

# Izraženost proteina TCF1 u difuznim karcinomima želuca

---

Fajs, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:105:857021>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Nina Fajs**

**Izraženost proteina TCF1 u difuznim  
karcinomima želuca**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Tamare Nikuševa-Martić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

**Popis kratica:**

$\beta$ -cat –  $\beta$  katenin

AP-1 – engl. activator protein 1

APC - protein adenomatozne polipoze kolona

CaMK -  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin ovisna proteinska kinaza

Cdc42 – engl. cell division control protein 42 homolog

CDH1 – kadherin 1

CK1 - kazein kinaza 1

CRD - engl. cystein-rich domain

CSLS – engl. cancer stem-like cells

DAB - diaminobenzidin tetrahidroklorid

Dkk1 – engl. Dickkopf-related protein 1

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Dvl - Dishevelled protein

Fzd – protein Frizzled

Gro/TLE – engl. Groucho/transducin like enhancer of split

GSK3B - glikogen sintetaza kinaza 3 $\beta$

HIPK2 - engl. homeodomain-interacting protein kinase 2

HMG – engl. High Mobility Group

IARC - Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer)

int-1 – engl. integration-1

JNK - C-Jun N-terminalna kinaza

KBC – klinički bolnički centar

LEF – engl. lymphoid enhancer factor

lnc – engl. long non coding RNA

LRP5/6 – engl. lipoprotein receptor related protein 5/6

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza

miR - microRNA

mRNA – engl. messenger RNA

NFAT - nuklearni faktor aktiviranih T-stanica

NLK - engl. nemo like kinase

Nv- numerička gustoća

PCP - engl. planar cell polarity

PKC - protein kinaza C

PLC - fosfolipaza C

*RhoA* - član A obitelji ras homolognih gena (engl. ras homolog gene family, member A)

RNA – ribonukleinska kiselina

Rspo - R-spondin

sFRP – engl. secreted frizzled-related protein 1

TBS – engl. tris-buffered saline

TCF - engl. T cell factor

TNIK – engl. TRAF2 and NCK Interacting Kinase

TRAF2 – engl. TNF receptor-associated factor 2

Ub – ubikvitin

Vv- volumenska gustoća

wg - wingless

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija, engl. World Health Organization

WIF – Wnt inhibicijski faktor

# Sadržaj

Sažetak

Summary

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....                                | 1  |
| 1.1. WNT SIGNALNI PUT.....                   | 1  |
| 1.2. KARCINOMI ŽELUCA .....                  | 4  |
| 2. HIPOTEZA .....                            | 6  |
| 3. OPĆI CILJEVI RADA .....                   | 6  |
| 4. MATERIJALI I METODE .....                 | 7  |
| 4.1. UZORCI TKIVA .....                      | 7  |
| 4.2. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA.....         | 7  |
| 4.3. STEREOLOŠKA KVANTITATIVNA ANALIZA ..... | 9  |
| 4.4. STATISTIČKE METODE.....                 | 10 |
| 5. REZULTATI.....                            | 11 |
| 6. RASPRAVA .....                            | 18 |
| 7. ZAKLJUČAK .....                           | 20 |
| 8. ZAHVALE.....                              | 21 |
| 9. POPIS LITERATURE .....                    | 22 |
| 10. ŽIVOTOPIS .....                          | 26 |

## Sažetak

### Izraženost proteina TCF1 u difuznim karcinomima želuca

**Nina Fajs**

Wnt signalni put je uključen u patogenezu brojnih karcinoma, a u nekih je dokazana i pojačana aktivnost nizvodnih transkripcijskih faktora, kao što su proteini TCF/LEF obitelji. Jedna od ovih neoplazmi je i karcinom želuca, koji se histološki prema Laurénovoj klasifikaciji može podijeliti na tri tipa: intestinalni, difuzni i miješani. Karcinom želuca je pri vrhu ljestvice smrtnosti od karcinoma u svijetu, te se brojnim istraživanjima žele otkriti nove terapijske mogućnosti koje bi poboljšale preživljenje i kvalitetu života oboljelih. Cilj ovog istraživanja bilo je dokazati da postoji razlika u ekspresiji TCF1 proteina u normalnom tkivu i tkivu difuznog karcinoma želuca, s pretpostavkom da bi ovaj protein mogao imati ulogu u patogenezi ove vrste karcinoma. Analizirano je 36 uzoraka karcinoma te 43 uzoraka normalnog tkiva prikupljenih iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Nakon primjene imunohistokemijskog bojanja, napravljena je stereološka kvantitativna analiza te je otkriven značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u ekspresiji TCF1 proteina između stanica u zdravom tkivu i malignih stanica difuznog karcinoma želuca. Ovim rezultatom smo zaključili da bi čimbenik Wnt signalnog puta, protein TCF1, mogao imati ulogu u patogenezi difuznih karcinoma želuca, te su potrebne daljnja istraživanja o ulozi ovog proteina i mogućnosti da se ova spoznaja primjeni u terapijskom postupku.

Ključne riječi: difuzni karcinom želuca, Wnt signalni put, transkripcijski faktori, TCF1, genske promjene



## **Summary**

### **TCF1 protein expression in diffuse gastric carcinoma**

**Nina Fajs**

Wnt signal pathway is involved in the pathogenesis of multiple cancer types. Moreover, upregulation of downstream transcription factors, such as TCF/LEF family, is proved in several of them. One of this neoplasms is stomach cancer, which is, according to Laurén classification histologically divided into three categories: intestinal, diffuse and mixed type. Stomach cancer is nearly at the top of the list of leading causes of death from malignant diseases worldwide, and many studies search for new treatment possibilities which would improve survival and quality of life of patients suffering from this disease. The aim of this study was to prove that there is a difference in expression of TCF1 protein between normal tissue and diffuse stomach cancer, with the assumption that this protein may have a role in the pathogenesis of this type of stomach cancer. 36 samples of diffuse gastric carcinoma and 43 samples of normal stomach tissue gathered at the Clinical Institute of Pathology and Cytology of the Zagreb University Hospital Centre were analyzed. After the use of immunohistochemical staining, stereological quantitative analysis was done and a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) in expression of TCF1 protein between healthy tissue cells and the cells of diffuse gastric carcinoma was found. With this result we concluded that this part of the Wnt signaling pathway could have a role in the pathogenesis of diffuse gastric carcinoma. Further studies are needed to explore the role of TCF1 protein and its potential use in new therapic procedures.

**Key words:** diffuse gastric carcinoma, Wnt signaling pathway, transcription factors, TCF1, genetic abnormalities

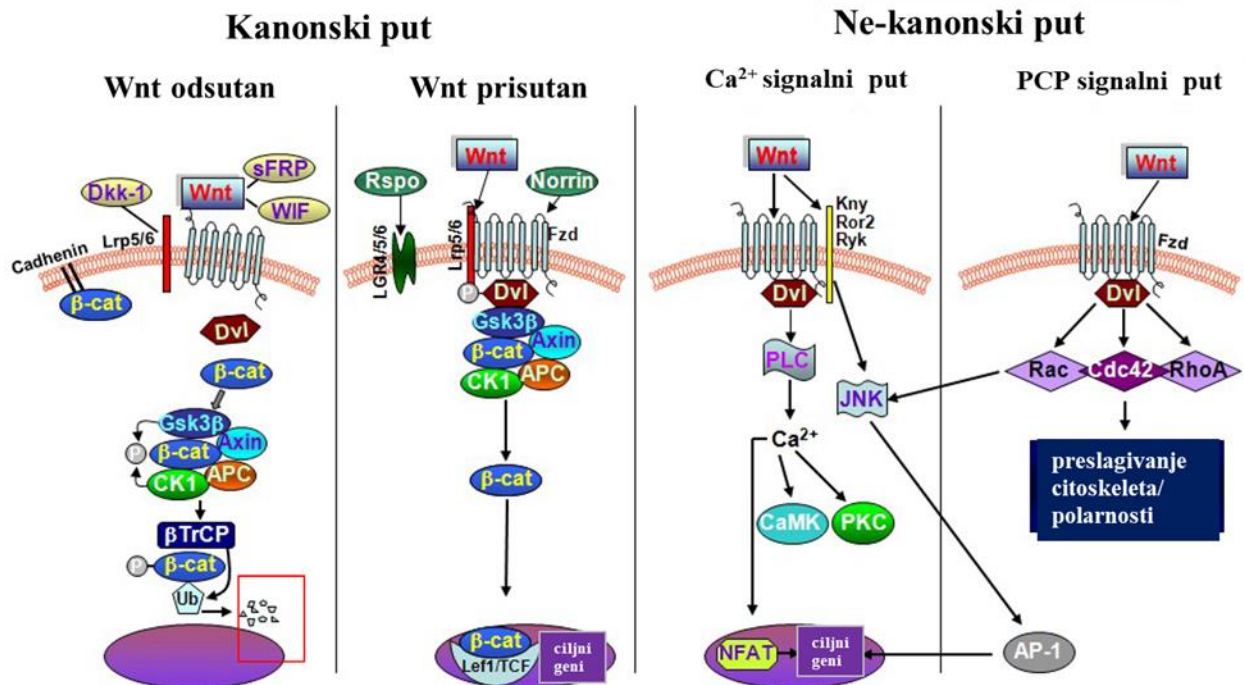
# 1. UVOD

## 1.1. WNT SIGNALNI PUT

Wnt signalni put, zajedno sa oko desetak ostalih, je jedan od najvažnijih čimbenika embrionalnog razvoja te kasnije u odraslom životu homeostaze tkiva (1). Ukoliko dođe do poremećaja samo jednog od dijelova ovog kompleksnog biološkog aparata, može doći do nastanka urođenih grešaka i neoplazmi koje mogu biti na raznim lokacijama u organizmu (2). U mnogim tkivima Wnt signalna kaskada utječe na rast i razvoj matičnim stanicama, te disregulacija aktivacije proteina u signalnom putu direktno utječe na razvoj raka (3). Naime, Wnt proteini djeluju kao protoonkogeni koji su očuvani tijekom evolucije, ali mutacijom ulaze u proces 'dobitka funkcije' te posljedično tome postaju onkogeni te mogu uzrokovati promjene u stanicama kao što je neoplazmatska transformacija (4).

Upravo ovim putem transformacije su Nusse i Varmus još 1982. otkrili prvi protein Wnt signalnog puta, protoonkogen *integration-1* (*int-1*) (5). Nekoliko godina poslije, došlo je do spoznaje da je *int-1*, koji je pronađen u sisavaca (miša i čovjeka), homolog *Wingless* (*wg*) gena u vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), te da oba pripadaju velikoj skupini ekstracelularnih signalnih molekula (6). Kombinacijom imena ovih dvaju proteina (*wg* i *int1*) Wnt proteini su dobili ime.

Poznata su tri različita Wnt signalna puta (Slika 1); jedan kanonski (Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put) i dva nekanonska (Wnt/PCP (engl. planar cell polarity) i Wnt/ $Ca^{2+}$  signalni putevi) (7). Različiti Wnt proteini aktiviraju različite Wnt signalne puteve; Wnt1, Wnt3 i Wnt8 aktiviraju Wnt/ $\beta$ -katenin put, dok Wnt5a i Wnt11 su ključni za nekanonske puteve (8). Ukoliko je Wnt odsutan,  $\beta$ -katenin u citoplazmi će konstantno biti degradiran od strane Axin destruktivskog kompleksa. Axin kompleks se sastoji od proteina Axina, produkta tumor supresor gena APC (engl. adenomatous polyposis coli gene product) i dvije serin/treonin kinaze; kazein kinaze 1 alfa (CK1; engl. casein kinase 1) i glikogen sintaze kinaze 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ; engl. glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), koji djeluje na proteasomalnu razgradnju i ubikvitinaciju  $\beta$ -katenina te ga tako sprječava da dođe do jezgre stanice (2, 9, 10).



Slika 1. Wnt signalni putevi; preuzeto i prilagođeno iz Marchetti, B. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway Governs a Full Program for Dopaminergic Neuron Survival, Neurorescue and Regeneration in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(12):3743; Figure 1, Schematic representation of canonical Wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site (Wnt) pathway and non-canonical Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  and Wnt/planar cell polarity (PCP) pathways, p.3

Kada postoji Wnt ligand, on se veže za terminalan CRD (engl. cystein-rich domain) citoplazmatskog transmembranskog Frizzled (Fz) receptora (7), i za njegov koreceptor, LRP5 ili LRP6 (engl. lipoprotein receptor related protein) te tako dovodi do aktivacije Wnt/ $\beta$ -kateninskog signalnog puta. Ovaj kompleks (Wnt-Fz-LRP5/6) zatim veže protein iz obitelji Dishevelled (Dvl), što rezultira aktivacijom i fosforilacijom LRP5/6 receptora. Ovim događajem slijedi aktivacija funkcije  $\beta$ -katenina, jer se na Wnt-Fz-Lrp5/6 kompleks sada može vezati Axin, koji izlazi iz destruktivnog kompleksa i tako ne priječi put aktivaciji Wnt ciljnih gena.  $\beta$ -katenin se fosforilira i stabilizira, te se postepeno akumulira u citoplazmi i posljedično ulazi u jezgru gdje stvara kompleks s DNA-vezanim TCF/LEF (engl. T cell factor/lymphoid enhancer factor) transkripcijskim faktorima te dovodi do aktivacije ekspresije ciljanih gena.

TCF/LEF obitelj transkripcijskih faktora, koji su ujedno i dio High Mobility Group (HMG) box obitelji, se sastoji od četiri nuklearna faktora; TCF1 (TCF7), LEF1, TCF3 (TCF7L1) i TCF4

(TCF7L2) koji su ključni izvršitelji krajnjeg ishoda Wnt signalnog puta (10). Svi TCF proteini sr proizvode u više izoformi, koje kao ishodište imaju drugačiji mRNA splicing ili upotrebu alternativnih promotora. Iako se TCF/LEF transkripcijski faktori izravno vežu na DNA pomoću njihovi HMG područja, dokazano je da oni ne mogu samostalno aktivirati transkripciju gena (11).

Smatra se da se  $\beta$ -katenin u kompleksu s TCF/LEF transkripcijskim faktorima veže na jedan od TATA box vezajućih proteina, Pontin 52, te tako omogućava aktivaciju transkripcijske mašinerije (12). Istraživanja su pokazala da neaktivirani TCF potiskuje transkripciju svojih ciljnih gena u *Drosophili*, *Xenopusu* i *C. elegans* kroz interakciju s Gro/TLE (engl. Groucho/transducin like enhancer of split) korepresorima, dok vezanje  $\beta$ -katenina potiče derepresiju. Na sličan način djeluje i humani TCF (13). Samom aktivacijom, TCF dobiva izvanrednu proliferacijsku sposobnost te može utjecati na pojavu neoplazmi. Dodatni mehanizam se otkrio proučavanjem TCF1 gena u homozigotnih miševa za mutaciju tog gena, koji su s višestruko povećanom vjerojatnošću razvili adenome mliječne žlijezde i probavnog sustava, što svrstava TCF1 protein u grupu tumor supresora (14).

TCF1 protein je primarno eksprimiran u stanicama koje potječu od T stanične linije (15,16). Također dokazana je upregulacija TCF1 u adenomima probavnog sustava (10,17). Za LEF1 je dokazan da se nalazi u pre-B i T stanicama u miševa, kao i u stanicama neuralnog grebena, mesencefalona, germinativog epitela zubi te folikula brkova tijekom embriogeneze (18), dok je TCF3 eksprimiran u epitelu želuca, folikulima dlaka i keranocitima (19). Nasuprot ovome, TCF4 se pojavljuje u kasnijim stadijima embriogeneze, i kontrolira razvoj mozga, mamarnog i crijevnog epitela (13).

Aktivnost TCF transkriptora također može biti regulirana i raznim post-translacijskim modifikatorima (10). LEF1, TCF3 i TCF4 su nakon aktiviranja Wnt signalne kaskade fosforilirani različitim kinazama kao što su HIPK2 (engl. homeodomain-interacting protein kinase 2), NLK (engl. nemo like kinase; kinaza koja je slična obitelji MAP kinaza) ili TRAF2 (engl. TNF receptor associated factor 2) i TNK1 (engl. NCK-interacting kinase), koje utječu na ekspresiju ciljnih gena Wnt signalnog puta .

Osim uloge u višestrukim biološkim procesima tijekom embrionalnog razvitka tkiva, pojačana aktivnost TCF/LEF obitelji transkripcijskih faktora je pronađena i u raznim neoplazmama. Ukoliko je povećana njihova ekspresija u stanici, to ukazuje na povećanu aktivnost čimbenika signalne

kaskade i na moguće skretanje razvoja stanice u malignu. Najveća povezanost je pronađena upravo u tumorskim bolestima hematopoetskog sustava, leukemijama i limfomima (10), te u malignitetima probavnog sustava (17,20). Proučavanjem ovog signalnog puta, otkriva se novi spektar imunoterapijskog liječenja raka koji bi kao metu imao neki od čimbenika ovog signalnog puta i tako zaustavljao kaskadu koja, u nekim uvjetima, može dovesti i do pojave maligne bolesti (21).

## **1.2.KARCINOMI ŽELUCA**

Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer; IARC), dio Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization; WHO) koja se bavi promocijom internacionalne suradnje u mjerama prevencije raka, svake godine radi GLOBOCAN izvješće o rasprostranjenosti raka, koje uključuje 185 zemalja i 36 vrsta raka (22). U 2018. zabilježeno je preko 18 milijuna novih slučajeva raka, od čega je porazan podatak da je više od polovice (9.6 milijuna) završilo smrtnim ishodom. Najčešće dijagnosticiran rak općenito u oba spola je rak pluća (11.6%), koji ujedno nosi i najveću smrtnost (18.4%), po incidenciji ga slijede rak dojke (11.6%), rak prostate (7.6%) i kolorektalni karcinom (6.1%). Na petom mjestu se nalazi rak želuca, sa 1 033 701 (5.7%) dijagnosticirana slučaja u 2018., dok je po smrtnosti na visokom trećem mjestu (8.2% slučajeva). Prevalencija raka želuca je najveća u jugoistočnoj Aziji, prvenstveno Japanu i Koreji, zatim u zemljama južne Amerike te u predjelu istočne Europe (23). Incidencija i smrtnost uvelike se razlikuje od regije do regije, što se može dovesti u vezu s pojedinim rizičnim faktorima i stilom života (24). Pušenje i vrsta prehrane (povećan unos soli, smanjen unos voća i povrća te povećan udio crvenog mesa) su vodeći rizični čimbenici u razvijenim zemljama, dok u zemljama u razvoju prevladava infektivna podloga bolesti. Ostali rizični čimbenici uključuju muški spol, krvnu grupu A, stariju životnu dob, niži socioekonomski status te dijagnozu kroničnog gastritisa (25, 26).

U Republici Hrvatskoj zadnji statistički podaci Registra za rak iz 2015. pokazuju ove podatke; rak želuca je bio na šestom mjesto po incidenciji u muškaraca, sa 520 novih slučajeva, dok je u žena zauzeo deveto mjesto sa 371 novih slučajeva (27). O problemu visoke smrtnosti ovog karcinom nam govori i podatak da je omjer mortaliteta i incidencije 0.91. Primarni cilj u prevenciji visoke smrtnosti od raka želuca je dobra prevencija, tj. edukacija populacije o promjeni životnih navika i

važnosti rane dijagnoze, pogotovo u slučajevima pozitivne bakterije *Helicobacter pylori* u želucu (28, 29).

Jedna od najčešće korištenih patohistoloških klasifikacije je Laurénova klasifikacija (30) koja histološki dijeli rak želuca na intestinalni (dobro diferencirani), difuzni (nediferencirani) i miješani (neklasificirani) tip. U Hrvatskoj se koristi histološka klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije iz 2010. godine koja dijeli adenokarcinom želuca na pet tipova: tubularni, papilarni, mucinozni, slabo kohezivni (uključuje i adenokarcinom tipa stanica prstena pečatnjaka koji spada u difuzni tip po Laurénu) te miješani tip (31).

U difuznom karcinomu želuca, po Laurénovoj specifikaciji, su prisutne karakteristične „stanice prstena pečatnjaka“ (engl. signet ring cells) koje imaju karakterističan izgled; svijetlu citoplazmu punu sluzi s jezgrom na periferiji stanice. Obično se nalaze raspršeno pojedinačno ili u obliku nespecifičnih nakupina, dok ih u metastatskim nakupinama možemo naći i u specifičnim limfnim čvorovima (Virchowljev čvor – subklavikularni limfni čvor u kojem su prisutne stanice metastatskog raka želuca). Difuzni karcinom želuca je za razliku od intestinalnog vrlo slabo ograničen, prožima cijelokupnu debljinu stijenke želuca te može dovesti do njezinog difuznog zadebljanja koje stvara karakteristični makroskopski oblik bolesti koji se naziva plastični linitis (lat. linitis plastica) (32). U velikom broju slučajeva je ovaj tip raka pri dijagnozi već proširen izvan želuca (30, 33).

Patogeneza adenokarcinoma želuca je predmet brojnih istraživanja proteklih desetljeća. Istraživanja su dokazala kako jedna od molekula koja je poremećena u obliku nasljednog karcinoma želuca je E-kadherin, koja je među ostalim uključena i signalizaciju u Wnt signalnoj kaskadi (29). Hereditarni difuzni karcinom želuca je prvi pronađeni, autosomno dominantni, poremećaj uzrokovan mutacijom CDH1 (engl. cadherin 1) gena, koji djeluje kao tumor supresor (34).

Iako se incidencija karcinoma želuca polako smanjuje proteklih desetljeća, velik je problem njegovo kasno otkrivanje i velika agresivnost samog tumora, što rezultira ograničenim terapijskim mogućnostima (35). Naglasak se stavlja na daljnja istraživanja molekularne podloge bolesti, koja bi iznjedrila novi način terapije i tako moguće poboljšala dosadašnje loše petogodišnje preživljenje ovih bolesnika, kao i njihovu kvalitetu života nakon terapije.

## **2. HIPOTEZA**

Tkiva difuznih karcinoma želuca imaju jaču izraženost TCF1 proteina nego zdrava tkiva želuca.

## **3. OPĆI CILJEVI RADA**

Cilj istraživanja bio je dokazati postojanje razlike u izraženosti proteina TCF1, komponenti Wnt-signalnog puta, u difuznim karcinomima želuca i u normalnom tkivu, što bi ukazivalo na moguću povezanost poremećenog prijenosa signala tim putem i nastanka difuznog karcinoma želuca.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1.UZORCI TKIVA**

Uzorci difuznih karcinoma želuca i zdravih tkiva želuca dobivenog endoskopskim biopsijama prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Uzorci tkiva uzeti su prije započinjanja specifičnog onkološkog liječenja. Tijekom uzimanja uzoraka zabilježeni su demografski podatci (spol i dob) te klinički i patološki parametri (lokalizacija uzetog tkiva za biopsiju i TNM klasifikacija).

Istraživanje je dobilo suglasnost Etičkog povjerenstva KBC „Rebro“ i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb broj: EP- 380-59-10106-15-46/3 25. rujna 2015.

### **4.2.IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA**

Uzorci pohranjeni u parafinskom bloku analizirani su imunohistokemijskim metodama. Imunohistokemijska analiza korištena je da bi se ustanovile razine ekspresije i stanična lokalizacija proteina TCF1. Parafinski uklopljeni rezovi uzoraka debljine 4 µm postavljeni su na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Rezovi su imunohistokemijski bojani metodom biotin-avidin-streptavidin peroksidazom koja potječe iz hrena (engl. horseradish; DAKO No.K0679). Korištena su primarna monoklonska protutijela TCF1 (engl. mouse monoclonal anti-human TCF1; Santa Cruz Biotechnology, USA, dilution 1:50).

#### **4.2.1. PRIPREMA ZA IMUNOHISTOKEMIJU**

Prije samog imunohistokemijskog bojanja bilo je potrebno je deparafinirati tkivo što se postiže provođenjem uzoraka kroz niz ksilola u trajanju od 4 puta po 10 minuta. Zatim se provodi rehidracija tkiva provođenjem uzoraka kroz silazni niz alkohola; apsolutni (100%-tni) alkohol



jedanput u trajanju od 5 minuta, 96%-tni alkohol jedanput u trajanju od 5 minuta, 70%-tni alkohol jedanput u trajanju od 2 minute te njihovim ispiranjem u destiliranoj vodi 2 puta. Deparafinizirani i rehidrirani rezovi uzoraka zagrijavani su u otopini za otkrivanje antigena (Dako Target Retrieval Solution, Dako Corporation, USA) u mikrovalnoj pećnici 20 minuta na 600 W zbog demaskiranja epitopa. Zatim su preparati ostavljeni da se polako hlade 25 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su isprani 2 puta po 3 minute TBS (engl. tris-buffered saline) puferom. Kako bi se blokiralo djelovanje endogene peroksidaze preparati su tretirani otopinom 3%-tnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minuta u mraku. Slijedi ispiranje u TBS puferu 2 puta po 3 minute.

#### **4.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKA OBRADA**

Uzorci su nakon opisane pripreme tretirani optimalno razrijeđenim primarnim protutijelom (TCF1) preko noći (cca. 18h) na temperaturi od 4°C. Nakon inkubacije uzorci su 2 puta po 3 minute ispirani u TBS puferu. Za detekciju primarnog protutijela korišteno je Dako REAL Envision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Preparati su nakapani sekundarnim protutijelom koje se sastoji od otopine za povezivanje (biotinylated link universal, DAKO, K0690) i Streptavidina-HRP (DAKO, K0690) 30 min. Nakon toga je slijedilo ispiranje u TBS puferu 2 puta po 3 minute.

Na kraju smo cijeli proces vizualizirali pomoću supstrat-kromogen otopine, u kojoj kao supstrat služe koncentrirani Tris-HCl pufer i 0,8%-tna otopina vodikovog peroksida, a kao kromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB), u trajanju od 10 minuta. Navedena otopina se ispire vodovodnom, a zatim i destiliranom vodom. Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultira nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu.

Zatim slijedi kontrastiranje za što se koristi hematoksilin. Uzorci se 1 minutu boje u hematoksilinu te se onda isperu 5 minuta u vodovodnoj vodi i nakon toga jedanput u destiliranoj vodi. Zatim slijedi proces dehidriranja provođenjem kroz uzlazni niz etilnog alkohola. Uzorci se provedu kroz 70%-tni EtOH (nekoliko urona), 96%-tni EtOH (nekoliko urona), 100%-tni EtOH (prvo 1 minutu, zatim 2 minute) i ksilol (2 puta po 5 minuta) u kojem se preparati izbistre. Obrada završava poklapanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje koji se koristi u rutinskoj histološkoj dijagnostici.

U eksperimentu se koristi negativna kontrola (uzorak koji nismo inkubirali s primarnim antitijelom tijekom imunohistokemije).

### 4.3. STEREOLOŠKA KVANTITATIVNA ANALIZA

Za stereološku analizu korišten je binokularni svjetlosni mikroskop "Nikon Alphaphot". Rezovi su analizirani pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sustava s 42 točke za testiranje, pri povećanju od 400x, te je ukupna duljina testnih linija (Lt) iznosila 1,008 mm, a testna površina (At) 0,0837 mm<sup>2</sup> za svako analizirano mikroskopsko polje.

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

$$n = \left( \frac{200}{y} * \frac{s}{x} \right)^2$$

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

Pomoću Weibelovog mnogonamjenskoga testnoga sistema brojale su se TCF1 pozitivne stanice u normalnom zdravom tkivu želuca i tumorskom tkivu, nakon čega je slijedilo izračunavanje volumenske gustoće. Volumenska gustoća (Vv) je relativna stereološka varijabla koja pokazuje koliki dio sveukupnog prostora zauzima proučavana faza ili koliki je postotak proučavane faze u jedinici volumena. Volumenska gustoća nema dimenzije. Volumenska gustoća (Vv) je izračunata prema formuli:

$$Vv = \frac{Pf}{Pt}$$

Pf = broj pogodaka testnih točaka na proučavanu fazu

Pt = broj svih testnih točaka unutar testnog polja

Također, pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sistema brojale su se TCF1 pozitivne stanice u normalnom zdravom tkivu želuca i tumorskom tkivu, nakon čega je slijedilo izračunavanje numeričke gustoće. Numerička gustoća ( $Nv$ ) je relativna stereološka varijabla koja nam daje podatak o broju čestica u jedinici prostora ( $\text{mm}^3$ ). Broj profila čestica u ravnini presjeka ( $NA$ ) je razmjernan produktu njihove numeričke gustoće ( $Nv$ ) i njihovog prosječnog tangentnog promjera  $D$  što se vidi iz jednadžbe:

$$NA = Nv * D$$

Iz nje možemo izraziti numeričku gustoću:

$$Nv = \frac{NA}{D}$$

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

$$Nv = \frac{N}{At * D}$$

Prosječni tangentni promjer izračunat je pomoću Elipse 3D programa i on za 100 stanica iznosi  $D=0,0054$  mm, a površina testnog areala  $0,0837$  mm<sup>2</sup>. Koristeći ove vrijednosti izračunata je numerička gustoća pozitivnih stanica u želucu.

#### 4.4.STATISTIČKE METODE

U statističkoj obradi dobivenih podataka koristila se srednja vrijednost, standardna pogreška i Studentov t-test u uvjetima normalne raspodjele ili Wilcoxon Signed Rank Test ako to nije bio slučaj. Priznata je kao značajna razlika na razini stupnja vjerojatnosti od  $p<0,05$ . Distribucija podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, D'Agostino & Pearson omnibus testa i Shapiro-Wilks W-testa. Razlike u volumenskoj i numeričkoj gustoći TCF1 pozitivnih stanica u istraživanim skupinama analizirane su F-testom. Za statističku analizu korišten je program GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 5. REZULTATI

U ovom radu uzeto je 36 uzoraka difuznih karcinoma želuca i 43 uzoraka kontrolnog zdravog tkiva želuca (Tablica 1.) koji su analizirani kako bi se utvrdila izraženost TCF1 proteina.

Ovo istraživanje obuhvatilo je 14 žena (39%) i 22 (61%) muškaraca. Ukupna prosječna starosna dob pri postavljanju dijagnoze iznosila je 64,06 godina. Prosječna starosna dob za žene iznosila je 59.92 godine, a za muškarce 61.13 godine. U 94% uzoraka primarni tumor bio je u T3 (zahvaćanje subseroze) ili višem stadiju prema TNM klasifikaciji, sa širenjem u limfne čvorove.

Tablica 1. Kliničke karakteristike pacijenata s difuznim karcinomom želuca

| REDNI BROJ PACIJENTA | SPOL I DOB | LOKALIZACIJA                | TNM      |
|----------------------|------------|-----------------------------|----------|
| 1.                   | M 67       | antrum                      | T4bN2M1  |
| 2.                   | M 67       | pilorus                     | T4aN1M0  |
| 3.                   | Ž 66       | pilorus                     | T4aN0M0  |
| 4.                   | M 77       | */                          | T3N0MX   |
| 5.                   | Ž 44       | mala krivina                | T3N0M0   |
| 6.                   | M 73       | mala krivina                | T4aN3aMX |
| 7.                   | M 58       | antrum                      | T3N1M0   |
| 8.                   | M 49       | mala krivina                | T3N3aM0  |
| 9.                   | M 48       | antrum                      | T1aN0M0  |
| 10.                  | M 69       | mala krivina                | T3N3bMX  |
| 11.                  | Ž 77       | kardija/velika/mala krivina | T4bN3bM0 |
| 12.                  | M 77       | antrum                      | T3N3bM0  |

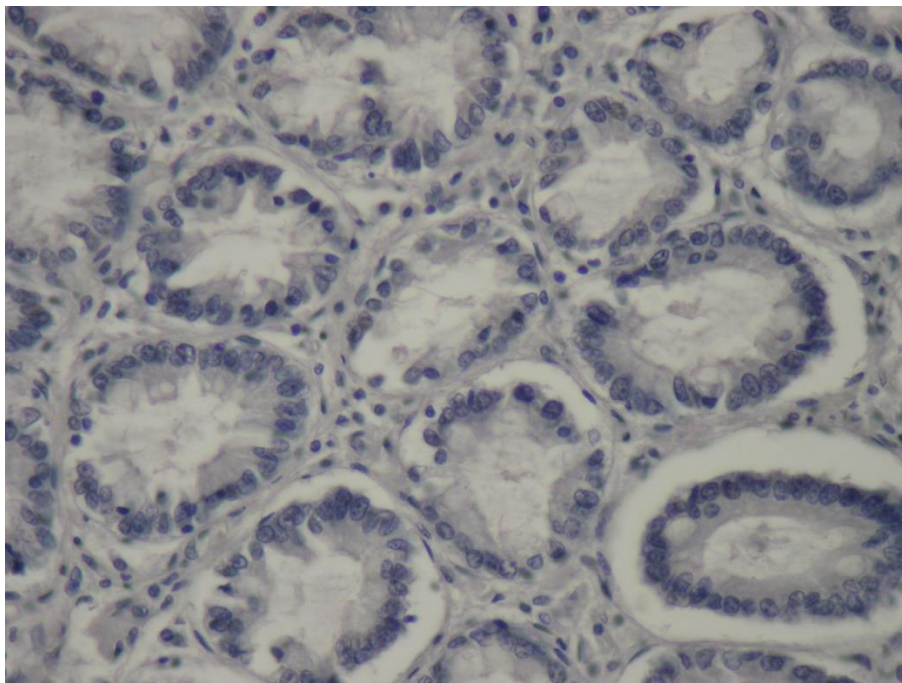
|      |      |                       |          |
|------|------|-----------------------|----------|
| 13.  | M 74 | kardija/mala krivina  | T4aN2M0  |
| 14.  | M 72 | mala krivina          | T3N2M0   |
| 115. | M 72 | kardija               | T1aN0M0  |
| 16.  | M 71 | antrum                | T3N1M0   |
| 17.  | Ž 70 | mala krivina          | T3N1M0   |
| 18.  | M 62 | velika krivina        | T3N1M0   |
| 19.  | M 67 | mala krivina          | T3N0M0   |
| 20.  | Ž 59 | velika krivina        | T1bN0M0  |
| 21.  | Ž 80 | */                    | T4N2MX   |
| 22.  | M 59 | velika krivina        | T4bN2M1  |
| 23.  | Ž 58 | antrum                | T4N1M0   |
| 24.  | Ž 65 | antrum                | T3N3bM1  |
| 25.  | M 69 | velika/mala krivina   | T4aN1MX  |
| 26.  | Ž 46 | mala krivina          | T4bN3aM1 |
| 27.  | M 58 | antrum                | T3N1M0   |
| 28.  | M 70 | antrum                | T4aN3M1  |
| 29.  | Ž 65 | antrum                | T4bN3bM1 |
| 30.  | M 71 | antrum                | T3N1M0   |
| 31.  | Ž 48 | pilorus               | T4aN0M0  |
| 32.  | M 75 | mala krivina/antrum   | T3N1M0   |
| 33.  | M 62 | korpus                | T3N1M1   |
| 34.  | Ž 51 | velika krivina/antrum | T4bN3aM1 |

|     |      |              |         |
|-----|------|--------------|---------|
| 35. | Ž 41 | antrum       | T3N1MX  |
| 36. | Ž 69 | mala krivina | T3N3bM0 |

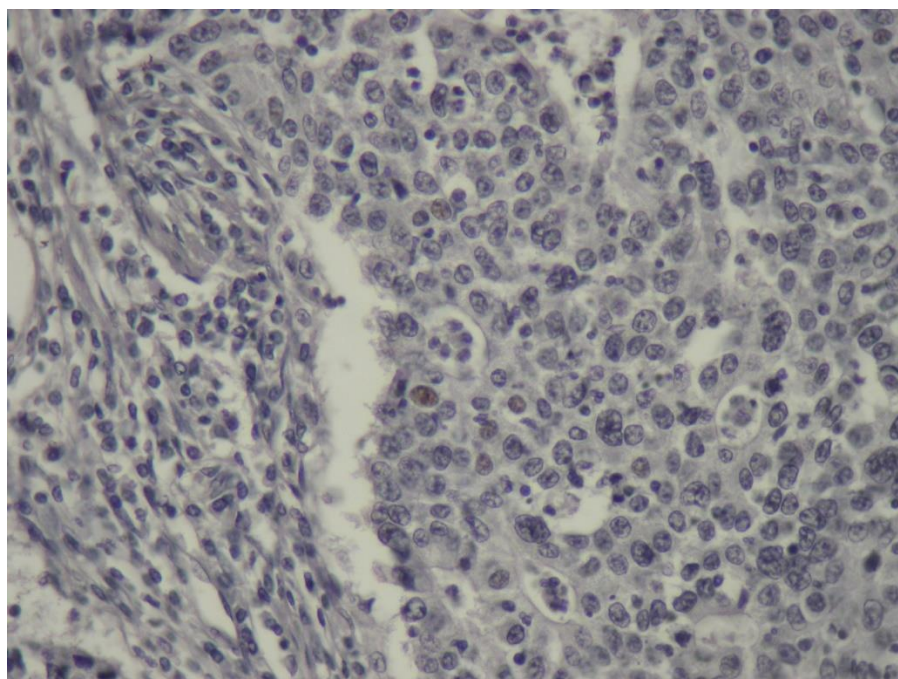
\*/ - podaci su nepoznati

Imunohistokemijskom analizom ekspresija TCF1 proteina u zdravom tkivu želuca nađena je u jezgri žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu ekspresija je također bila u jezgri, iako se mogla naći i izvan žljezdanih stanica želuca.

## 5.1.EKSPRESIJA TCF1 PROTEINA



Slika 2. Ekspresija proteina TCF1 u zdravom tkivu želuca



Slika 3. Ekspresija proteina TCF1 u difuznom karcinomu

Tablica 2. Srednje vrijednosti, standardna devijacija, standardna greška i za stereologiju specifična relativna standardna greška numeričke gustoće (Nv; mm<sup>3</sup>) TCF1 pozitivnih stanica

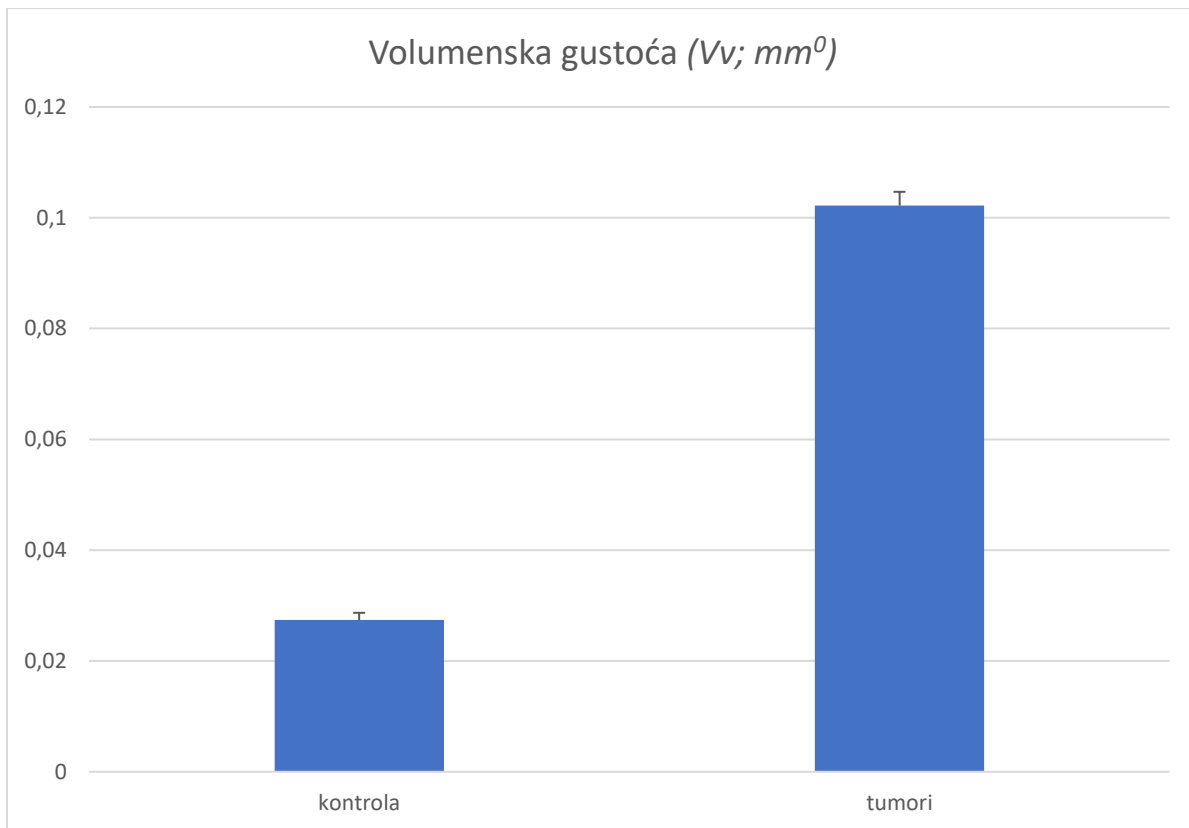
| Skupina                | Srednja vrijednost | Standardna devijacija | Standardna greška |
|------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| Kontrolno zdravo tkivo | 12316              | 7737                  | 373.1             |
| Tumorsko tkivo         | 32751              | 11746                 | 566.4             |

Tablica 3. Srednje vrijednosti, standardna devijacija, standardna greška i za stereologiju specifična relativna standardna greška volumenske gustoća;, (Vv; mm<sup>0</sup>) TCF1 pozitivnih stanica

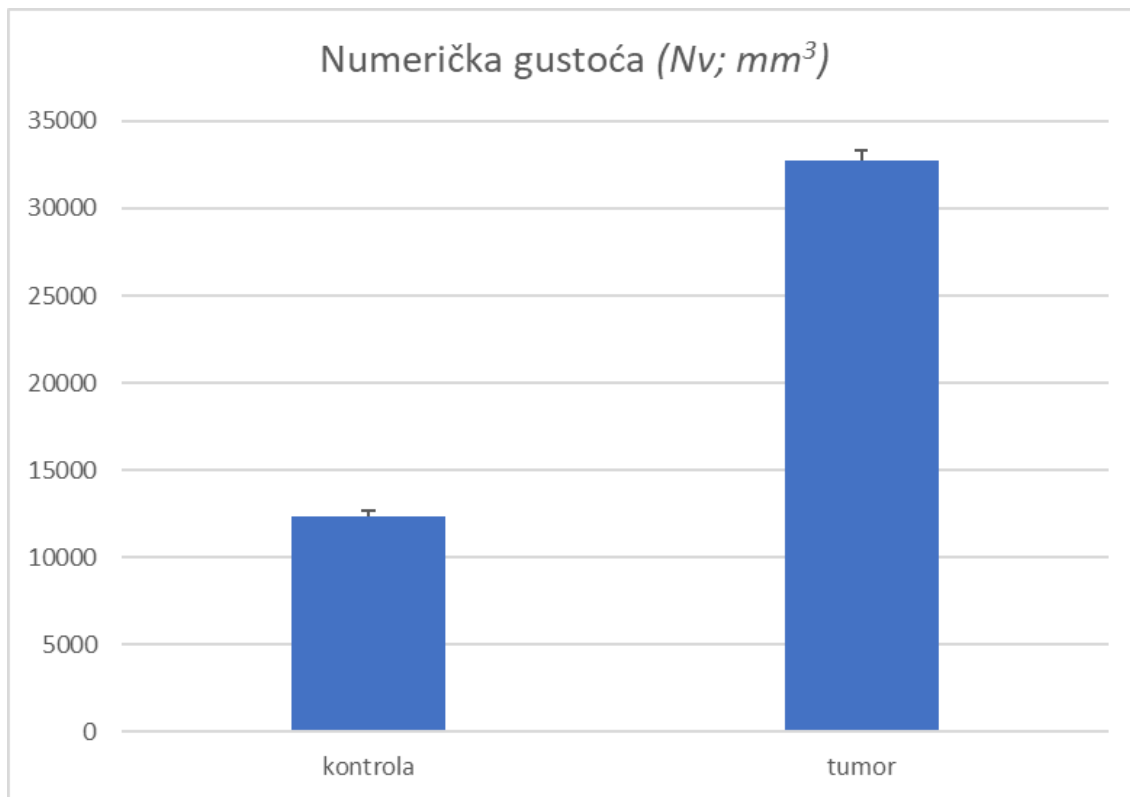
| Skupina                | Srednja vrijednost | Standardna devijacija | Standardna greška |
|------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| Kontrolno zdravo tkivo | 0.02739            | 0.02529               | 0.001309          |
| Tumorsko tkivo         | 0.1022             | 0.05165               | 0.002491          |

U zdravom tkivu želuca subcelularna lokalizacija TCF1 proteina nađena je u jezgri žljezdanih stanica. U tumorskom tkivu lokalizacija je također bila nuklearna. Nađena je statistički značajna razlika u broju TCF1 pozitivnih stanica zdravog tkiva i tumora ( $p < 0,05$ ). Količina ekspresije TCF1 proteina u zdravom tkivu bila je niža u usporedbi s tumorskim tkivom (Slika 2). Taj podatak upućuje da je povećanje ekspresije TCF1 proteina važno obilježje difuznih karcinoma želuca.





Slika 4. Prikaz volumenske gustoće TCF1 antigena u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu



Slika 5. Prikaz numeričke gustoće TCF1 antigena u tumorskom i zdravom kontrolnom tkivu

## 6. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je otkrivanje jednog od mogućih mehanizama koji pridonosi nastanku, razvoju i progresiji difuznih karcinoma želuca. Karcinom želuca ima izrazito visoku smrtnost (u svijetu je na visokom trećem mjestu po uzroku smrti od malignih bolesti) (22), što korelira sa činjenicom da se velik broj slučajeva otkrije tek u kasnijoj fazi bolesti koja ima izrazito ograničene mogućnosti liječenja koji sa sobom nose visoku smrtnost i mogućnost brojne komplikacije za oboljelog. Proučavanjem Wnt signalnog puta, za koji je dokazano da uzrokuje nastanak brojnih neoplazmi, kao što su karcinom dojke, maternice, kolona, prostate, jetre i želuca (36, 37) te maligni astrocitomi mozga (38), postupno se traga za terapijskom mogućnosti ili mogućem otkriću tumorskih markera unutar signalnog puta koji bi poboljšali dijagnostiku i mogućnost izlječenja ovih vrsta karcinoma.

Wnt signalni put se posebice istražuje u tumorskoj patogenezi kolorektalnih adenokarcinoma, koji je jedan od primjera gdje se može uočiti slijed adenom-karcinom te specifične mutacije tumor supresor gena (smatra se da aktivacija Wnt signalnog puta deaktivira gen *APC*) (17). Upravo u ovim vrstama karcinoma su istraženi i TCF/LEF transkripcijski faktori, te je dokazana poveznica između aktivnosti duge nekodirajuće RNA *TCF1* gena (engl. long non coding RNA), koja potiče obnovu karcinomskih matičnih stanica, i vjerojatnosti metastaziranja ne samo kolorektalnog karcinoma, nego i karcinoma pluća malih stanica te hepatocelularnih karcinoma (39, 40). Ova spoznaja je dovela do dodatnih istraživanja kojima bi se osmislio specifičan način liječenja neoplazmi koji bi ciljao određene molekule, kao što je lnc(*TCF1*) (41), te tako omogućila nove mogućnosti u terapijskim postupcima. Također je otkriveno i postojanje mogućeg prognostičkog biomarkera, microRNA-6852 (miR), čija ekspresija suprimira aktivnost gena *TCF1* te tako smanjuje mogućnost metastaziranja i označuje povoljniju prognozu za pacijente.

Marsman i suradnici su na jednom kliničkom istraživanju usporedili pojačanu ekspresiju onkogeno adenokarcinoma jednjaka i želuca, te su otkrili značajno veće nakupljanje  $\beta$ -katenina u jezgri kod obje vrste tumora. Nisu otkrili mutacije gena *TCF1*, što bi značilo da je uzrok pojačane transkripcije upravo nakupljanje  $\beta$ -katenina (42).

Također se istraživanja vrše i na stanicama raka koje su slične matičnim stanicama (engl. cancer stem-like cells; CSLC), te je dokazano da u stanicama raka želuca upravo Wnt signalni put potiče samoobnovu ovih vrsta stanica, te tako stimulira rast i širenje tumora (43). Iako su do sada

znanstvenici proučavali brojne molekule koje bi smanjile aktivnost Wnt signalnog puta, te tako moguće dovele do uništenja CSLC stanica, no nijedna se do sad nije pokazala učinkovita kao buduća terapijska mogućnost (44).

Najnovija istraživanja polažu nade u metode imunoterapije, koja dolazi kao jedna od revolucionarni oblika liječenja jer aktivira (tj. reaktivira) tumorski ciklus imuniteta i tako ponovo daje intrinzičnoj obrani organizma šansu za regulaciju aktivnosti tumorskih stanica (21).

U ovom radu istražena je aktivnost proteina TCF1, koji pripada TCF/LEF obitelji transkripcijskih faktora. Iako je njegova poremećena regulacija primarno zabilježena u leukemijama, pokazalo se da ima i ulogu u drugim vrstama tumora, uključujući i karcinome želuca. Na temelju ovih podataka, zaključili smo da bi se pojačana ekspresija TCF1 proteina mogla naći i u difuznim karcinomima želuca. Imunohistokemijskom analizom je potvrđena naša hipoteza, te je pronađena statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u ekspresiji TCF1 proteina u zdravim stanicama i u tumorskim stanicama. Temeljem ovih podataka dalo bi se pretpostaviti kako povećana aktivnost Wnt signalne kaskade i posljedična nizvodna aktivacija TCF1 proteina, koji je jedan od zadnjih koraka ovog signalnog puta, ima ulogu u patogenezi ove vrste karcinoma (14, 17). Većina uzoraka (preko 90%) uzeta je u kasnijem stadiju bolesti, te tako nije bilo moguće povezati ekspresiju TCF1 transkripcijskog faktora s TNM klasifikacijom tumora.

Do sada nije napravljeno opsežno istraživanje ekspresije TCF1 proteina u difuznim karcinomima želuca, te bi ovo istraživanje i njegovi rezultati moglo biti podloga za daljnje proučavanje mogućih mehanizama tumorogeneze povezane s ovom vrstom tumora.

## **7. ZAKLJUČAK**

U ovome istraživanju smo proveli analizu ekspresije TCF1 proteina u stanicama difuznih karcinoma želuca, te smo zaključili da je izraženost ovog proteina u karcinomima statistički značajno veća nego u zdravom tkivu želuca. Ovi rezultati ukazuju na to da bi TCF1 mogao imati važnu i značajnu ulogu u razvoju ove vrste karcinoma. Potrebno je provesti daljnja istraživanja koja bi tu ulogu definirale i proučile mogućnost korištenja TCF1 proteina u dijagnostičke svrhe ili kao ciljnu molekulu za novije metode imunološkog liječenje malignih bolesti, pa tako i difuznih karcinoma želuca.

## 8. ZAHVALE

Na kraju ovog rada, a s njime i mog studentskog statusa, voljela bih prvotno zahvaliti svojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Tamaru Nikuševa-Martić. Od prvih susreta s njom na seminari iz Medicinske biologije, pa sve do kraja i uspješnog završetka ovog rada pružala mi je neizmjereno povjerenje, razumijevanje i podršku gdje god bih se susrela s problemima. U svakom trenutku sam imala osjećaj da mi je na raspolaganju, upoznala me s temeljima znanstvenog rada i ispravnog prikupljanja podataka te joj zbog toga dugujem beskrajno poštovanje i zahvalu.

Nadalje zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji bi svaki put kad bih došla me dočekali otvorenih ruku i spremni pomoći.

Za kraj, zahvaljujem svojim prijateljima, kolegama, i najvažnije, svojoj obitelji koji su me uvijek tijekom studija znali ohrabriti i reći da nije bitno biti bolji od drugih, bitno je biti bolji od sebe svakoga dana iznova.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25(2):254–64.
2. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9–26.
3. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434:843–50.
4. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: A personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J.* 2012;31(12):2670–84.
5. Nusse R, Varmus HE. Many Tumors Induced by the Mouse Mammary Tumor Virus Contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome. *Cell.* 1982;31:99–109.
6. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homology of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell.* 1987;50(4):649–57.
7. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002;3(1): REVIEWS3001
8. Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway. *Trends Genet.* 2002;16(7):279–83.
9. Kikuchi A. Roles of axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal.* 1999;11(11):777–88.
10. Hrckulak D, Kolar M, Strnad H, Korinek V. TCF/LEF transcription factors: An update from the internet resources. *Cancers (Basel).* 2016;8(7).
11. Barker, N., Clevers H. Wnt signaling and cancer. *BioEssays.* 2000;22(11):961–5.
12. Bauer Andreas, Huber Otmar KR. Pontin52 , an interaction partner of  $\beta$ -catenin , binds to the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:14787–92.
13. Brantjes H, Roose J, Wetering M Van De, Clevers H. All Tcf HMG box transcription

- factors interact with Groucho-related co-repressors. 2001;29(7):1410–9.
14. Roose J, Huls G, Beest M Van, Moerer P, Horn K Van Der, Goldschmeding R, et al. Synergy Between Tumor Suppressor APC and the  $\beta$ -Catenin – Tcf4 Target Tcf1. 1999;285:1923–7.
  15. Verbeek, S., Izon D., Hofhuis F., Robanus Maandag E., te Riele H., van de Wetering M., Oosterwegel M., Wilson A., MacDonald, H.R. CH. An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature*. 1995;374:70–4.
  16. Barra MM, Richards DM, Hansson J, Hofer A-C, Delacher M, Hettinger J, et al. Transcription Factor 7 Limits Regulatory T Cell Generation in the Thymus. *J Immunol*. 2015;195(7):3058–70.
  17. Van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, Haegebarth A, De Palo M, Anti M, et al. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*. 2007;132(2):628–32.
  18. Grosschedl R, Quo RG, Okamura RM, van Genderen C, Parslow TG, Farinas I, et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev*. 2007;8(22):2691–703.
  19. Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, et al. Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling during Embryogenesis in the Mouse. *Mol Cell Biol*. 1998;18(3):1248–56.
  20. Yanai K, Nakamura M, Akiyoshi T, Nagai S, Wada J, Koga K, et al. Crosstalk of hedgehog and Wnt pathways in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(1):145–56.
  21. Wang B, Tian T, Kalland KH, Ke X, Qu Y. Targeting Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling for Cancer Immunotherapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39(7):648–58.
  22. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
  23. Khazaei S, Rezaeian S, Soheylizad M, Khazaei S, Biderafsh A. Global incidence and mortality rates of stomach cancer and the human development index: An ecological study.



- Asian Pacific J Cancer Prev. 2016;17(4):1701–4.
24. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(8):1893–907.
  25. Yusefi AR, Lankarani KB, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.*,. 2018;19:591–603.
  26. Venneman K, Huybrechts I, Gunter MJ, Vandendaele L, Herrero R, Van Herck K. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Europe and the impact of lifestyle on its natural evolution toward stomach cancer after infection: A systematic review. *Helicobacter.* 2018;23(3):1–16.
  27. Hrvatski zavod za javno zdravstvo Registar za rak Republike Hrvatske Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. 2015;(Bilten 40). Dostupno sa: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf)
  28. Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriyama Y, Toyoda T, Cao X. Prevention of gastric cancer: Eradication of *Helicobacter pylori* and beyond. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
  29. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. Diffuse gastric cancer: A summary of analogous contributing factors for its molecular pathogenicity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):1–19.
  30. Laurén P. the Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt At a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
  31. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise ND. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Fourth Edition. 2010.
  32. Damjanov, I., Seiwerth, S., Jukić, S., Nola M. *Patologija.* 4th ed. 2014.
  33. Lee JY, Gong EJ, Chung EJ, Park HW, Bae SE, Kim EH, et al. The Characteristics and Prognosis of Diffuse-Type Early Gastric Cancer Diagnosed during Health Check-Ups. *Gut Liver.* 2017;11(6):807–12.
  34. Guilford P, Hopkins J, Harraway J et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric

- cancer. *Nature*. 1998;392:402–5.
35. Pattison S, Mitchell C, Lade S, Leong T, Busuttil RA, Boussioutas A. Early relapses after adjuvant chemotherapy suggests primary chemoresistance in diffuse gastric cancer. *PLoS One*. 2017;12(9):1–12.
  36. Fodde R, Brabletz T. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):150–8.
  37. Pakula H, Xiang D, Li Z. A Tale of Two Signals : AR and WNT in Development and Tumorigenesis of Prostate and Mammary Gland. 2017;9(14):1–34.
  38. Kafka A, Tomas D, Sukser V. Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. *Histol Histopathol*. 2014;29(12):1557–64.
  39. Jin FUSHU, Wang HMEI, Song XYAN. Long non-coding RNA TCF7 predicts the progression and facilitates the growth and metastasis of colorectal cancer. 2018;6902–8.
  40. Han W, He L, Cao B, Zhao X, Zhang K, Li Y, et al. Differential Expression of LEF1 / TCFs Family Members in Colonic Carcinogenesis. 2017;2381(May):2372–81.
  41. Wu B, Chen M, Gao M, Cong Y, Jiang L, Wei J, et al. Down-regulation of lncTCF7 inhibits cell migration and invasion in colorectal cancer via inhibiting TCF7 expression. *Hum Cell* . 2018; 32(1):31-40.
  42. Marsman WA, Birjmohun RS, Rees BP Van, Caspers E, Offerhaus GJA, Bosma PJ, et al. Loss of Heterozygosity and Immunohistochemistry of Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia. *Clin Cancer Res*. 2004;10:8479–85.
  43. Cai C, Zhu X. The Wnt /  $\beta$  -catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. 2012;5:1191–6.
  44. Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: Can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res*. 2010;16(12):3153–62.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 12.04.1995. u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Kustošija i V.gimnaziju s odličnim uspjehom. Nakon položene državne mature, upisujem 2013. godine Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, te imam status redovnog studenta kroz cijelo studiranje.

Kroz srednju školu i fakultetsko obrazovanje obavljam ljetne i studentske poslove u administraciji i promidžbi, što uvelike pomaže mojoj vještini organizacije i planiranja, te mi proširuje vidike izvan buduće struke. Od 2017. godine radim na projektu istraživanje molekularne patologije difuznih karcinoma želuca, što je i na kraju rezultiralo izradom mog diplomskog rada. Studij završavam 2019. godine u redovnom roku.

Kroz studij sam bila demonstratorica na katedrama Medicinske biologije i Histologije Medicinskog fakulteta. Od 2017. sam urednica u studentskom časopisu Gyrus.

U sklopu izvannastavnih aktivnosti sam sudjelovala u radu udruge studenata medicine CroMSIC. Od svih raznovrsnih aktivnosti bih voljela izdvojiti projekt 'Pogled u sebe' koji drži posebno mjesto u mom srcu i mislim da me naučio barem toliko koliko i cijeli studij medicine. Radi se o pilot projektu za mentalno zdravlje mladih, specifično usredotočen na učenike srednjih škole, koji je započeo 2015. i dosegao velike razmjere stekavši odobrenje i potporu Grada Zagreba i proširivši se čak i izvan njega. U sklopu projekta sam vodila tri razreda srednjih škola kroz radionice, te sudjelovala u osmišljavanju istih. Projekt je 2019. godine dobio rektorovu nagradu.

Od početka studija treniram nekoliko vrsta yoge, od kojih je trenutačna akrobatska yoga, te heklam i pletem.

Engleski učim od svoje treće godine, te ga čitam, razumijem i govorim na C1 razini. Pasivno se koristim njemačkim te se dobro snalazim na osobnom računalu.