitičke virusne terapije (OV – engl. *oncolytic virus*), i druge metode (24).

U imunoterapiji glioblastoma, najčešće govorimo o 4 vrste imunoterapije: ICB terapiji, terapiji s T-stanicama s kimeričnim antigenskim receptorom (CAR-T), cjepivima, i onkolitičkim virusnim terapijama (OV) (25). ICB terapije funkcioniraju tako da blokiraju imunološke kontrolne točke, kao što su npr. PD-1/PD-L1, čime uklanjaju imunosupresivni učinak tumora. Peptidna i dendritička cjepiva ciljaju tumoru-pridružene antigene (TAA) i tumor-specifične antigene (TSA)

i potiču imunski odgovor pacijenta. CAR-T stanične terapije pak ciljaju molekule na površini tumora kao što su npr. aktivna mutantna forma receptora epidermalnog faktora rasta EGFRvIII, IL13R α 2 ili HER2, aktivirajući T-stanični odgovor organizma protiv tumorskih stanica. Terapija onkolitičkim virusima je relativno nova metoda bazirana na ideji unošenja modificiranog virusa, npr. *herpes simplex* virusa, koji pokazuje specifični afinitet za ulazak i replikaciju u tumorskim stanicama u kojima onda remeti metabolizam i uništava ih, te pritom stimulira antitumorski imunološki odgovor organizma (26,27).

No, s obzirom na posebno tvrdokornu prirodu ovih tumora, i njihovu sklonost rekurenciji, unatoč agresivnoj terapiji, istraživači su usmjerili pozornost prema mehanizmima koji bi mogli objasniti tvrdokornost tumorskih stanica glioma s ciljem otkrivanja učinkovitijih modaliteta terapije. Sve brojnija otkrića u novije vrijeme upućuju na fenomen zaslužan za neučinkovitost terapije i rekurenciju glioma - staničnu senescenciju(28,29). Shodno tome, trenutno se nalazimo u trenutku kad se tek očekuje zamah razvoja terapija koje ciljaju staničnu senescenciju. Prema Wangu i suradnicima (30) s početka 2024. u tijeku su bile 34 studije koje ispituju potencijalne senoterapeutike u liječenju tumora, koje su dosegle drugu fazu ispitivanja.

Potencijalni lijekovi koji utječu na senescenciju su vrlo raznoliki; od već uvažanih lijekova za druge namjene – npr. azitromicina, do nosovosintetiziranih molekula, poput Navitoclaxa, inhibitora Bcl-2 proteina (30).

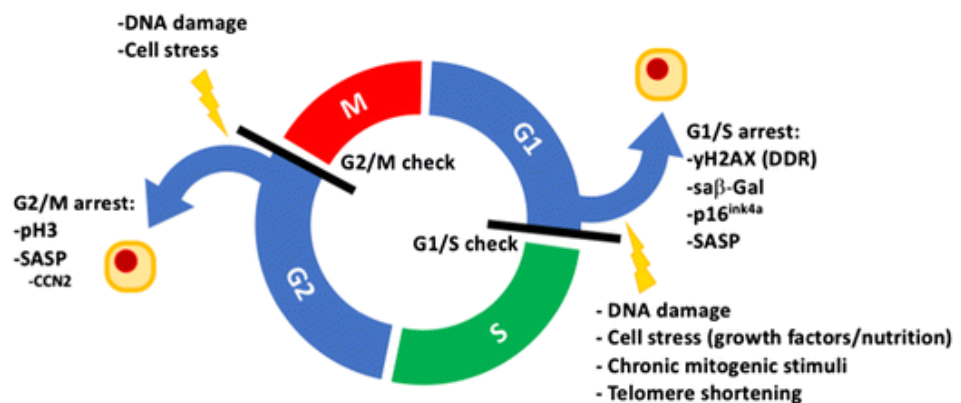
Što stanična senescencija zapravo znači u kontekstu tumora i glioma, i koja je poveznica s terapijom? Da bismo odgovorili na ta pitanja, trebamo kratko proučiti pojavu stanične senescencije.

Stanična senescencija

U svojem slavnom radu *The serial cultivation of human diploid cell strains* iz 1961., Leonard Hayflick i Paul Moorehead opisuju fenomen koji je danas postao dio popularne znanstvene svijesti – diploidne stanice fibroblasta se *in vitro* dijele ograničen broj puta, nakon čega nastavljaju živjeti, ali se više ne dijele. To stanje u koje stanica uđe nazivaju staničnom senescencijom (31). Trinaest godina kasnije, australski virolog Macfarlane Burnet koncept ograničenog broja diobi stanice naziva Hayflickovim limitom (32). S vremenom se

razumijevanje stanične senescencije sve više produbljuje, te od inicijalnog poimanja kako se radi o pojavi prisutnoj u staničnoj kulturi *in vitro*, dolazimo do shvaćanja kako je senescencija prisutna u gotovo svim tipovima stanica višestaničnih organizama, i ključna za njihovu normalnu fiziologiju i razvoj, kao i za patološke procese u njima (33,34).

Od inicijalnog otkrića do danas, istraživanja su pokazala kako senescencija ne nastupa samo kao posljedica prestanka staničnih dioba do Hayflickovog limita, što je posljedica skraćivanja telomera, nego može biti potaknuta raznim čimbenicima. Shvaćamo i kako je stanična senescencija složeni proces u kojem dolazi do ireverzibilnog aresta staničnog ciklusa, a koji se zapravo razlikuje od tkiva do tkiva, ovisno o kontekstu (35). Ne postoji standardizirana sistematizacija senescencija, te razni autori navode razne podjele. Neki autori koriste trojnu podjelu na: replikacijsku senescenciju vezanu za skraćivanje telomera, onkogenom-induciranu senescenciju, i stresom-induciranu senescenciju (SIPS – engl. *stress-induced premature senescence*) (33,36). Drugi autori kao posebne vrste senescencije navode još i terapijom-induciranu senescenciju (koju će neki autori smatrati vrstom stresom-inducirane, ali ju se može izdvojiti ponajviše zbog kliničke važnosti), senescenciju uzrokovanu mitohondrijskom disfunkcijom (miDAS – engl. *mitochondrial dysfunction-associated senescence*), i razvojnu senescenciju koja je jedan od embriogenetskih mehanizama oblikovanja organizma (37–40).



Slika 1. Stanični ciklus, faze, točke provjere i ulazak stanice u senescenciju.

Preuzeto iz Valentijn, F.A., Falke, L.L., Nguyen, T.Q. *et al.* Cellular senescence in the aging and diseased kidney. *J. Cell Commun. Signal.* 12, 69–82 (2018.) (41).

Rad je dostupan na <https://link.springer.com/article/10.1007/s12079-017-0434-2>.

Slika je preuzeta na temelju dopuštenja prema CC 4.0 licenci dostupnoj na poveznici:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Više riječi o klasifikaciji senescencije će biti kasnije, a prije razmatranja specifičnosti samih procesa koji se ovdje odvijaju, ilustrirajmo u slijedećem odjeljku kakva je to uopće senescentna stanica.

Senescentna stanica je živa, morfološki i metabolički promijenjena, te iako zaustavljenog staničnog ciklusa, metabolički aktivna. Neke od morfoloških i strukturalnih karakteristika senescentnih stanica uključuju povećanu, spljoštenu, multinukleiranu stanicu s povećanim vakuolama, izmijenjen sastav stanične membrane i znatno povećanje jezgre. Metaboličke promjene uključuju stabilno i u načelu nepovratno zaustavljanje proliferacije koje ne reagira na mitogene podražaje (33) (iako novija istraživanja pokazuju kako postoje određeni uvjeti u kojima se senescentne stanice mogu ponovno početi dijeliti) (42), održanu ali promijenjenu metaboličku aktivnost, i generalnu otpornost na apoptozu (43). Te promjene rezultiraju nastankom stanice imunogenog fenotipa – dolazi do ekspresije raznih imunogenih liganada na samoj stanici, pojačane aktivacije puteva staničnog preživljavanja, i izlučivanja pro-inflamatornog sekretoma (44). Cijeli ovaj pro-inflamatorni fenotip senescentne stanice naziva se sekretornim fenotipom povezanim sa senescencijom (SASP – engl. *senescence-associated secretory phenotype*) (45).

SASP je ključni posrednik parakrinog učinka senescentnih stanica na tumorski mikrookoliš, kao i raznih drugih lokalnih i sistemskih bioloških učinaka (46).

SASP ima posebno važnu ulogu u senescenciji tumorskih stanica, te se u ovom radu velikim dijelom bavimo upravo molekularnim biljezima SASP-a, o čemu će više riječi biti malo kasnije.

Ukratko, senescentna stanica je stanica drugačije membrane, velike jezgre, koja se načelno više neće dijeliti, izmijenjenog je metabolizma i eksprimira specifične molekule, kako unutar stanice, tako i izvan stanice, stvarajući pro-upalni sekretom.

Ovdje se logično nameće pitanje – koja je razlika između senescentne stanice i terminalno diferencirane stanice, kao npr. neurona? Jesu li i neuroni senescentne stanice?

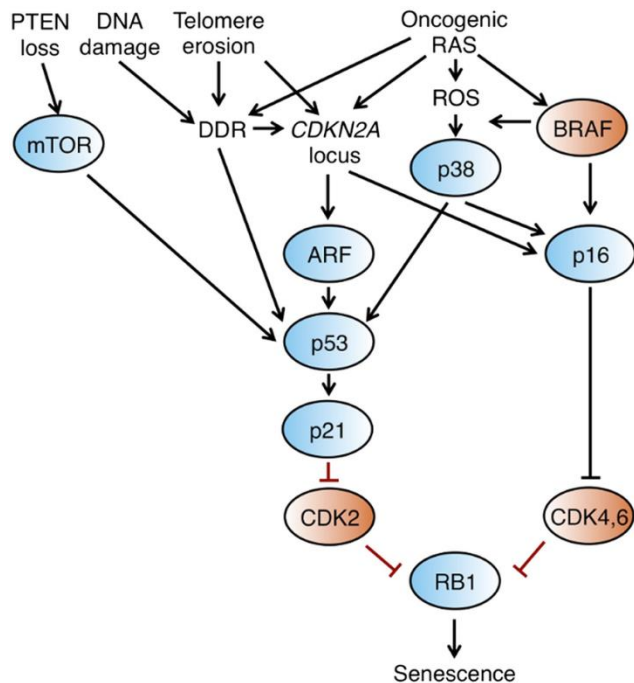
Trenutno shvaćanje je da nisu – jer razliku velikim dijelom baziramo na drugačijem putu nastanka. Naime terminalno diferencirane stanice su nastale iz prekursorske, manje diferencirane stanice, a senescentne stanice su stanice čiji je stupanj diferencijacije cijelim putem isti, samo se

metabolizam izmjenio (47). Također, otkriveni su i specifični signalni putevi uključeni u jedan ili u drugi proces. Uključenost različitih signalnih puteva također služi kao dokaz različitosti između senescentnih i terminalno diferenciranih stanica koje se više ne dijele. Tako su ključni signalni putevi u terminalnoj diferencijaciji Notch, Hedgehog, i Wnt (37,48), dok su u indukciji senescencije ključni p53/p21 i p16INK4A/pRB (33,49).

Nastanak senescencije

Već smo ranije naglasili da senescencija nije samo posljedica dosega maksimalnog broja staničnih dioba, već može biti potaknuta i drugim čimbenicima. Replikacijskoj senescenciji, onkogenom-, stresom-, ili terapijom-induciranoj senescenciji, i razvojnoj senescenciji (37,39), svima je zajedničko to da rezultiraju stanicom zaustavljenog ciklusa, promijenjene morfologije i metabolizma, koja izražava specifične biljege i izlučuje specifični sekretom (SASP). Iako, osim u načinu nastanka, postoje razlike u fenotipu stanica ovisno o kojem se tipu senescencije radi, za potrebe ovog rada ćemo se zadržati na proučavanju osnovnog, zajedničkog procesa razvoja stanične senescencije.

Pojednostavljeno gledano, u nastupu senescencije određeni okidač trajno zaustavlja stanični ciklus, i inducira stvaranje senescentnog fenotipa. Detaljni pregled svih načina na koji se to može dogoditi je tema mnogih opsežnih radova, i kontinuiranog istraživanja, no generalno se svodi na inhibiciju kompleksa kinaza ovisnih o ciklinu (CDK – engl. *cyclin-dependent kinases*) i ciklina, te posljedično zaustavljanje staničnog ciklusa. Putevi koji su u tome najzaslužniji su p53/p21WAF1/CIP1 i p16INK4A/pRB (49). Štoviše, povećana ekspresija bilo kojeg od ova četiri čimbenika (p53, pRB, p16INK4A, p21WAF1/CIP1) može inducirati senescenciju (33,50).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz glavnih puteva nastanka stanične senescencije.

Preuzeto iz Lujambio A. *To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question.* Bioessays. 2016 Jul;38 Suppl 1:S56-64 (51).

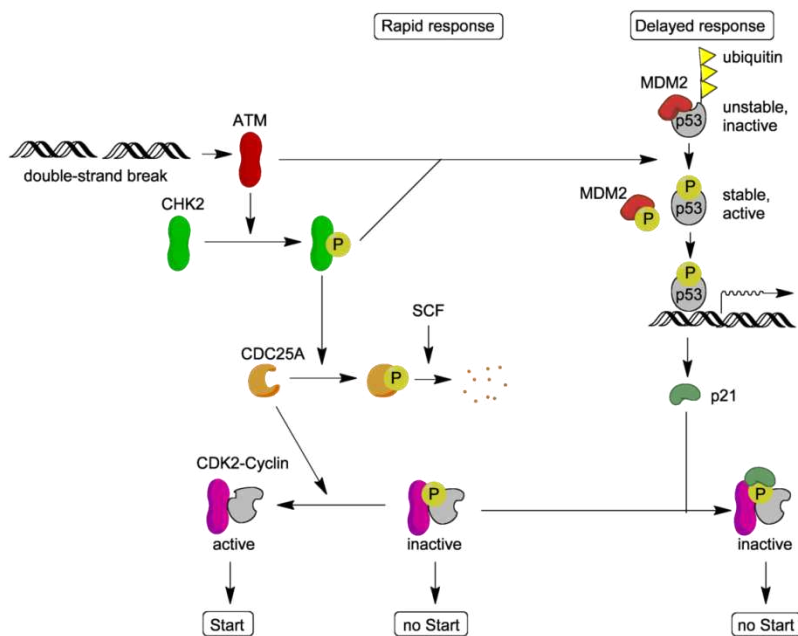
Rad je dostupan na sljedećoj poveznici: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.201670910>.

Slika je preuzeta na temelju dopuštenja prema CC 4.0 licenci dostupnoj na poveznici:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Kako dolazi do aktivacije ovih čimbenika? U replikacijskoj senescenciji, telomere postaju prekratke, odnosno stanica dolazi do svojeg Hayflickovog limita, što aktivira stanični odgovor na oštećenje DNA (DDR – engl. *DNA-damage response*), konkretno putem dvostrukog prekida uzvojnice (DSB – engl. *Double-strand break*). ATM kinaza prepoznaje ovo oštećenje i aktivira put p53/p21, tako što fosforilira protein p53, stabilizirajući ga i povećavajući njegovu koncentraciju u stanici. Povećana razina p53 potom inducira ekspresiju gena p21, koji djeluje kao inhibitor ciklin-ovisnih kinaza CDK2, CDK4 i CDK6. Inhibicija ovih kinaza zaustavlja stanični ciklus u fazi G1, sprečavajući daljnju diobu stanica i time smanjujući rizik od potencijalne štete uzrokovane nestabilnošću genoma. Postoji još načina na koje ATM kinaza zaustavlja stanični ciklus, kao npr. putem razgradnje CDC25a (33,52).

Prikazi ovih puteva vidljivi su na slikama 2 i 3.



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz zaustavljanja staničnog ciklusa aktivacijom ATM kinaze uslijed dvostrukog loma uzvojnice DNA. Autor: Cellular Biochemistry II (Wikipedia korisnik).

Preuzeto s: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATM_target_proteins_\(new\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATM_target_proteins_(new).png).

Slika je preuzeta na temelju CC 3.0 licence dostupne na poveznici: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>.

U stresom-induciranoj senescenciji, može doći do direktnog oštećenja uzvojnice DNA koje po maloprije opisanom principu aktivira ATM/ATR put, te nizvodno p53/p21, što dovodi do inhibicije CDK2/4/6. Iako je ovaj put prevalentan u slučaju genotoksičnog stresa, razni drugi stresori, poput raznih lijekova, također djeluju i preko aktivacije INK4/ARF lokusa, što za posljedicu ima ekspresiju proteina p16, koji inhibira CDK4 i 6, te ekspresiju proteina ARF, koji inhibira MDM2. Kako je MDM2 inhibitor p53, njegova inhibicija indirektno aktivira p53 koji zatim aktivira p21, inhibitor CDK2 (53,54).

Kad govorimo o senescenciji uzrokovanoj disfunkcijom mitohondrija (miDAS), do aktivacije inhibitora staničnog ciklusa dolazi preko 2 ključna mehanizma – nastankom reaktivnih vrsta kisika (ROS – engl. *Reactive oxygen species*), i aktivacijom AMPK zbog niskog omjera NAD⁺/NADH i manjka ATP-a u stanici. Reaktivni kisikovi spojevi uzrokuju oštećenje DNA nakon kojeg slijedi već opisan proces aktivacije p53/p21 puta, a AMPK također, izravno, aktivira p53 (40).

U onkogenom-induciranoj senescenciji, mutirani onkogeni preko Ras-GTP-aza aktiviraju složeni put PI3K/AKT/mTOR, koji putem efektor p38MAPK i mTOR aktiviraju p53, i p16, djelujući i na CDK2, CDK4 i CDK6 (33,55).

Jednom kad opisani putevi rezultiraju inhibicijom CDK, izostaje fosforilacija proteina pRb, te takav hipofosforilirani pRb veže i inhibira transkripcijski čimbenik E2F, čime onemogućava progresiju staničnog ciklusa (56).

No ovdje se opet postavlja pitanje – zašto ovaj arest staničnog ciklusa odvodi u senescenciju, a ne u apoptozu, ili reverzibilni arest?

Najjednostavnije rečeno to je zbog specifičnog obrasca aktivacije opisanih puteva, ali i mnogih drugih puteva s kojima postoji interakcija. Još uvijek ne postoji jasna formula koja opisuje u kojim će se točno slučajevima i zašto dogoditi senescencija, u kojima apoptoza, a u kojima reverzibilno zaustavljanje staničnog ciklusa. Također ti procesi nisu prostorno i vremenski strogo odvojeni – u tumorima istovremeno možemo uočiti i apoptotične, i senescentne stanice, i proliferirajuće maligne stanice, itd. No istraživanja pokazuju kako ranije navedeni podražaji – mutacije onkogene, određeni lijekovi, disfunkcija mitohondrija, i drugi – ovisno o kontekstu – opsegu oštećenja, prisutnosti određenih signala, te vrsti stanica – dovode do aktivacije signalnih puteva na takav način da induciraju senescenciju. Kroz specifičnu aktivnost opisanih puteva, dolazi do daljnjih promjena koji usmjeravaju senescentnu sudbinu stanice. Tako se mijenja ekspresija gena regulatora staničnog ciklusa, samih transkripcijskih čimbenika, i tumor-supresorskih proteina koji su senescenciju i inducirali. Treba naglasiti da veliku ulogu u senescenciji igraju i specifične epigenetske promjene koje nazivamo specifičnim heterokromatinskim fokusima povezanim sa senescencijom (SAHF – engl. *senescence-associated heterochromatin foci*) (57).

Sekretorni fenotip vezan uz senescenciju, SASP

Nakon što smo pojednostavljeno opisali što je senescencija i kako nastaje, te smo opisali senescentnu stanicu, nužno je objasniti već spomenuti sekretorni fenotip vezan uz senescenciju – SASP. Naime, većinu svojih pozitivnih i negativnih učinaka u tkivima, i, što je od našeg posebnog interesa u ovom radu, tumorima, senescentne stanice postiže upravo putem SASP-a.

Sekretom senescentnih stanica obuhvaća mješavinu raznih molekula koje mogu utjecati na obližnje ne-senescentne stanice (58). Glavne skupine tih molekula su: proupalni citokini, kemokini, čimbenici rasta, proteaze, bioaktivni lipidi, komponente izvanstaničnog matriksa, i matriks metaloproteinaze (33,58,59). Iako su nam poznate brojne sastavnice SASP-a, i dalje ne postoji konsenzus oko njihovog specifičnog, jedinstvenog popisa i opisa, jer se od tkiva do tkiva donekle razlikuju, a također ovise i o jačini signala indukcije senescencije, trajanju senescencije, vrsti stanice, okolini, i sl.(60) Neki od ključnih čimbenika u SASP-u su proupalni citokini ovisni o NF- κ B – npr. IL-6 i IL-8; nadalje IGFBP3, IGFBP4, i IGFBP7 su prepoznati kao ključni parakrini induktori daljnje senescencije (61,62). U Tablici 1 navedeni su biljezi fenotipa SASP, kao i ključni regulatori staničnog ciklusa uključeni u proces senescencije.

Tablica 2. Biljezi sekretornog fenotipa - SASP uključeni u staničnu senescenciju.

Napravljeno prema podacima Kumari i Jat (2021.) i Coppe i sur. (2010.) (33,59).

Regulacija staničnog ciklusa	Odgovor na oštećenje DNA i popravak	Upalni odgovor i citokini
CDKN1A, CDKN2A	ATM, TP53, CHEK2, PPP1R12A	IL6, IL7, CXCL8, IL1B, IL13, IL15, CXCL1, CCL13, CCL3, CCL20, CCL16, CCL11, CCL24, CCL26, CCL25, CXCL5, CCL1, CXCL11, TGFB1, TGFB2, TGFB3, CSF2, CSF3, IFNG, CXCL13, MIF, AREG, NRG1
Faktori rasta	Proteini vezani za inzulinu sličan faktor rasta	Matrične metaloproteinaze
EGF, FGF2, HGF, FGF7, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, PGF, ANG, KITLG, CXCL12, PIGF, NGF	IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP6, IGFBP7	MMP1, MMP3, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14
Inhibitori metaloproteinaza tkiva	Inhibitori serinske proteaze	Aktivatori i inhibitori plazminogena
TIMP1, TIMP2	SERPINE1, SERPINB2	PLAT, PLAU, PLAU
Katepsini	Molekule međustanične adhezije	Receptori faktora nekroze tumora
CTSB	ICAM1, ICAM3	TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10C
Transkripcijski faktori i regulatorni proteini	Ostali receptori i proteini	
BHLHE40, MECP2	SA β G, FAS, IL6ST, EGFR, FN1, HMGA1, HMGA2, CBX5, CBX1, CBX3, LMNB1	

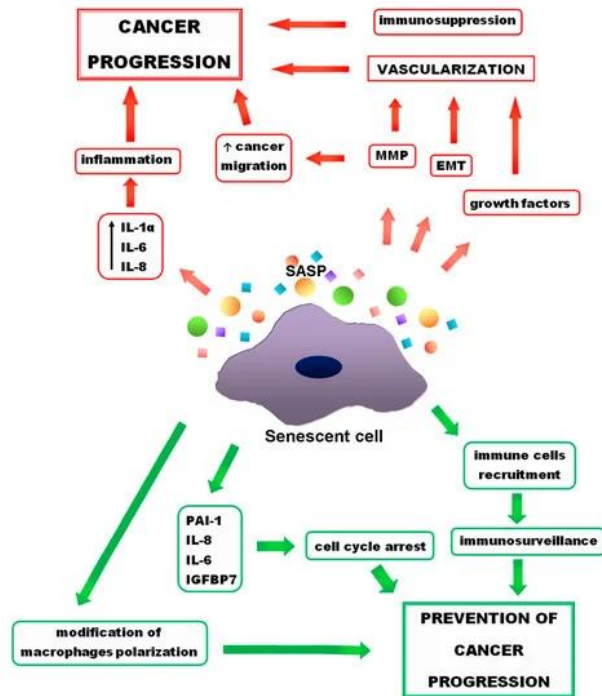
Uloga senescencije

Senescencija je vrlo šarolika pojava s brojnim pozitivnim, ali i negativnim učincima. Iz opisanih procesa koji potiču senescenciju, razvidna je velika povezanost sa supresijom tumora i popravkom staničnih oštećenja. Ključni putevi indukcije senescencije su upravo najvažniji tumor-supresorski putevi p53 i pRb. Stoga postaje jasna glavna uloga senescencije – zaustavljanje diobe promijenjenih, tumorskih stanica. Osim uloge u zaustavljanju tumorskog rasta, senescentne stanice također igraju ulogu i u cijeljenju i remodeliranju tkiva, angiogenezi, i embrionalnom razvoju – prvenstveno djelovanjem čimbenika SASP-a. Na primjer, molekule PDGF-AA i CCN1 su ključne za brže cijeljenje rana (63,64).

Međutim, senescentne stanice mogu uzrokovati mnoge negativne posljedice u organizmu – od kronične upale, preko starenja organizma, do paradoksalne tumorske perzistencije, progresije, invazije, i metastaziranja (59,65).

Primjerice, amfiregulin - faktor prisutan u SASP-u - pojačava rezistenciju i malignost tumorskih stanica putem EGFRsignalizacije (66). Većina kemoterapeutika specifično djeluje na mehanizme stanične diobe kako bi zaustavili proliferaciju tumorskih stanica. Sama činjenica kako se senescentne stanice ne dijele objašnjava zašto su senescentne tumorske stanice otporne na velik dio kemoterapije – te one zaostaju u tumorskom tkivu i promiču kroničnu upalu.

U svakom slučaju, senescentne stanice uvijek pokazuju ekspresiju gena supresora tumora (p53, p16INK4a, p21WAF1/Cip1) i sa senescencijom-povezane β -galaktozidaze (SA- β -gal), koji se koriste kao markeri staničnog starenja(67).



Slika 4. Prikaz oprečnih uloga senescencije u tumorima na primjeru određenih molekula SASP-a.

Preuzeto iz Piskorz, W.M.; Cechowska-Pasko, M. *Senescence of Tumor Cells in Anticancer Therapy—Beneficial and Detrimental Effects*. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 11082.(68)

Rad je dostupan na poveznici: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11082>

Slika je preuzeta na temelju CC 4.0 licence dostupne na poveznici: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Senescencija u gliomima

Sve je više saznanja o ulozi senescencije u tumorskim stanicama, te njenoj povezanosti s kliničkim ishodima i odgovorom na terapiju (69). U novije vrijeme, ove se poveznice sve više istražuju i u gliomima (70,71). Kao što je spomenuto na početku ovog rada, prognoza kod dijagnoze glioma je generalno vrlo nepovoljna, velikim dijelom zbog visoke stope relapsa tumora nakon liječenja (72). Smatra se kako je ključan čimbenik u tendenciji tumora da rekurira upravo prisutnost dormantnih, senescentnih stanica (73).

Uloga je senescentnih stanica u gliomima, kao i u drugim tumorima, vrlo složena. Naime, terapijski odgovor na konvencionalne metode liječenja glioma se bazira na uništavanju što većeg broja tumorskih stanica. Međutim, dio stanica postaje senescentan – npr. ionizirajuće zračenje ubija dio tumorskih stanica, a dio putem p21 usmjerava u senescenciju (74,75). Kratkoročna

posljedica je smanjenje tumorske mase i usporavanje tumorskog rasta, no s povećanjem mase senescentnih stanica u tumorskom mikrookolišu, zapravo se povećava rizik za relaps.

Ključni kemoterapeutik u liječenju glioma – temozolomid – djeluje tako da alkilira molekulu DNA i uzrokuje lomove uzvojnice DNA – i time osim do apoptoze dovodi i do senescencije – pogotovo u visokim dozama (76).

Učinci senescentnih stanica u tumorskom mikrookolišu mogu biti raznoliki, a sve novije spoznaje govore u prilog tome kako su pretežito negativni po klinički tijek bolesti zbog ukupnog djelovanja komponenata SASP-a (77). S jedne strane, aktivacijom upalnih signalnih puteva poput NF- κ B i STAT3, stvaraju pogodno upalno okruženje u kojem će imunski sustav napasti tumorske stanice (78). Kao što smo ranije rekli, radi se o vrlo imunogenim stanicama koje stimuliraju anti-tumorski odgovor stečenog imuniteta (79). SASP koji je bogat citokinima i kemokinima, kao npr. IL-6, IL-8, CCL-12, je pravi magnet za NK i CD8+ stanice (78).

S druge strane, u SASP-u prisutan IL-6 istovremeno potiče preživljenje tumorskih stanica (80). U SASP-u su također prisutne i metaloproteinaze matriksa (MMP) koje razgradnjom matriksa olakšavaju tumorsku invaziju, a čimbenici SASP-a također novače i mijeloidne supresorske stanice (MDSC – engl. *myeloid-derived suppressor cells*) koje stvaraju imunosupresivno okruženje (78,81).

Studija Salama i suradnika iz 2023. ističe direktnu pro-tumorsku ulogu senescentnih stanica u primarnoj gliomogenezi (82).

S vremenom sve jasnija postaje sposobnost terapijom-induciranih senescentnih stanica da „pobjegnu“ iz stanja senescencije (42). Mehanizmima koji između ostalih uključuju signalne puteve Wnt i cdk4–EZH2–AP2M1, stanica se nakon produženog perioda zaustavljenog ciklusa može ponovno vratiti u ciklus dioba (83–85).

Zbog svega navedenoga, područje istraživanja senescencije u gliomima i potencijalne terapije bazirane na senescenciji trenutno je vrlo aktualno i relevantno (84). Trenutno postoje 3 glavne vrste terapije bazirane na senescenciji koje se istražuju. Prvi, takozvani „*one-two punch*“ pristup, bazira se na inicijalnoj indukciji senescencije u tumoru, primjerice radioterapijom, temozolomidom, kvercetinom, resveratrolom, ili nekim drugim agensom, te se zatim primjene

senolitički lijekovi – lijekova koji uklanjaju senescentne stanice (70,86). Neki od važnijih lijekova koji se istražuju u ovom pristupu su BH3 mimetici, čiji je najpoznatiji predstavnik Navitoclax, koji inhibiraju anti-apoptotske Bcl2 proteine (87). Još neki od spojeva koji se istražuju su npr. klorokin, sonolizib, artezunat, i dr. (70). Prema Chaibu i suradnicima, u tijeku je više od 20 kliničkih ispitivanja senolitičkih lijekova (88).

Drugi pristup uključuje inhibitorno ciljanje proteina koji utječu na izlazak tumorskih stanica iz terapijom-inducirane senescencije. Najistaknutiji kandidati u ovoj kategoriji su potencijalni inhibitori proteina survivina, SLC1A5 transportera, ili glutamin sintetaze (70,89,90).

Treći pristup je već spomenuta imunoterapija, koja u kontekstu senescencije za cilj može imati pojedini od mnogobrojnih imunogenih markera same stanice, ili čimbenika SASP-a (79,91).

U ovom smo radu odlučili istražiti ovo zanimljivo i aktualno područje pomoću genske baze podataka cBioPortal odabirom gena za biljege SASP-a u gliomima različitih gradusa.

Hipoteza

Geni uključeni u staničnu senescenciju bit će promijenjeni u većem postotku u gliomima višeg stupnja.

Ciljevi rada

Opći cilj rada je odrediti učestalost mutacija odabranih gena uključenih u senescenciju stanica glioma ovisno o stupnju malignosti tumora.

Specifični ciljevi su:

- 1) odrediti gene uključene u staničnu senescenciju glioma s naglaskom na biljege SASP-a
- 2) pretraživanjem baze cBioPortala za genomiku tumora definirati 10 najčešće promijenjenih gena u gliomima
- 3) analizom podataka utvrditi vrste i frekvenciju promjena u pojedinim tipovima glioma
- 4) stratificirati tumore u gliome niskog i gliome visokog stupnja i pridružiti im postotke promjena.

Materijali i metode

Pristup izradi ovog rada slijedio je sljedeće korake:

- 1) ispitivanje i odabir gena uključenih u senescenciju stanica glioma, s naglaskom na komponente SASP-a
- 2) pretraživanje odabranih studija genomske analize glioma na cBioPortalu i odabir 10 najučestalije promjenjenih gena u odabranim studijama
- 3) *in silico* analiza 10 odabranih gena
- 4) analiza promjena pojedinog gena prema vrsti i stupnju tumora te vrsti mutacije
- 5) grupiranje tumora i pridruženih promjena u gliome niskog (LGG) i gliome visokog stupnja (HGG)
- 6) statistička analiza

cBioPortal

„cBioPortal for Cancer Genomics“ je, prema riječima autora, „resurs“ koji omogućuje višedimenzionalnu analizu tumora u čovjeka, time što sadrži podatke iz brojnih genomskih studija različitih tumora, te omogućava pretraživanje, odnosno (meta)analizu podataka iz svih tih studija, koristeći softverske alate koje sam portal sadrži. Portal je zapravo web-sučelje za software otvorenog koda koji je dostupan na GitHubu(92,93). Sam program, kao i portal, razvijeni su i pokrenuti u Memorial Sloan Kettering Cancer Centre (MSK), no trenutno u održavanju i razvijanju projekta sudjeluju i brojne druge institucije(93). Ideja iza portala je učiniti dosad neviđeno opsežan uzorak biološki analiziranih tumora dostupnim za daljnju analizu i proučavanje svim zainteresiranim istraživačima na svijetu.

Ukratko, portal omogućuje obradu velikih količina podataka, pružajući jednostavno i intuitivno sučelje za vizualizaciju i statističku analizu promjena u tumorima čovjeka, od razine gena do proteina. Portal omogućuje pohranu i pregled mutacija, promjena broja kopija DNA (CNA, engl. *copy number aberration*), ekspresije mRNA i mikroRNA, kao i podataka o razini proteina, fosfoproteina, metilaciji DNA te kliničkih informacija. (94–97)

Podatci su dobiveni sekvenciranjem cijelog genoma svakog uzorka.

Protokol za obradu i normalizaciju TCGA podataka temelji se na studiji Hoadley i sur(98)., a dodatna dokumentacija je javno dostupna na Firehose web stranici Instituta Broad (<https://gdac.broadinstitute.org/>).

Uzorci RNA i DNA su dobiveni iz tumorskih i susjednih normalnih tkiva koristeći prilagođeni DNA/RNA AllPrep kit (QIAGEN). Patolozi su sustavno pregledavali uzorke kako bi potvrdili histopatološku dijagnozu i sve nepravilnosti u histologiji, primjenjujući kriterije najnovijeg izdanja WHO klasifikacije tumora relevantne za svaki tip tumora. Svi nesuglasni nalazi među patolozima su ponovno pregledani, nakon čega je donesena konačna odluka.

Podaci o broju kopija gena tj. promjenama u broju kopija (CNA) su generirani na Affymetrix SNP 6.0 čipovima koristeći standardne protokole Genomske analitičke platforme Instituta Broad. CNA su razlike između broja kopija gena u tumoru i referentnog broja kopija. Normalizirane kontinuirane vrijednosti CNA su obrađene unutar cBioPortal-a koristeći algoritam za Genomsko prepoznavanje značajnih ciljeva u raku (GISTIC 2.0) (engl. *Genomic Identification of Significant Targets in Cancer*) (99).

Svi podaci cBioPortala imaju iste kliničke kriterije te jednako obrađene i normalizirane podatke, što omogućuje usporednu analizu uzoraka između različitih studija.

Podaci preuzeti iz javno dostupne baze podataka cBioPortal ne zahtijevaju etičko odobrenje. Svi pacijenti čiji su uzorci korišteni u ovoj analizi potpisali su informirani pristanak u sklopu originalnih studija.

Trenutna verzija humanog genoma koji cBioPortala koristi kao referencu je hg19/GRCh37 (100).

1) ispitivanje i odabir gena

Proučavanjem literature na temu stanične senescencije u gliomima, te na temu SASP-a, izabrali smo 88 gena prikazanih u Tablici 1 u uvodu čiju učestalost promjena planiramo utvrditi.

2) in silico analiza odabranih studija

Pretraživanje podataka na cBioPortalu započeli smo odabirom setova podataka iz 8 studija iz kojih ćemo analizirati podatke o uzorcima tumora, time stvarajući vlastitu virtualnu studiju.

Uključene studije, odnosno njihovi setovi podataka, bile su: *Glioblastoma* (CPTAC, Cell 2021), *Glioblastoma* (Columbia, Nat Med. 2019), *Glioblastoma Multiforme* (TCGA, Firehose Legacy), *Brain Lower Grade Glioma* (TCGA, Firehose Legacy), *Diffuse Glioma* (GLASS Consortium), *Diffuse Glioma* (GLASS Consortium, Nature 2019), *Glioma* (MSK, Clin Cancer Res, 2019), *IDH-mutated Diffuse Glioma* (MSK, Clin Cancer Res, 2024).

Ukupan broj uzoraka tumora iznosio je 3504, a broj pacijenata od kojih su uzorci potekli bio je 2811 – jer je od nekih pacijenata poteklo više od jednog uzorka.

Isključili smo 79 uzoraka zavedenih pod dijagnozom difuznog glioma, jer se radilo o vrlo heterogenom uzorku koji je obuhvaćao tumore vrlo različite patohistologije, ali s nedovoljno podataka potrebnih za precizniju sistematizaciju, te je konačan broj uzoraka bio 3425.

Uzorci koje smo proučavali obuhvaćali su gliome podijeljene prema njihovom patohistološkom tipu. Tipovi glioma koje smo u ovoj studiji proučavali bili su: glioblastom, gliosarkom, anaplastični astrocitom, anaplastični oligoastrocitom, anaplastični oligodendrogliom, astrocitom (niskog gradusa), difuzni astrocitom, oligodendrogliom, oligoastrocitom.

Sljedeći korak u pretraživanju bio je „upit prema genima“ (*Query by gene*), u kojem nakon odabira studija odmah usmjeravamo svoje pretraživanje prema ciljanim genima i/ili promjenama koje nas zanimaju, upisujući *query* strukturiran po *Onco-query* language sintaksi. U našem slučaju, koristili smo jednostavan *query* koji se sastojao od HUGO simbola traženih gena, te je konkretno izgledao ovako:

GLB1 CDKN1A CDKN2A BHLHE40 TNFRSF10D ATM TP53 PPP1R12A CHEK2 IL6 IL7
CXCL8 IL1B IL13 IL15 CXCL1 MECP2 CCL13 CCL3 CCL20 CCL16 CCL11 CCL24 CCL26
CCL25 CXCL5 CCL1 CXCL11 TGFB1 TGFB2 TGFB3 CSF2 CSF3 IFNG CXCL13 MIF
AREG NRG1 EGF FGF2 HGF FGF7 VEGFA VEGFB VEGFC VEGFD PGF ANG KITLG
CXCL12 PIGF NGF IGFBP2 IGFBP3 IGFBP4 IGFBP6 IGFBP7 MMP1 MMP3 MMP10
MMP12 MMP13 MMP14 TIMP1 TIMP2 SERPINE1 SERPINB2 PLAT PLAU CTSB ICAM1
ICAM3 TNFRSF11B TNFRSF1A TNFRSF1B TNFRSF10C TP53BP1 FAS PLAUR IL6ST
EGFR FN1 HMGA1 HMGA2 CBX5 CBX1 CBX3 LMNB1

Odgovor na naše postavljeno pitanje bio je presjek svih podataka o navedenim genima dostupnima iz odabranih datasetova, te smo se fokusirali na učestalost promjena svakog pojedinog gena u svakoj pojedinoj vrsti glioma.

3) odabir 10 gena s najučestalijim promjenama

Sučelje cBioPortala omogućava prikaz podataka o promjenama pretraženih gena sortiran po učestalosti, te smo između 88 izlistanih gena od interesa odabrali prvih 10 po postotku ukupnih promjena.

Geni odabrani za daljnju analizu navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. 10 najučestalije promijenjenih gena uključenih u senescenciju odabranih za daljnju analizu.

<i>TP53</i>	Tumor-supresorski gen p53
<i>CDKN2A</i>	Inhibitor ciklin-ovisne kinaze 2A (p16)
<i>EGFR</i>	Receptor za epidermalni faktora rasta
<i>ATM</i>	Mutiran u ataksiji-telangiektaziji
<i>TNFRSF1A</i>	Član 1A superobitelji receptora tumorske nekroze
<i>IGFBP7</i>	Vezni protein 7 za inzulinu sličan faktor rasta
<i>TNFRSF11B</i>	Član 11B superobitelji receptora tumorske nekroze
<i>TP53BP1</i>	Protein 1 koji veže tumorski protein 53
<i>HGF</i>	Čimbenik rasta hepatocita
<i>SERPINE1</i>	Član 1 obitelji serinskih proteaza E (PAI-1)

4) analiza promjena pojedinog gena

Sučelje Portala omogućava prikaz podataka u tabličnom i grafičkom obliku, te je vidljiv postotak promjena gena za svaku vrstu tumora u uzorku, kao i apsolutni broj promjena, te broj uzoraka

pojedinih tipa tumora, jer nisu svi geni analizirani u svim uzorcima unutar studije. Tako da valja imati na umu kako su postotci relativni s obzirom na broj uzoraka za svaki gen posebno.

Promjene koje datasetovi sadrže su: mutacija, amplifikacija, duboka delecija, te višestruke promjene. Ova podjela na prvu može djelovati zbunjujuće, no funkcionira na sljedeći način.

Mutacija se odnosi na bilo kakvu promjenu u DNA sekvenci gena koja može utjecati na njegovu funkciju. Ove promjene mogu biti: missense mutacije, nonsense mutacije, insercije/delecije (indeli), te tihe mutacije, i dr.

Amplifikacije predstavljaju povećanje broja kopija određenog gena ili regije kromosoma.

Duboke delecije odnose se na gubitak značajnog dijela gena ili cijelog gena, što rezultira odsutnošću ili smanjenom ekspresijom tog gena.

Višestruke promjene označavaju da je više od jedne vrste genetske promjene nastalo u istom genu ili genomskom području. To može uključivati kombinaciju mutacija, delecija i amplifikacija.

Za svaki smo gen odredili broj analiziranih uzoraka, postotak uzoraka s promjenom gena, te odredili vrstu promjene (mutacija, duboka delecija, amplifikacija, ili višestruke promjene). Kreirali smo tablicu sa svim podacima, i kreirali grafičke prikaze za svaki pojedini gen.

Podatci koje smo koristili u ovoj virtualnoj studiji dostupni su na sljedećoj poveznici:

<https://www.cbioportal.org/study?id=665f0e11854f636a3861576e> .

5) grupiranje tumora

Nakon analize gena u 9 različitih tipova glioma, objedinili smo podatke grupiranjem uzoraka u gliome niskog stupnja (LGG) i gliome visokog stupnja (HGG).

U gliome niskog stupnja ulaze: astroцитom, difuzni astroцитom, oligoastroцитom, i oligodendrogliom. U gliome visokog stupnja ulaze: glioblastom, gliosarkom, anaplastični astroцитom, anaplastični oligoastroцитom, anaplastični oligodendrogliom.

Potom smo tablično i grafički prikazali podatke o promijenjenosti gena posebno za LGG, i posebno za HGG.

6) statistička obrada i prikaz rezultata

Za statističku obradu smo koristili Python 3.8, i njegov `scipy.stats` library. Korišten je Hi-kvadrat test.

Za izradu tablica i grafičkih prikaza korišteni su LibreOffice ver. 7.5.4.2., Google Sheets (verzija aktualna u 05. Mjesecu 2024.), te Canva.

Rezultati

Zbirne promjene prema tipu glioma

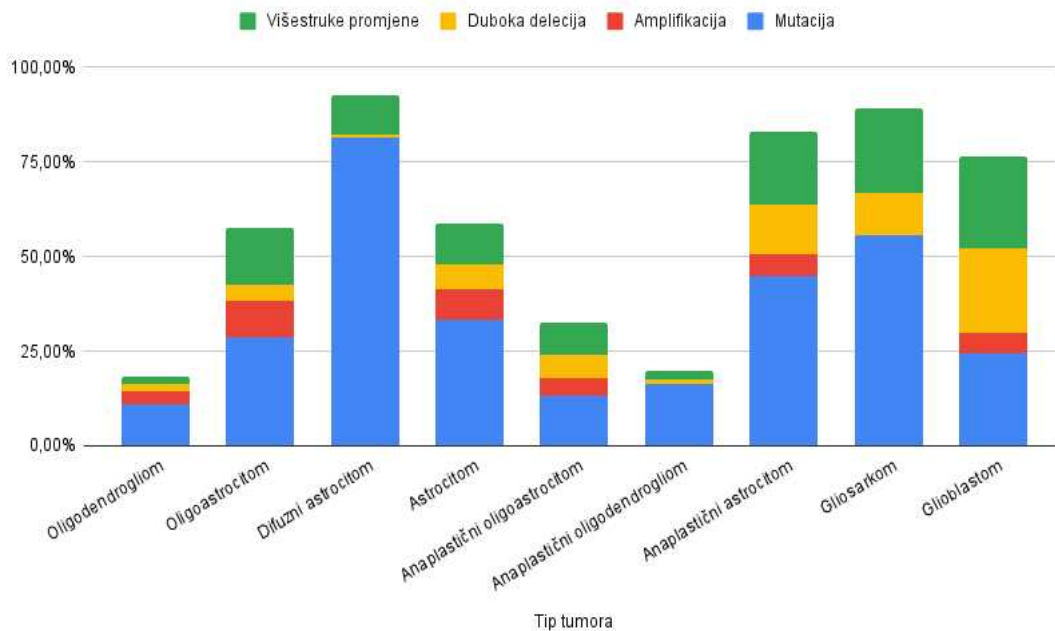
Prva analiza koju smo napravili bila je određivanje ukupnih (zbirnih) promjena svih proučavanih gena u svakom proučavanom tipu tumora. Razlikovali smo vrstu promjene – mutacije, amplifikacije, delecije, i višestruke promjene. Iz Tablice 4 možemo vidjeti ukupni postotak promjene svih 10 proučavanih gena za svaki tip tumora, kao i vrstu promjene u svakom tipu tumora. Slika 5 nudi grafički prikaz ovih istih podataka.

Iz priloženog je vidljivo kako su u sveukupnim promjenama proučavanih gena najzastupljenije mutacije – od 11,11% (35/315 slučajeva) u oligodendrogliomima, pa sve do 81,54% (212/260 slučajeva) u difuznim astrocitomima. U 7 od 9 proučavanih tipova tumora na mutacije otpada preko 50% sveukupnih promjena, no to nije slučaj u glioblastomu i anaplastičnom astrocitomu. Glioblastom je jedini tip tumora u kojem mutacije ne čine ni relativnu većinu promjena – najčešći tip promjene u glioblastomima su zapravo višestruke promjene. Najrjeđa vrste promjene sveukupno je amplifikacija – koja u gliosarkomu i difuznom astrocitomu uopće nije zabilježena, dok je najzastupljenija u uzorcima oligoastrocitoma gdje je prisutna u 9,56% uzoraka (13/136 slučajeva).

Tablica 4. Zbirne promjene svih proučavanih gena prema tipu tumora

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene	Ukupni postotak promjene
Oligodendrogliom	11,11%	3,17%	1,90%	2,22%	18,41%
Oligoastrocitom	28,68%	9,56%	4,41%	14,71%	57,35%
Difuzni astrocitom	81,54%	0,00%	0,77%	10,38%	92,69%
Astrocitom	33,33%	8,00%	6,67%	10,67%	58,67%
Anaplastični oligoastrocitom	13,25%	4,82%	6,02%	8,43%	32,53%
Anaplastični oligodendrogliom	16,28%	0,00%	1,16%	2,33%	19,77%
Anaplastični astrocitom	44,90%	5,79%	12,95%	19,28%	82,92%
Gliosarkom	55,56%	0,00%	11,11%	22,22%	88,89%
Glioblastom	24,25%	5,55%	22,31%	24,35%	76,46%

Ukupni postotak promjena svih analiziranih gena prema tipu glioma



Slika 5. Grafički prikaz zbirnih promjena svih proučavanih gena prema tipu tumora

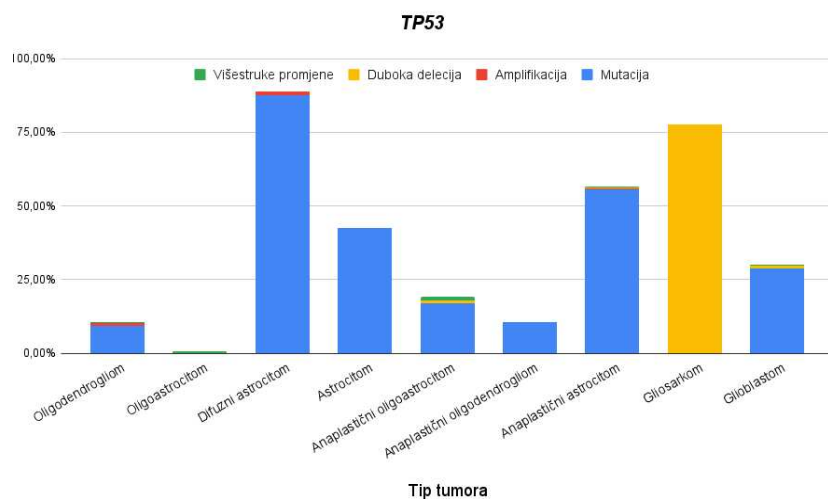
Promjene gena TP53

Rezultati analize gena *TP53* vidljivi su u Tablici 5 i na Slici 6. Kod *TP53* uočljivo je kako je uvjerljivo najčešća promjena mutacija u svim tipovima glioma – s izuzetkom oligoastrocitoma i gliosarkoma.

Čak je 87,69% uzoraka difuznog astrocitoma (228/260 slučajeva) imalo mutaciju ovog gena. U uzorku oligoastrocitoma nije zabilježena niti jedna mutacija, no zabilježeno je 0,74% uzoraka s višestrukim promjenama (1/136 slučajeva). U uzorku gliosarkoma također nisu zabilježene mutacije, ali je u 77,78% uzoraka (14/18) ovog tipa tumora zabilježena duboka delecija.

Tablica 5. Rezultati analize promjena gena *TP53*

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	9,21%	0,95%	0,00%	0,32%
Oligoastrocitom	0,00%	0,00%	0,00%	0,74%
Difuzni astrocitom	87,69%	1,15%	0,00%	0,00%
Astrocitom	42,67%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	16,87%	0,00%	1,20%	1,20%
Anaplastični oligodendrogliom	10,47%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	55,65%	0,28%	0,28%	0,28%
Gliosarkom	0,00%	0,00%	77,78%	0,00%
Glioblastom	28,83%	0,10%	0,76%	0,31%



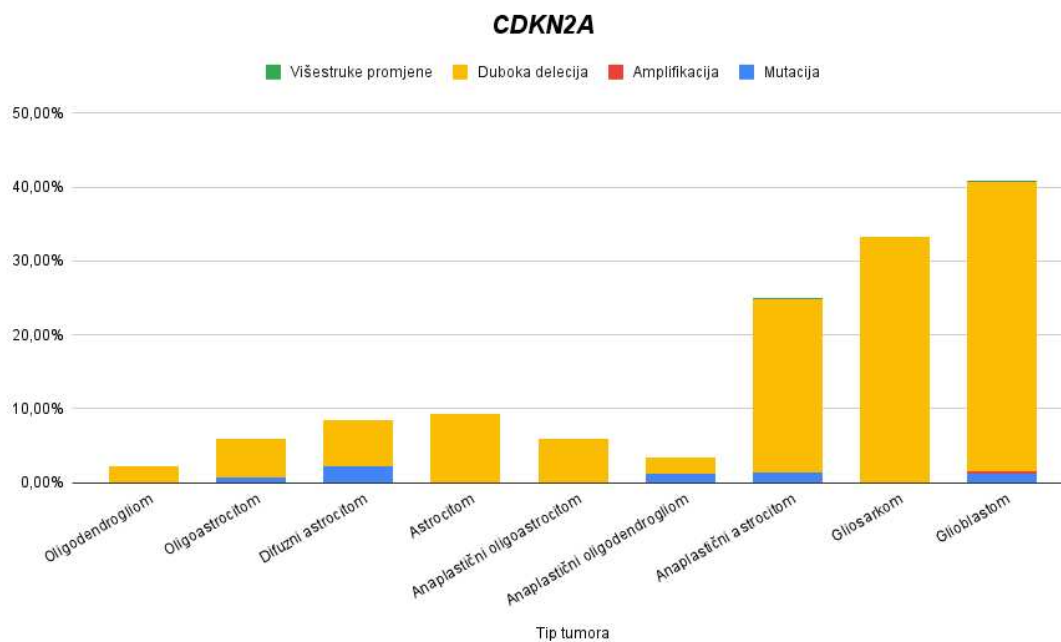
Slika 6. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *TP53*

Promjene gena *CDKN2A*

Iz tablice 6 i slike 7 vidljivo je kako je najčešći tip promjene gena *CDKN2A* u svim tipovima glioma bila duboka delecija. Delecije su bile najčešće u glioblastomu, gdje su pronađene u 39,17% uzoraka (769/1963 slučaja), a najrjeđe u oligodendrogliomu, gdje su bile zastupljene u 2,22% uzoraka (7/315 slučajeva).

Tablica 6. Rezultati analize promjena gena *CDKN2A*

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	0,00%	0,00%	2,22%	0,00%
Oligoastrocitom	0,74%	0,00%	5,15%	0,00%
Difuzni astrocitom	2,31%	0,00%	6,15%	0,00%
Astrocitom	0,00%	0,00%	9,33%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	0,00%	0,00%	6,02%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	1,16%	0,00%	2,33%	0,00%
Anaplastični astrocitom	1,38%	0,00%	23,42%	0,28%
Gliosarkom	0,00%	0,00%	33,33%	0,00%
Glioblastom	1,22%	0,31%	39,17%	0,10%



Slika 7. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *CDKN2A*

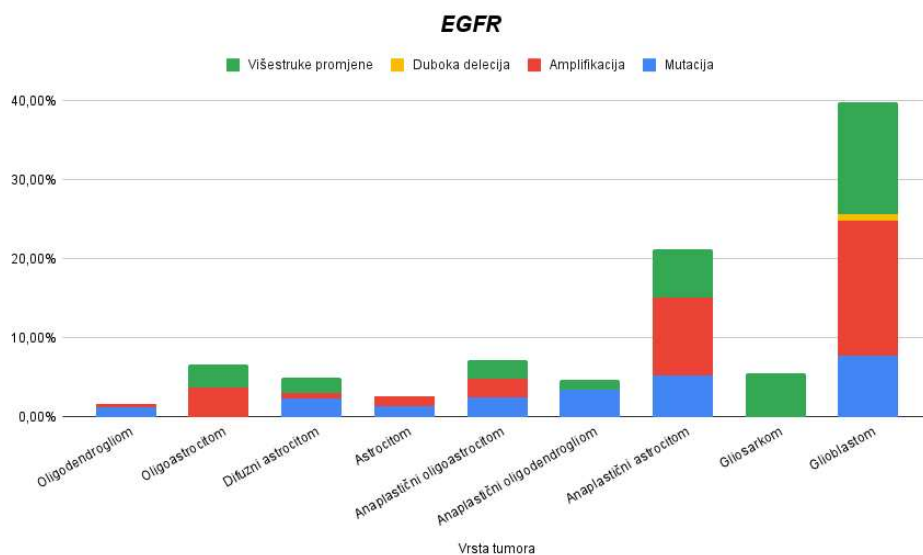
Promjene gena *EGFR*

U Tablici 7 i Slici 8 možemo vidjeti kako je profil promjena gena *EGFR* raznolik među različitim tumorima. Udio promjenjenih glioblastoma je najveći gdje je 39,79% (781/1963 bolesnika) promjenjeno, s tim da je najčešća promijena amplifikacija, prisutna u 17,12% (336/1963 slučaja).

Najmanje je promjenjenih oligodendroglioma – 1,59% (5/315 slučajeva), od čega 1,27% čine mutacije (4/315), a 0,32% čini amplifikacija (1/315).

Tablica 7. Rezultati analize promjena gena *EGFR*

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	1,27%	0,32%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,00%	3,68%	0,00%	2,94%
Difuzni astrocitom	2,31%	0,77%	0,00%	1,92%
Astrocitom	1,33%	1,33%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	2,41%	2,41%	0,00%	2,41%
Anaplastični oligodendrogliom	3,49%	0,00%	0,00%	1,16%
Anaplastični astrocitom	5,23%	9,92%	0,00%	6,06%
Gliosarkom	0,00%	0,00%	0,00%	5,56%
Glioblastom	7,69%	17,12%	0,82%	14,16%



Slika 8. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *EGFR*

Promjene gena ATM

Promjene gena *ATM*, vidljive u Tablici 8 i Slici 9, pokazuju različit obrazac ovisno o tipu tumora.

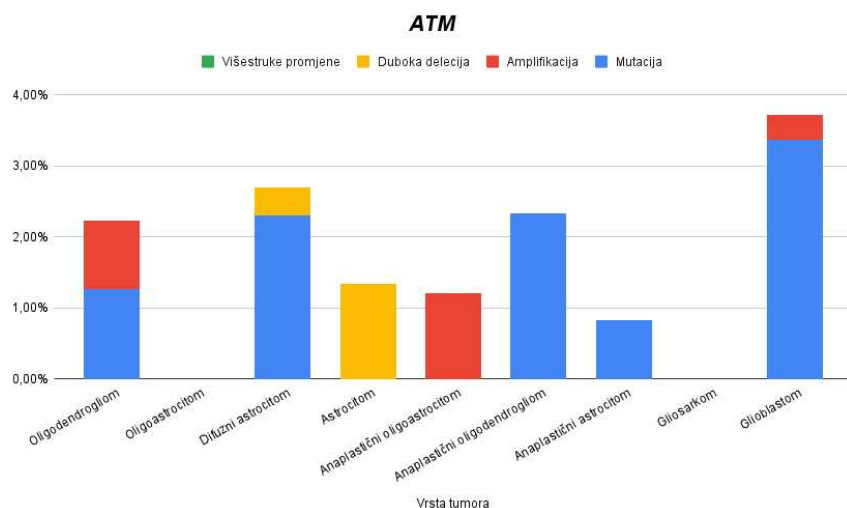
Gen je najčešće bio promjenjen u glioblastomu, u 3,72% slučajeva (73/1963), dok među uzorcima gliosarkoma i oligoastrocitoma nije zabilježena ni jedna promjena.

Prva 3 tipa tumora po postotku promjene ovog gena bili su glioblastom, difuzni astroцитom, i anaplastični oligodendrogliom, te je najčešći tip promjene u tim uzorcima bila mutacija.

Međutim, u uzorcima astrocitoma i anaplastičnog oligoastrocitoma su zabilježene isključivo amplifikacije u anaplastičnom oligoastrocitomu (1/83 slučaja), odnosno delecije u astroцитomu (1/75 slučajeva), no valja primjetiti kako se radi o samo jednom slučaju unutar svakog tipa.

Tablica 8. Rezultati analize promjena gena *ATM*

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	1,27%	0,95%	0,00%	0,00%
Oligoastroцитom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Difuzni astroцитom	2,31%	0,00%	0,38%	0,00%
Astroцитom	0,00%	0,00%	1,33%	0,00%
Anaplastični oligoastroцитom	0,00%	1,20%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	2,33%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astroцитom	0,83%	0,00%	0,00%	0,00%
Gliosarkom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glioblastom	3,36%	0,36%	0,00%	0,00%



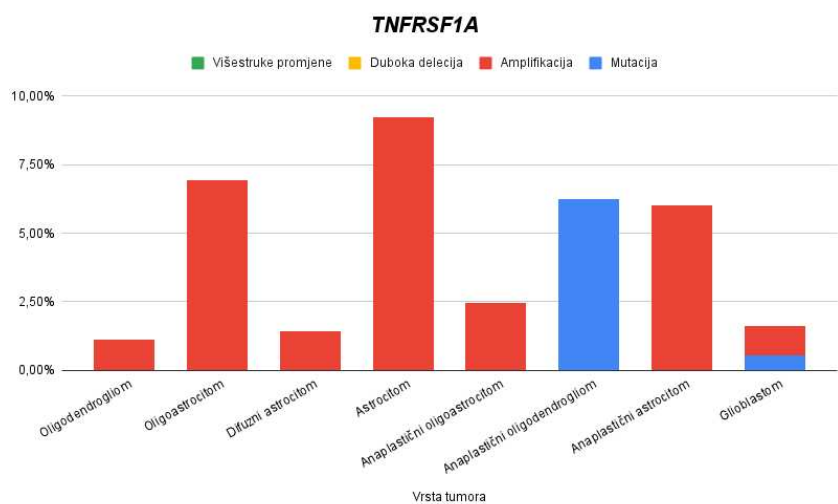
Slika 9. Grafčki prikaz rezultata analize promjena gena *ATM*

Promjene gena *TNFRSF1A*

Obrazac promjena gena *TNFRSF1A*, vidljiv u Tablici 9 i Slici 10, pokazuje kako je u 8 od 9 tipova glioma najzastupljenija promjena amplifikacija, s time da je u čak 7 tipova tumora amplifikacija jedina zabilježena vrsta promjene. U glioblastomu je zabilježeno 0,56% mutiranih uzoraka (8/1422), uz 1,05% amplificiranih (15/1422), a u anaplastičnom dendrogliomu je jedina promjena bila mutacija prisutna u 6,25% uzoraka (2/32). Najčešće promjenjeni bili su astrocitomi, s 9,23% (6/65 slučajeva).

Tablica 9. Rezultati analize gena *TNFRSF1A*

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	0,00%	1,10%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,00%	6,92%	0,00%	0,00%
Difuzni astrocitom	0,00%	1,42%	0,00%	0,00%
Astrocitom	0,00%	9,23%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	0,00%	2,47%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	6,25%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	0,00%	6,00%	0,00%	0,00%
Glioblastom	0,56%	1,05%	0,00%	0,00%



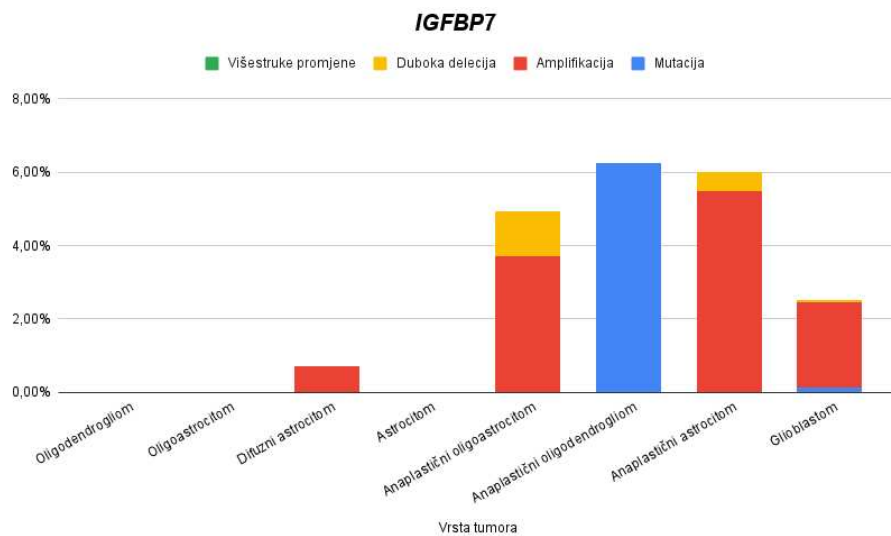
Slika 10. Grafički prikaz rezultata analize gena *TNFRSF1A*.

Promjene gena *IGFBP7*

Iz podataka o promjenama ovog gena prikazanima u Tablici 10 i Slici 11 vidljiva je značajnija zastupljenost promjena u tumorima viših gradusa. Najviše su promjenjeni anaplastični oligodendrogliomi, njih 6,25% (2/32), a radi se o mutaciji. Slijede anaplastični astrocitomi sa 6% promjenjenih uzoraka, ali se kod njih radi o amplifikaciji u 5,50% slučajeva (11/200), i deleciji u 0,50% (1/200). Promjena je još zabilježena u anaplastičnom oligoastrocitomu, glioblastomu, i difuznom astrocitomu, dok u uzorku astrocitoma, oligoastrocitoma, i oligodendroglioma promjene nisu zabilježene.

Tablica 10. Rezultati analize promjena gena *IGFBP7*.

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Difuzni astrocitom	0,00%	0,71%	0,00%	0,00%
Astrocitom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	0,00%	3,70%	1,23%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	6,25%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	0,00%	5,50%	0,50%	0,00%
Glioblastom	0,14%	2,32%	0,07%	0,00%



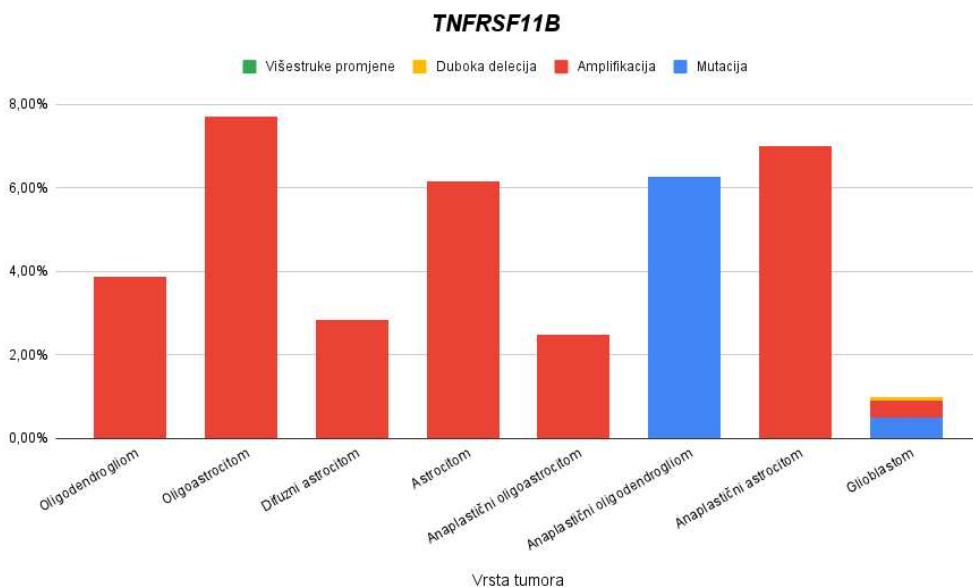
Slika 11. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *IGFBP7*.

Promjene gena *TNFRSF11B*

Rezultati analize gena *TNFRSF11B* vidljivi su u Tablici 11 i Slici 12. Promjene su pronađene u svim tipovima tumora, i najčešća vrsta promjene je amplifikacija koja je pronađena u 8 od 9 tipova tumora. Iznimka je anaplastični oligodendrogliom u kojem je promjenjeno 6,25% uzoraka (2/32), te se radi o mutacijama. Ostali tipovi tumora pokazuju isključivo amplifikaciju, osim glioblastoma u kojem je 0,49% uzorka mutirano (7/1422), 0,42% amplificirano (6/1422), te 0,07% deletirano (1/1422). Najčešće je promjenjen oligoastrocitom, sa 7,69% uzoraka s amplifikacijom (10/130 slučajeva).

Tablica 11. Rezultati analize promjena gena *TNFRSF11B*.

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	0,00%	3,87%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,00%	7,69%	0,00%	0,00%
Difuzni astrocitom	0,00%	2,84%	0,00%	0,00%
Astrocitom	0,00%	6,15%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	0,00%	2,47%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	6,25%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	0,00%	7,00%	0,00%	0,00%
Glioblastom	0,49%	0,42%	0,07%	0,00%



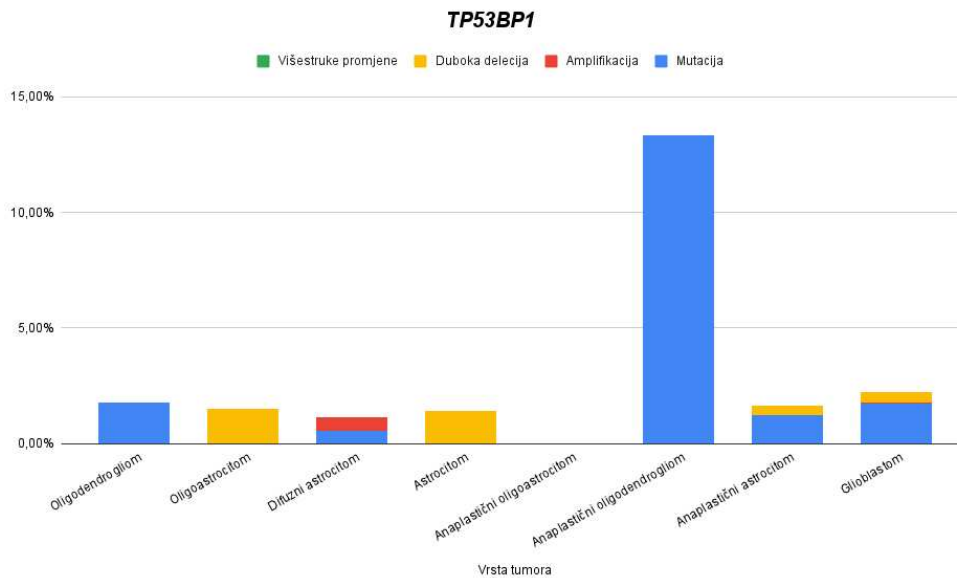
Slika 12. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *TNFRSF11B*.

Promjene gena *TP53BP1*

Promjene gena *TP53BP1*, vidljive iz Tablice 12 i Slike 13, najzastupljenije su u uzorcima anaplastičnog oligodendroglioma, gdje je 13,33% uzoraka mutirano (6/45 slučajeva). Nasuprot ovome, u uzorku astrocitoma i oligoastrocitoma zabilježene su samo delecije, i to u 1,43% slučajeva (1/70) kod astrocitoma, i 1,53% slučajeva (2/131) kod oligoastrocitoma.

Tablica 12. Rezultati analize promjena gena *TP53BP1*.

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	1,78%	0,00%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,00%	0,00%	1,53%	0,00%
Difuzni astrocitom	0,57%	0,57%	0,00%	0,00%
Astrocitom	0,00%	0,00%	1,43%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	13,33%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	1,24%	0,00%	0,41%	0,00%
Glioblastom	1,73%	0,06%	0,45%	0,00%



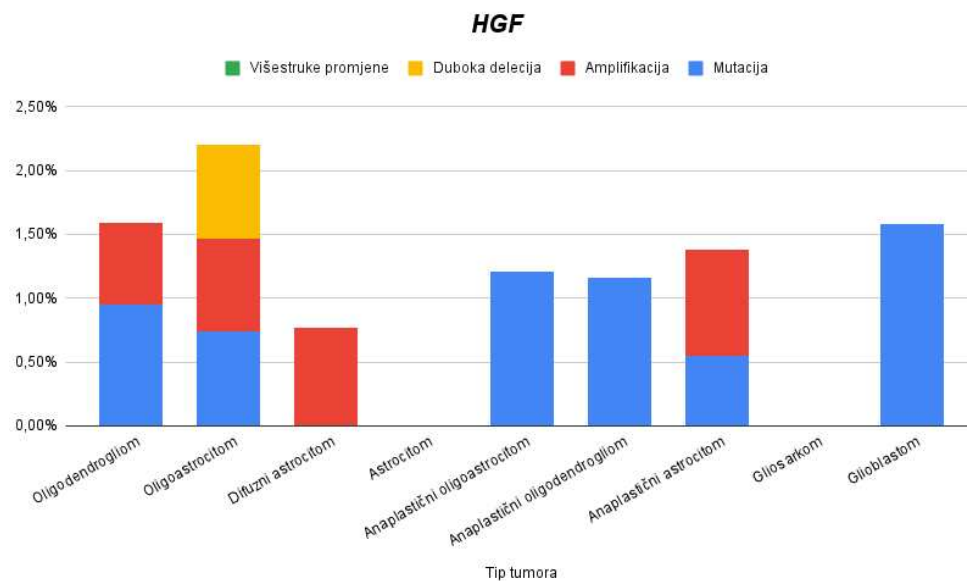
Slika 13. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *TP53BP1*.

Promjene gena *HGF*

Analizom gena *HGF* najviše promjena nalazimo kod oligoastrocitoma, gdje je 2,22% uzorka promjenjeno (3/136 slučajeva). Svaki od ta tri slučaja pokazuje različitu vrstu promjene – 1 mutaciju, 1 amplifikaciju, i 1 deleciju. U uzorku gliosarkoma i astrocitoma nisu pronađene promjene. Rezultati su prikazani u Tablici 13 i Slici 14.

Tablica 13. Rezultati analize promjena gena *HGF*.

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	0,95%	0,63%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,74%	0,74%	0,74%	0,00%
Difuzni astrocitom	0,00%	0,77%	0,00%	0,00%
Astrocitom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	1,20%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	1,16%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	0,55%	0,83%	0,00%	0,00%
Gliosarkom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glioblastom	1,58%	0,00%	0,00%	0,00%



Slika 14. Grafički prikaz rezultata analize promjena gena *HGF*.

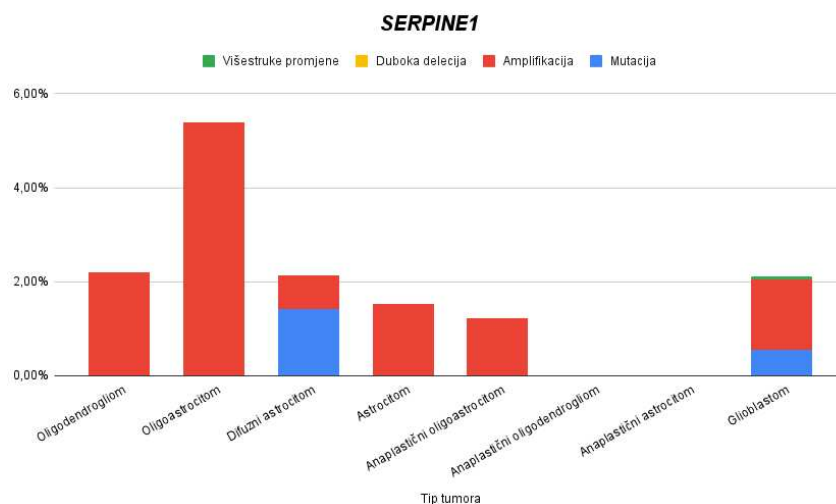
Promjene gena *SERPINE1*

Analizom promjena gena *SERPINE1* vidimo veći postotak promjene među tumorima nižih gradusa, te je najviši postotak promjenjenih uzoraka prisutan kod oligoastrocitoma – 5,38% (7/130 slučajeva). U svim je uzorcima riječ o amplifikaciji. I u ostalim tipovima tumora gdje je zabilježena promjena najčešće se radi o amplifikaciji, osim u slučaju difuznog astrocitoma, gdje od ukupno 2,13% promjenjenih slučajeva (3/141), 2 slučaja čine mutacije, a 1 slučaj amplifikaciju.

U glioblastomu je zabilježeno 0,56% mutacija (8/1422), 1,48% amplifikacija (21/1422), i 1 slučaj s višestrukim promjenama (0,07%). U anaplastičnim astroцитomima i anaplastičnim oligodendrogliomima nisu zabilježene nikakve promjene ovog gena. Rezultati su prikazani u Tablici 14 i na Slici 15.

Tablica 14. Rezultati analize promjena gena *SERPINE1*.

Tip tumora	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene
Oligodendrogliom	0,00%	2,21%	0,00%	0,00%
Oligoastrocitom	0,00%	5,38%	0,00%	0,00%
Difuzni astrocitom	1,42%	0,71%	0,00%	0,00%
Astrocitom	0,00%	1,54%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligoastrocitom	0,00%	1,23%	0,00%	0,00%
Anaplastični oligodendrogliom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Anaplastični astrocitom	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glioblastom	0,56%	1,48%	0,00%	0,07%



Slika 15. Grafčki prikaz rezultata analize promjena gena *SERPINE1*.

Zbirni rezultati prema stupnju malignosti

Zadnji korak analize uključivao je sistematiziranje podataka o promjenama svakog gena i razdioba u dvije skupine tumora – onoj visokog stupnja (HGG), i onoj niskog stupnja (LGG). Kao što je ranije navedeno, u HGG skupinu ulaze glioblastom, gliosarkom, anaplastični astrocitom, anaplastični oligodendrogliom, i anaplastični oligoastrocitom, a LGG skupinu čine astrocitom, difuzni astrocitom, oligoastrocitom, i oligodendrogliom.

Zbirni rezultati po skupinama, za svaki gen, vidljivi su u Tablici 15 i Tablici 16, te grafički na Slici 16 i Slici 17.

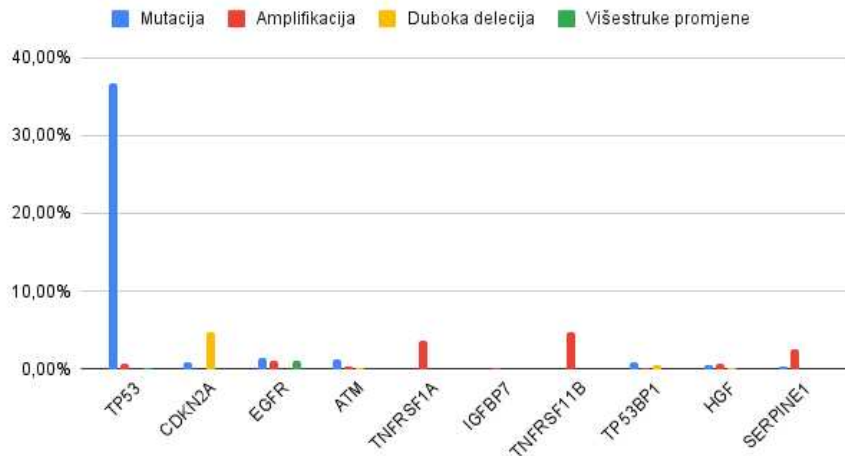
Tablica 15. Rezultati zbirne analize promjena gena u gliomima niskog stupnja.

LGG	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene	ukupno promjena
<i>TP53</i>	36,77%	0,76%	0,00%	0,25%	37,79%
<i>CDKN2A</i>	0,89%	0,00%	4,71%	0,00%	5,60%
<i>EGFR</i>	1,40%	1,15%	0,00%	1,15%	3,69%
<i>ATM</i>	1,27%	0,38%	0,25%	0,00%	1,91%
<i>TNFRSF1A</i>	0,00%	3,68%	0,00%	0,00%	3,68%
<i>IGFBP7</i>	0,00%	0,19%	0,00%	0,00%	0,19%
<i>TNFRSF11B</i>	0,00%	4,84%	0,00%	0,00%	4,84%
<i>TP53BP1</i>	0,83%	0,17%	0,50%	0,00%	1,50%
<i>HGF</i>	0,51%	0,64%	0,13%	0,00%	1,28%
<i>SERPINE1</i>	0,39%	2,51%	0,00%	0,00%	2,90%

Tablica 16. Rezultati zbirne analize promjena gena u gliomima visokog stupnja.

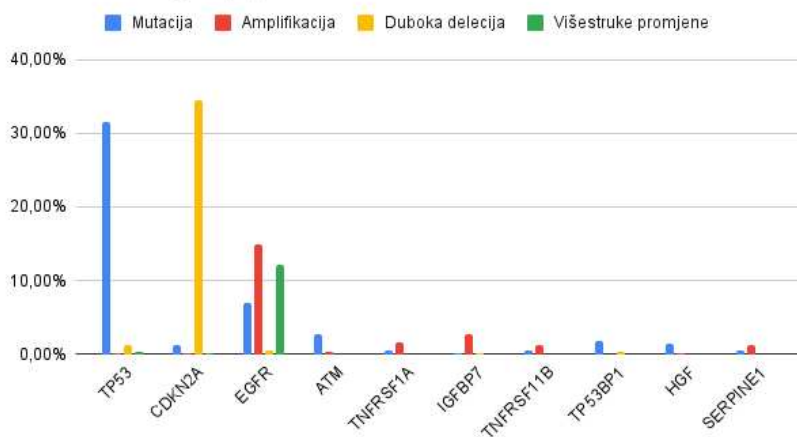
HGG	Mutacija	Amplifikacija	Duboka delecija	Višestruke promjene	ukupno promjena
<i>TP53</i>	31,48%	0,12%	1,23%	0,32%	33,15%
<i>CDKN2A</i>	1,19%	0,24%	34,50%	0,12%	36,05%
<i>EGFR</i>	6,96%	14,88%	0,64%	12,10%	34,58%
<i>ATM</i>	2,83%	0,32%	0,00%	0,00%	3,14%
<i>TNFRSF1A</i>	0,58%	1,67%	0,00%	0,00%	2,25%
<i>IGFBP7</i>	0,23%	2,71%	0,17%	0,00%	3,11%
<i>TNFRSF11B</i>	0,52%	1,27%	0,06%	0,00%	1,84%
<i>TP53BP1</i>	1,86%	0,05%	0,41%	0,00%	2,33%
<i>HGF</i>	1,39%	0,12%	0,00%	0,00%	1,51%
<i>SERPINE1</i>	0,46%	1,27%	0,00%	0,06%	1,79%

Gliomi niskog stupnja - LGG



Slika 16. Grafički prikaz rezultata zbirne analize promjena gena u gliomima niskog stupnja.

Gliomi visokog stupnja - HGG



Slika 17. Grafički prikaz rezultata zbirne analize promjena gena u gliomima visokog stupnja.

Iz priloženih tablica i prikaza, uočljivo je kako su prva tri proučavana gena – *TP53*, *CDKN2A*, te *EGFR* ujedno i najčešće promijenjeni u obje skupine, s time da su *TNFRSF1A* i *TNFRSF11B* nešto češće promijenjeni u gliomima nižeg gradusa nego što je to *EGFR*. Samo je učestalost promjena *TP53* podjednaka među skupinama - 33,15% (833/2513 slučajeva) kod HGG, odnosno

37,79% (297/786 slučajeva) kod LGG.

CDKN2A i *EGFR* su značajno češće promjenjeni u HGG skupini. Postotak uzoraka HGG s promjenjenim *CDKN2A* iznosio je 36,05% (906/2513 slučajeva), dok se kod LGG radilo o 5,60% (44/786 slučajeva). Udio promjenjenih uzoraka za *EGFR* je u HGG skupini iznosio 34,58% (869/2513 slučajeva, a u LGG skupini 3,69% (29/786 slučajeva).

Razlika u promjenama ostalih gena između LGG i HGG uzoraka je raznolika – neki su geni češće promijenjeni u gliomima nižih, a neki u gliomima viših stupnjeva.

Rezultati ukupnih promjena, kao i razlika između promjena u HGG skupini i LGG skupini vidljivi su u Tablici 17.

Tablica 17. Prikaz postotaka promjene svih gena po gradusnim skupinama, kao i njihove razlike. Za svaki je gen napravljen χ^2 test te je utvrđena p-vrijednost.

Analizirani gen	% Promjena u HGG	% Promjena u LGG	% Razlika [HGG]-[LGG]	χ^2	p-vrijednost
<i>TP53</i>	33,15	37,79	-4,64	5.516	0.0188
<i>CDKN2A</i>	36,05	5,60	+30,45	269.346	<0,00001
<i>EGFR</i>	34,58	3,69	+30,89	286.834	<0,00001
<i>ATM</i>	3,14	1,91	+1,23	2.869	0.0903
<i>TNFRSF1A</i>	2,25	3,68	-1,43	2.690	0.1010
<i>IGFBP7</i>	3,11	0,19	+2,92	13.045	0.0003
<i>TNFRSF11B</i>	1,84	4,84	-3	13.259	0.0003
<i>TP53BP1</i>	2,33	1,5	+0,83	1.140	0.2856
<i>HGF</i>	1,51	1,28	+0,23	0.091	0.7633
<i>SERPINE1</i>	1,79	2,90	-1,11	1.947	0.1629

Kao što je iz Tablice 17 vidljivo, 6 od 10 proučavanih gena bilo je češće promijenjeno u gliomima visokog gradusa. Riječ je o genima *CDKN2A*, *EGFR*, *ATM*, *IGFBP7*, *TP53BP1*, te *HGF*. Suprotno tomu, geni *TP53*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF11B*, te *SERPINE1* su bili češće promijenjeni u gliomima nižih gradusa.

Međutim, prema izračunatim p-vrijednostima, ako kao prag uzmemo $p < 0.05$, statističku značajnost razlike u promjenama možemo utvrditi samo za gene *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *IGFBP7*, i *TNFRSF11B*.

Prema tome vidimo kako su 3 od 5 analiziranih gena statistički značajno češće promijenjeni u HGG skupini (*CDKN2A*, *EGFR*, *IGFBP7*), nego u LGG skupini, dok su *TP53* i *TNFRSF11B* češće promijenjeni u LGG skupini.

Rasprava

Cilj ove studije bio je proučiti najčešće promijenjene gene važne za proces senescencije u stanicama glioma svih stupnjeva malignosti, te usporediti promjene između skupine glioma niskog, i skupine glioma visokog stupnja.

Proučavani geni iako raznoliki, svi imaju uloge u nastupu i održavanju stanične senescencije. Na uzorku od 3425 tumora pretražili smo sve gene uključene u senescenciju tumora, nakon čega smo izdvojili i analizirali 10 najčešće promijenjenih gena u gliomima. Naši rezultati pokazuju kako je većina proučavanih gena češće promijenjena u gliomima visokog gradusa, no radi interpretacije podataka potrebno je sagledati ulogu svakog gena, i staviti rezultate u kontekst.

Iz rezultata ove studije vidljivo je kako je *TP53* najčešće promijenjen gen i u gliomima niskog, i u gliomima visokog stupnja. Radi se o genu ključnom u zaustavljanju staničnog ciklusa i promociji senescencije. Promjene u ovom genu vežu se uz smanjenu tumor-supresorsku funkciju, te se generalno vežu uz agresivne tumore. Promjene u nekom dijelu p53 signalnog puta u glioblastomima nalaze se u čak 85% slučajeva (101). Smatra se kako su promjene gena *TP53*, i njegovog signalnog puta ključan način na koji stanice glioma izbjegavaju senescenciju. *In vitro* pokusi u kojima su u stanicama glioma promijenjeni geni za *TP53* zamijenjeni nepromijenjenim, divljim tipom gena, pokazali su uspješnu indukciju senescencije u tim stanicama (70). U kontekstu naše studije, dobiveni podatci u skladu su s prethodnim istraživanjima koji pokazuju visoku učestalost promjena *TP53*.

Jedna osobitost naših rezultata je ta da su promjene nešto češće u stanicama glioma nižih gradusa. Jedno od objašnjenja bi moglo biti kako su češće mutacije *TP53* pokazatelj manje frakcije senescentnih stanica, a manje učestale mutacije pokazatelj su veće frakcije senescentnih

stanica, te da je učestalost promjene *TP53* manja u gliomima visokog gradusa jer je u njima više senescentnih stanica. To je u skladu s rezultatima nekih autora (73–76), no potrebna je daljnja analiza i dodatna istraživanja kako bismo mogli doći do takvog zaključka. Također je moguće kako su promjene *TP53* rani događaj u nastanku glioma, s obzirom na to kako su karakteristične kod difuznih glioma nižeg gradusa.

Analizom najčešće promijenjenog gena u skupini HGG, inhibitora kinaza *CDKN2A*, u našoj studiji nalazimo veliku statistički značajnu razliku između LGG i HGG skupine. Postotak promijenjenih uzoraka glioma niskog stupnja bio je 5,60% (44/786 uzoraka), dok je kod glioma visokog stupnja taj postotak iznosio 36,05% (906/2513 uzoraka).

Alternativnim izrezivanjem ovog gena nastaju dvije izoforme. Gen kodira dva proteina – P16INK4A i P14ARF. Radi se o proteinima koji imaju važnu tumor-supresorsku ulogu. P16INK4A inhibira kinaze ovisne o ciklinu CDK4 i CDK6 te aktivira signalni put Rb, što zaustavlja stanični ciklus. P14ARF aktivira put p53, također zaustavljajući stanični ciklus. Nepromijenjeni *CDKN2A* ima važnu ulogu u supresiji tumora i senescenciji povezanoj sa starenjem, te se smatra markerom fiziološke starosti organizma (102). Naši rezultati su pokazali kako je u gliomima visokog gradusa ovaj gen značajno češće promijenjen, i da se u većini slučajeva (96% promijenjenih uzoraka) radi o dubokoj deleciji, što odgovara spoznajama o agresivnom ponašanju glioma visokog gradusa. Manjak funkcije ovog važnog tumor-supresorskog gena omogućava agresivnu proliferaciju i nepovoljan klinički tijek tumora. Mnogi autori navode povećanu ekspresiju P16INK4A i P14ARF kao čimbenika koji potiču senescenciju i čija povećana aktivnost u tumorskom mikrookolišu dovodi do lošijih kliničkih ishoda u gliomima visokog gradusa (82).

Gen *EGFR* je prema našim rezultatima također značajno promijenjen u gliomima visokog stupnja. Postotak promjene u HGG skupini iznosio je 34,58% (869/2513 uzoraka), a u LGG skupini 3,69% (29/786 uzoraka). Radi se o genu koji kodira za transmembranski receptor za ligande iz porodice EGF (engl. *Epidermal growth factor*). Disregulirani prijenos signala preko ovog receptora dovodi do nastanka mnogih tumora (103). Naši rezultati pokazuju kako su prisutne promjene *EGFR* - mutacije (6,96%), amplifikacije (14,88%), duboke delecije (0,64%), višestruke promjene (12,64%). Vidljivo je kako se radi o promjenama koje mogu dovesti do

pojačanog, odnosno promijenjenog prijenosa signala, koji se dovodi u vezu s progresijom tumora. Naši rezultati su u skladu s dosadašnjim spoznajama kako povećana ekspresija ovog gena pozitivno korelira s agresivnošću tumora, i potvrđuju učestalost amplifikacija ovog gena u stanicama glioma visokog gradusa – koju neki autori navode i kao 40% u glioblastomima (104).

Analizom gena *ATM* pronašli smo 1,91% promijenjenih uzoraka u LGG skupini, odnosno 3,14% u HGG skupini. Radi se o genu koji kodira istoimeni protein koji igra ključnu ulogu u kontroli nadzornih točaka staničnog ciklusa, i uključen je u popravak oštećenja DNA. Prikaz uloge *ATM* u popravku dvostrukog loma uzvojnice vidljiv je u Uvodu na slici 2. *ATM* je uključen u stanični odgovor i na druge oblike oštećenja, a mutacije ovog gena povezuju se s većim rizikom od nastanka tumora. Iako je ovaj gen još u potpunosti neistražen i ne nalazimo mnogo podataka o specifičnim genetskim promjenama i kliničkim korelacijama u gliomima, prijašnja istraživanja govore o učestalim mutacijama *ATM* u mnogim drugim tumorima, kao npr. karcinomu dojke (1,9%), tumorima hematopoetskog sustava (11,1%), karcinomu pluća (7,2%) i dr. (105,106).

Gen *TNFRSF1A* kodira istoimeni protein član superobitelji receptora TNF koji ima ulogu u upalnom odgovoru, primarno kroz aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- κ B, i u apoptozi. U kontekstu tumora, uloga *TNFRSF1A* još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali istraživanje Wanga i sur. (107) je pokazalo kako zajedno s još tri gena u panelu - *CD44*, *ABCC3*, *MGMT* – pokazuje prediktivnu vrijednost prilikom procjene odgovora na terapiju glioblastoma (107). Studija Yanga i sur. (108) pokazuje kako je ekspresija *TNFRSF1A* u gliomima značajno veća nego u normalnom tkivu mozga, i kako je povezana s lošijom prognozom u pacijenata s gliomima. Također pokazuju kako inhibicija *TNFRSF1A* dovodi do smanjenja proliferacije i migracije stanica glioma. Naši rezultati govore u prilog uloge pojačane aktivnosti ovog gena u razvoju glioma, jer je najčešći tip promijene koji smo našli amplifikacija – u LGG skupini je amplifikacija bila jedini tip promjene (3,68%), dok je u HGG skupini kod 1,67% uzoraka pronađena amplifikacija, a kod 0,58% mutacija.

Analizom gena *IGFBP7* koji kodira vezni protein 7 za inzulinu-sličan čimbenik rasta, ustvrdili smo kako je promijenjen u 0,19% LGG uzoraka, i u 3,11% HGG uzoraka.

Ovaj je protein uključen u regulaciju stanične proliferacije i diferencijacije, kao i indukciju apoptoze i senescencije (109). U tumorima je važan za staničnu adheziju i angiogenezu (110). Wang i sur. u svojem istraživanju u kojem su proučavali korelaciju genetskih promjena *IGFBP7*

i razinu ekspresije proteina pokazuju kako je amplifikacija *IGFBP7* prediktor goreg ishoda u bolesti u usporedbi s uzorcima glioma bez amplifikacije (110). Također, pokazuju i pozitivnu korelaciju između jačeg imunološkog odgovora u tumorskom mikrookolišu onih uzoraka koji su imali amplificirani *IGFBP7*. To sve govori u prilog važnosti veze između upalnog senescentnog sekretoma i agresivnog tumorskog ponašanja. Naši rezultati u kojima je glavna promjena *IGFBP7* u gliomima amplifikacija (HGG - 2,71%, LGG – 0,19%) su u suglasju s ovim spoznajama. Statistički značajno veća učestalost promjene u gliomima visokog gradusa potencijalno govori o većoj frakciji senescentnih stanica u tim gliomima i potencijalnoj prisutnosti senescentnog sekretoma.

TNFRSF11B, koji kodira istoimeni protein također poznat i kao osteoprotegerin, član je porodice receptora za TNF, uključen u različite stanične procese, između ostalog staničnu proliferaciju i diferencijaciju, epitelno-mezenhimsku tranziciju, te modulaciju upalnog odgovora, primarno putem NF- κ B (111). Prema Kangu i sur. (112), pojačana ekspresija ovog gena povezana je s kraćim srednjim vremenom preživljenja i lošijom prognozom u pacijenata s gliomima nižeg gradusa – što je u suprotnosti s ishodima u nekim drugim tumorima, npr. karcinomu dojke. Također navode kako korelaciju s ishodima u slučajevima glioma visokog gradusa tek treba utvrditi. Naši rezultati analize *TNFRSF11B* pokazuju promjenu u 4,84% LGG (sve promjene čine amplifikacije), i 1,84% HGG (0,52% mutacija, 1,27% amplifikacija, 0,06% duboka delecija). Ti podaci govore u prilog zaključaka prijašnjih studija o važnosti amplifikacije i pojačane ekspresije *TNFRSF11B* u gliomima nižeg gradusa, dok je za gliome visokog gradusa teže donijeti jasan zaključak.

TP53BP1 – vezni protein tumor-supresora *TP53*, važan je čimbenik staničnog odgovora na oštećenje DNA, i djeluje tumor-supresorski. Pretpostavlja se da ovaj protein igra važnu ulogu u rezistenciji glioma na radioterapiju, zbog svoje uloge u popravku oštećenja DNA koja nastaju kao posljedica primjene ionizirajućeg zračenja (113). Stanice u kojima je aktivnost TP53BP1 smanjena ili izostaje demonstriraju veću sklonost apoptozi ili senescenciji nakon izloženosti ionizirajućem zračenju, što pobuđuje interes prema ovom proteinu kao terapijskoj meti s ciljem povećanja osjetljivosti odgovora tumora na radioterapiju (113,114).

Istraživanje Squatrita i sur. (114) pokazuje kako je smanjena ekspresija gena *TP53BP1* povezana s lošijim ishodima u pacijenata s gliomima. Naša analiza je pokazala promjenu ovog gena u

1,50% uzoraka LGG (0,83% mutacija, 0,17% amplifikacija, 0,50% duboka delecija), i 2,33% uzoraka HGG (1,86% mutacija, 0,05% amplifikacija, 0,41% duboka delecija). Iako je vidljivo da je učestalost povišena u HGG u odnosu na LGG, potrebna je daljnja analiza specifičnih mutacija, i razine ekspresije gena radi donošenja zaključka o ulozi *TP53BP1* u ovim uzorcima.

Čimbenik rasta hepatocita – HGF, zajedno sa svojim receptorom MET, važan je čimbenik u staničnoj proliferaciji, migraciji, angiogenezi i regeneraciji tkiva. U zdravim stanicama, razina njegove aktivnosti je niska, osim u slučaju ozljede tkiva. U tumorskim stanicama dolazi do pojačane aktivnosti HGF-a, koja pozitivno korelira s razvojem tumora, metastaza, i općenito lošijom prognozom. Porast ekspresije HGF-a korelira s porastom gradusa glioma (115). Pokusi na životinjama u kojima je HGF inhibiran pokazali su smanjenje tumorske mase i poboljšanje kliničke slike (116). Naši rezultati pokazuju 1,28% promijenjenih uzoraka u LGG skupini, te 1,51% u HGG skupini. Među LGG uzorcima najčešća je bila amplifikacija (0,64%), zatim mutacija (0,51%), te duboka delecija (0,13%). U HGG skupini najčešća je bila mutacija (1,39%), te amplifikacija (0,12%). Ovi rezultati se slažu s pretpostavkom kako promjene gena HGF koreliraju s visinom gradusa.

SERPINE1 je gen koji kodira inhibitor aktivatora plazminogena 1, najpoznatiji po svojoj ulozi u sustavu fibrinolize, ali i potencijalni induktor senescencije, i sastavnica SASP-a (117). Uloga ovog gena u razvoju tumora nije u potpunosti razjašnjena, no pretpostavlja se da ključnu ulogu igra preko interakcije s izvanstaničnim matriksom. Mnoga istraživanja su utvrdila njegovu pojačanu ekspresiju u gliomima, koja korelira sa stupnjem malignosti tumora (118). Istraživanje Huanga i sur. (118) utvrdilo je kako je povećana ekspresija *SERPINE1* značajan prediktor ishoda u pacijenata s gliomima, te kako korelira s gradusom tumora. Istraživanje Sekera i sur. pokazalo je smanjenje proliferacije i migracije tumorskih stanica *in vitro* kao posljedicu farmakološke ili genetske inhibicije ovog gena (119). Naši rezultati pokazuju promjene *SERPINE1* u 2,90% uzoraka u LGG skupini, te 1,79% u HGG skupini. Među gliomima nižeg stupnja se u 2,51% uzoraka radilo o amplifikaciji, a u 0,39% o mutaciji. Među uzorcima glioma visokog stupnja, 1,27% čini amplifikacija, 0,46% mutacija, i 0,06% duboka delecija. Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku kako je *SERPINE1* pojačano eksprimiran u gliomima, međutim, nije pridružen niti jednom specifičnom gradusu.

Statistička analiza isprofilirala je gene pridružene LGG i HGG gliomima i pokazala značajnu razliku između dviju skupina za 5 analiziranih gena. Učestalost promjene je za 3 od 5 gena bila značajno veća u skupini HGG, što dodatno potvrđuje našu hipotezu.

Naši rezultati po prvi puta donose ukupnost promjena gena čiji su produkti okarakterizirani kao biljezi fenotipa SASP u gliomima. Pokazali smo koji od njih imaju najvišu frekvenciju promjena u različitim tipovima glioma te je jasno vidljivo da svaki od njih posjeduje specifičnu kombinaciju promjena. Naši rezultati se uglavnom slažu s dosadašnjim literaturnim spoznajama o proučavanim genima, te potvrđuju rezultate prijašnjih studija. Za pojedine gene, dokazana je statistički značajna razlika u promjenama između LGG i HGG skupina glioma. Za sve proučavane gene smo pronašli značajne promjene u ukupnom uzorku, a većina gena je bila češće promijenjena u gliomima visokog gradusa. Rezultati ove studije pokazuju da su geni uključeni u staničnu senescenciju promjenjeni u gliomima, što može poboljšati razumijevanje tijeka bolesti, odgovora na terapiju, te pružiti znanja za razvoj budućih terapija.

Zaključci

Od deset analiziranih gena, šest je češće bilo promijenjeno u gliomima visokog gradusa (HGG): *CDKN2A*, *EGFR*, *ATM*, *IGFBP7*, *TP53BP1*, i *HGF*. Najveći postotak promjene zabilježen je kod gena *CDKN2A* (36,05% uzoraka HGG) i *EGFR* (34,58%).

Četiri analizirana gena bila su češće promijenjena u gliomima niskog stupnja (LGG): *TP53*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF11B*, *SERPINE1*. Najveći postotak promjene zabilježen je kod *TP53* (37,79% uzoraka LGG), i *TNFRSF11B* (4,84%).

Dokazana je statistički značajna razlika u promjenama između LGG i HGG skupina za sljedećih pet gena: *TP53*, *CDKN2A*, *EGFR*, *IGFBP7*, te *TNFRSF11B*.

Obrasci promjena govore u prilog tome kako su izabrani geni često promijenjeni u tumorima, proporcionalno njihovom stupnju malignosti.

Ovi nalazi naglašavaju važnost specifičnih genetskih promjena u regulaciji stanične senescencije i njihov utjecaj na malignost glioma. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se bolje razumjeli mehanizmi kroz koje ovi geni utječu na senescenciju, i na klinički tijek bolesti.

Potrebna su dodatna istraživanja i eksperimentalna provjera rezultata cBioPortala kako bismo potvrdili spoznaje ovog rada.

Zahvale

Hvala profesorici Nives Pećina-Šlaus na podršci i razumijevanju u cijelom procesu izrade ovog rada, kao i vrlo respozivnoj komunikaciji koja mi je stvarno olakšala cijeli ovaj proces.

Hvala mojoj mami Dubravki na razumijevanju i podršci, kako kroz cijeli studij, tako i sad.

Hvala mojim prijateljima na svemu, a posebice strpljenju.

Pozdrav svima u studiju i režiji.

Literatura

1. Mamelak AN, Jacoby DB. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). *Expert Opin Drug Deliv*. 2007 Mar;4(2):175–86.
2. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*. 2017 Apr;14(2):284–97.
3. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet*. 2012 Dec;205(12):613–21.
4. Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*. 2015 May;3(7):95.
5. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016 Jun;131(6):803–20.
6. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathol (Berl)*. 2018 Nov;136(5):805–10.
7. Modrek AS. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):43.
8. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007 Aug;114(2):97–109.
9. Cahill DP, Sloan AE, Nahed BV, Aldape KD, Louis DN, Ryken TC, et al. The role of neuropathology in the management of patients with diffuse low grade glioma: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol*. 2015 Dec;125(3):531–49.
10. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer*. 1997 Apr 1;79(7):1381–93.

11. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*. 2022 Jan;128(1):47–58.
12. Horbinski C, Berger T, Packer RJ, Wen PY. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat Rev Neurol*. 2022 Sep;18(9):515–29.
13. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol*. 2021 Aug 2;23(8):1231–51.
14. Rossetti AO, Stupp R. Epilepsy in brain tumor patients: *Curr Opin Neurol*. 2010 Dec;23(6):603–9.
15. Kirby S, Purdy RA. Headaches and Brain Tumors. *Neurol Clin*. 2014 May;32(2):423–32.
16. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *The Lancet*. 2018 Aug;392(10145):432–46.
17. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):299–312.
18. Tom MC, Cahill DP, Buckner JC, Dietrich J, Parsons MW, Yu JS. Management for Different Glioma Subtypes: Are All Low-Grade Gliomas Created Equal? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019 May;(39):133–45.
19. McBain C, Lawrie TA, Rogozińska E, Kernohan A, Robinson T, Jefferies S. Treatment options for progression or recurrence of glioblastoma: a network meta-analysis. *Cochrane Gynaecological, Neuro-oncology and Orphan Cancer Group, editor. Cochrane Database Syst Rev [Internet]*. 2021 Jan 5 [cited 2024 May 21];2021(5). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013579.pub2>
20. Xu S, Tang L, Li X, Fan F, Liu Z. Immunotherapy for glioma: Current management and future application. *Cancer Lett*. 2020 Apr;476:1–12.
21. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2012 May;108(1):11–27.

22. Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR, Leber DV, Halperin EC, Schold SC, et al. Supratentorial malignant glioma: Patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *Int J Radiat Oncol*. 1992 Jan;24(1):55–7.
23. Mahmoud AB, Ajina R, Aref S, Darwish M, Alsayb M, Taher M, et al. Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. *Front Immunol*. 2022 Oct 12;13:944452.
24. Dagher OK, Schwab RD, Brookens SK, Posey AD. Advances in cancer immunotherapies. *Cell*. 2023 Apr;186(8):1814-1814.e1.
25. Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Jul;15(7):422–42.
26. Yasinjan F, Xing Y, Geng H, Guo R, Yang L, Liu Z, et al. Immunotherapy: a promising approach for glioma treatment. *Front Immunol*. 2023 Sep 7;14:1255611.
27. Todo T, Ito H, Ino Y, Ohtsu H, Ota Y, Shibahara J, et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47 Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nat Med*. 2022 Aug;28(8):1630–9.
28. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DIS, Zairis S, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet*. 2016 Jul;48(7):768–76.
29. Riviere-Cazaux C, Carlstrom LP, Neth BJ, Olson IE, Rajani K, Rahman M, et al. An untapped window of opportunity for glioma: targeting therapy-induced senescence prior to recurrence. *Npj Precis Oncol*. 2023 Nov 29;7(1):126.
30. Wang X, Fukumoto T, Noma K ichi. Therapeutic strategies targeting cellular senescence for cancer and other diseases. *J Biochem (Tokyo)*. 2024 Apr 29;175(5):525–37.
31. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25(3):585–621.
32. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):72–6.
33. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 29;9:645593.

34. Burton DGA, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Nov;71(22):4373–86.
35. Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014 May 22;509(7501):439–46.
36. Debaq-Chainiaux F, Ben Ameer R, Bauwens E, Dumortier E, Toutfaire M, Toussaint O. Stress-Induced (Premature) Senescence. In: Rattan SIS, Hayflick L, editors. *Cellular Ageing and Replicative Senescence* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2024 May 21]. p. 243–62. (Healthy Ageing and Longevity). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26239-0_13
37. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell.* 2019 Oct;179(4):813–27.
38. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell.* 2013 Nov;155(5):1104–18.
39. Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell.* 2016 Dec;15(6):999–1017.
40. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 2016 Feb;23(2):303–14.
41. Valentijn FA, Falke LL, Nguyen TQ, Goldschmeding R. Cellular senescence in the aging and diseased kidney. *J Cell Commun Signal.* 2018 Mar;12(1):69–82.
42. Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Gewirtz DA. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res.* 2019 Mar 15;79(6):1044–6.
43. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell.* 2015 Aug;14(4):644–58.
44. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013 Feb 10;75(1):685–705.
45. Saleh T, Tyutyunuk-Massey L, Cudjoe EK, Idowu MO, Landry JW, Gewirtz DA. Non-Cell Autonomous Effects of the Senescence-Associated Secretory Phenotype in Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2018 May 18;8:164.

46. Wang B, Han J, Elisseeff JH, Demaria M. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2024 Apr 23 [cited 2024 Jun 10]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41580-024-00727-x>
47. Hinze C, Boucrot E. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. *J Cell Sci*. 2018 Dec 1;131(23):jcs216804.
48. Pečina-Šlaus N, Kafka A. Wnt signaling and astrocytic brain tumors. *CNS Oncol*. 2015 Dec 31;4(6):367–70.
49. Kobashigawa S, M. Sakaguchi Y, Masunaga S, Mori E. Stress-induced Cellular Senescence Contributes to Chronic Inflammation and Cancer Progression. *Therm Med*. 2019 Dec 15;35(4):41–58.
50. McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol*. 1998 Mar;8(6):351–4.
51. Lujambio A. To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *BioEssays* [Internet]. 2016 Jul [cited 2024 Jun 3];38(S1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.201670910>
52. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1677–9.
53. Kim WY, Sharpless NE. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell*. 2006 Oct;127(2):265–75.
54. Sherr CJ. Autophagy by ARF: A Short Story. *Mol Cell*. 2006 May;22(4):436–7.
55. Bent EH, Gilbert LA, Hemann MT. A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes Dev*. 2016 Aug 15;30(16):1811–21.
56. Fischer M, Müller GA. Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017 Nov 2;52(6):638–62.
57. Adams PD. Remodeling chromatin for senescence. *Aging Cell*. 2007 Aug;6(4):425–7.

58. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*. 2019 May;117:15–22.
59. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2010 Jan 1;5(1):99–118.
60. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. Downward J, editor. *PLoS Biol*. 2008 Dec 2;6(12):e301.
61. Özcan S, Alessio N, Acar MB, Mert E, Omerli F, Peluso G, et al. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging*. 2016 Jun 9;8(7):1316–29.
62. Severino V, Alessio N, Farina A, Sandomenico A, Cipollaro M, Peluso G, et al. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2013 Nov 7;4(11):e911–e911.
63. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014 Dec;31(6):722–33.
64. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011 Sep;S1044579X11000502.
65. Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds Compend Clin Res Pract*. 2017 Jun;29(6):168–74.
66. Xu Q, Long Q, Zhu D, Fu D, Zhang B, Han L, et al. Targeting amphiregulin (AREG) derived from senescent stromal cells diminishes cancer resistance and averts programmed cell death 1 ligand (PD-L1)-mediated immunosuppression. *Aging Cell*. 2019 Dec;18(6):e13027.
67. Saito Y, Yamamoto S, Chikenji TS. Role of cellular senescence in inflammation and regeneration. *Inflamm Regen*. 2024 Jun 3;44(1):28.
68. Piskorz WM, Cechowska-Pasko M. Senescence of Tumor Cells in Anticancer Therapy—Beneficial and Detrimental Effects. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 21;23(19):11082.

69. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, et al. A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*. 2002 May;109(3):335–46.
70. Chojak R, Fares J, Petrosyan E, Lesniak MS. Cellular senescence in glioma. *J Neurooncol*. 2023 Aug;164(1):11–29.
71. Fletcher-Sananikone E, Kanji S, Tomimatsu N, Di Cristofaro LFM, Kollipara RK, Saha D, et al. Elimination of Radiation-Induced Senescence in the Brain Tumor Microenvironment Attenuates Glioblastoma Recurrence. *Cancer Res*. 2021 Dec 1;81(23):5935–47.
72. Fukuya Y, Ikuta S, Maruyama T, Nitta M, Saito T, Tsuzuki S, et al. Tumor recurrence patterns after surgical resection of intracranial low-grade gliomas. *J Neurooncol*. 2019 Sep;144(3):519–28.
73. Santos-de-Frutos K, Djouder N. When dormancy fuels tumour relapse. *Commun Biol*. 2021 Jun 16;4(1):747.
74. Jinno-Oue A, Shimizu N, Hamada N, Wada S, Tanaka A, Shinagawa M, et al. Irradiation With Carbon Ion Beams Induces Apoptosis, Autophagy, and Cellular Senescence in a Human Glioma-Derived Cell Line. *Int J Radiat Oncol*. 2010 Jan;76(1):229–41.
75. Broestl L, Warrington NM, Grandison L, Abou-Antoun T, Tung O, Shenoy S, et al. Gonadal sex patterns p21-induced cellular senescence in mouse and human glioblastoma. *Commun Biol*. 2022 Aug 2;5(1):781.
76. Beltzig L, Schwarzenbach C, Leukel P, Frauenknecht KBM, Sommer C, Tancredi A, et al. Senescence Is the Main Trait Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells. *Cancers*. 2022 Apr 29;14(9):2233.
77. Redmer T, Raigel M, Sternberg C, Ziegler R, Probst C, Lindner D, et al. JUN mediates the senescence associated secretory phenotype and immune cell recruitment to prevent prostate cancer progression. *Mol Cancer*. 2024 May 29;23(1):114.
78. Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2022 Jun;22(6):340–55.
79. Marin I, Boix O, Garcia-Garijo A, Sirois I, Caballe A, Zarzuela E, et al. Cellular Senescence Is Immunogenic and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Discov*. 2023 Feb 6;13(2):410–31.

80. Wang H, Lathia JD, Wu Q, Wang J, Li Z, Heddleston JM, et al. Targeting Interleukin 6 Signaling Suppresses Glioma Stem Cell Survival and Tumor Growth. *Stem Cells*. 2009 Oct 1;27(10):2393–404.
81. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar 12;5(1):28.
82. Salam R, Saliou A, Bielle F, Bertrand M, Antoniewski C, Carpentier C, et al. Cellular senescence in malignant cells promotes tumor progression in mouse and patient Glioblastoma. *Nat Commun*. 2023 Jan 27;14(1):441.
83. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Jan 3;7(1):3.
84. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018 Jan;553(7686):96–100.
85. Rahman M, Olson I, Mansour M, Carlstrom LP, Sutiwisesak R, Saber R, et al. Selective Vulnerability of Senescent Glioblastoma Cells to BCL-XL Inhibition. *Mol Cancer Res*. 2022 Jun 3;20(6):938–48.
86. Wang L, Leite De Oliveira R, Wang C, Fernandes Neto JM, Mainardi S, Evers B, et al. High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep*. 2017 Oct;21(3):773–83.
87. Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell*. 2018 Dec;34(6):879–91.
88. Chaib S, Tchkonja T, Kirkland JL. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med*. 2022 Aug;28(8):1556–68.
89. Reich TR, Schwarzenbach C, Vilar JB, Unger S, Mühlhäusler F, Nikolova T, et al. Localization matters: nuclear-trapped Survivin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by elevating cellular senescence and impairing homologous recombination. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Jul;78(14):5587–604.
90. Pacifico F, Badolati N, Mellone S, Stornaiuolo M, Leonardi A, Crescenzi E. Glutamine promotes escape from therapy-induced senescence in tumor cells. *Aging*. 2021 Sep 15;13(17):20962–91.

91. Chibaya L, Snyder J, Ruscetti M. Senescence and the tumor-immune landscape: Implications for cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2022 Nov;86:827–45.
92. cBioPortal GitHub Repository [Internet]. Available from: <https://github.com/cBioPortal/>
93. cBioPortal - about us [Internet]. Available from: <https://docs.cbioportal.org/about-us/>
94. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May;2(5):401–4.
95. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013 Apr 2;6(269):p11.
96. de Bruijn I, Kundra R, Mastrogiacomo B, Tran TN, Sikina L, Mazor T, et al. Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res.* 2023 Dec 1;83(23):3861–7.
97. Škripek Ž. In silico analiza molekularnih biljega epitelno-mezenhimske tranzicije u gliomima [Internet]. 2023. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:909438>
98. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell.* 2018 Apr;173(2):291-304.e6.
99. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, Meyerson ML, Beroukhi R, Getz G. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol.* 2011 Apr;12(4):R41.
100. Brlek P, Kafka A, Bukovac A, Pećina-Šlaus N. Integrative cBioPortal Analysis Revealed Molecular Mechanisms That Regulate EGFR-PI3K-AKT-mTOR Pathway in Diffuse Gliomas of the Brain. *Cancers.* 2021 Jun 29;13(13):3247.
101. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshahr H, Salama SR, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell.* 2013 Oct;155(2):462–77.

102. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*. 2004 Nov 1;114(9):1299–307.
103. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*. 2007 Aug 1;117(8):2051–8.
104. Oprita A, Baloi SC, Staicu GA, Alexandru O, Tache DE, Danoiu S, et al. Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 8;22(2):587.
105. Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2007 Aug 6;7:152.
106. Lee JH, Paull TT. Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Dec;22(12):796–814.
107. Wang F, Zheng Z, Guan J, Qi D, Zhou S, Shen X, et al. Identification of a panel of genes as a prognostic biomarker for glioblastoma. *EBioMedicine*. 2018 Nov;37:68–77.
108. Yang B, Pan YB, Ma YB, Chu SH. Integrated Transcriptome Analyses and Experimental Verifications of Mesenchymal-Associated TNFRSF1A as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Gliomas. *Front Oncol*. 2020 Mar 17;10:250.
109. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*. 2008 Feb;132(3):363–74.
110. Wang H, Wang X, Xu L, Zhang J. Co-amplified with PDGFRA , IGFBP7 is a prognostic biomarker correlated with the immune infiltrations of glioma. *Cancer Med*. 2023 Feb;12(4):4951–67.
111. Tao R, Liu Q, Huang R, Wang K, Sun Z, Yang P, et al. A Novel TNFSF-Based Signature Predicts the Prognosis and Immunosuppressive Status of Lower-Grade Glioma. Toshio Ogata F, editor. *BioMed Res Int*. 2022 May 9;2022:1–21.
112. Kang K, Xie F, Wu Y, Wang Z, Wang L, Long J, et al. Comprehensive exploration of tumor mutational burden and immune infiltration in diffuse glioma. *Int Immunopharmacol*. 2021 Jul;96:107610.

113. Yang Y, Lei T, Du S, Tong R, Wang H, Yang J, et al. Nuclear GSK3 β induces DNA double-strand break repair by phosphorylating 53BP1 in glioblastoma. *Int J Oncol* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2024 Jun 4]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2018.4237>
114. Squatrito M, Vanoli F, Schultz N, Jasin M, Holland EC. 53BP1 Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor and Protects Cells from Radiation Response in Glioma. *Cancer Res*. 2012 Oct 15;72(20):5250–60.
115. Mulcahy EQX, Colón RR, Abounader R. HGF/MET Signaling in Malignant Brain Tumors. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 13;21(20):7546.
116. Abounader R, Lal B, Luddy C, Koe G, Davidson B, Rosen EM, et al. In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB J*. 2002 Jan;16(1):1–16.
117. Zhang M, Serna-Salas S, Damba T, Borghesan M, Demaria M, Moshage H. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. *Mech Ageing Dev*. 2021 Oct;199:111572.
118. Huang X, Zhang F, He D, Ji X, Gao J, Liu W, et al. Immune-Related Gene SERPINE1 Is a Novel Biomarker for Diffuse Lower-Grade Gliomas via Large-Scale Analysis. *Front Oncol*. 2021 May 20;11:646060.
119. Seker F, Cingoz A, Sur-Erdem İ, Erguder N, Erkent A, Uyulur F, et al. Identification of SERPINE1 as a Regulator of Glioblastoma Cell Dispersal with Transcriptome Profiling. *Cancers*. 2019 Oct 25;11(11):1651.

Životopis

Rođen sam u Zagrebu 1999. Godine.

Osnovnoškolsko sam obrazovanje završio u OŠ Marina Držića, što je škola koja se među bivšim učenicima diči mnogim političkim figurama, među kojima je možda najpoznatiji trenutni predsjednik države.

Srednjoškolsko obrazovanje sam stekao u zagrebačkoj V. gimnaziji, čijim najvećim doprinosom u izgradnji sebe kao osobe prije svega smatram spajanje s mojim najboljim prijateljima, kao i iskustvo sustava koji je u meni potaknuo razvoj kritičkog razmišljanja, propitkivanja, i bunta. Nakon V. gimnazije upisujem studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon 1. godine uzimam godinu pauze kako bih se mogao baviti i drugim sferama mog interesa. Osim fakultetom, bavim se debatom u ulozi voditelja kluba svoje bivše V. gimnazije, i trenera Hrvatskog debatnog društva.

Ponekad se bavim i glazbom pa me možete vidjeti kako sviram na ulici, a i čuti na youtube kanalima

N i K v A i S V E B O R.

Tijekom godine pauze sam se bavio i postprodukcijom filma Zagrebački Ekvinocij, koji je stvarno za svaku preporuku – dostupan je besplatno na internetu.

Također sudjelujem i u raznim udrugama i kolektivima aktivističko-solidarnog karaktera.

Volim sport, umjetnost, putovanja (ali ne avionom).

Od nekih zanimljivijih dodatnih akademskih iskustava i vještina bih istaknuo rad s bazama podataka i *big data analysis*.