

# Uloga proteina GLI u razvoju seroznih karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti

---

Slavica, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:105:554333>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Matea Slavica**

**Uloga proteina GLI u razvoju seroznih  
karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja  
malignosti**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Matea Slavica**

**Uloga proteina GLI u razvoju seroznih  
karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja  
malignosti**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2017.**

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman u sklopu projekta “ Uloga DNA metilacije gena signalnog puta Hedgehog u regulaciji invanzivnosti trofoblasta i tumora“ i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./17.*

## KRATICE KORIŠTENE U RADU:

HGSOC	serozni tumor visokog stupnja malignosti, prema engl. high-grade serous ovarian carcinoma
LGSOC	serozni tumor niskog stupnja malignosti, prema engl. low grade serous ovarian carcinoma
SHH	SHH protein, SHH ligand, prema engl. <i>Sonic Hedgehog</i>
IHH	IHH protein, IHH ligand, prema engl. <i>Indian Hedgehog</i>
DHH	DHH protein, DHH ligand, prema engl. <i>Desert Hedgehog</i>
Ptch	Ptch protein, Ptch tumor supresor, Ptch receptor, prema engl. <i>Patched</i>
Smo	Smo protein, Smo receptor, prema engl. <i>Smoothened</i>
Gas1	Gas1 koreceptor, prema engl Growth arrest-specific 1
Cdo	Cdo koreceptor, prema engl. CAM-related/down-regulated by oncogenes
Boc	Boc koreceptor, prema engl. Brother of Cdo
GLI	GLI protein, GLI transkripcijski čimbenik, prema engl. Glioma- Associated Oncogene
Hh-GLI	Hh-GLI signalni put, prema engl. Hedgehog- Glioma- Associated Oncogene signal pathway
GPCR	G protein vezani receptor, prema engl. G Protein-Coupled Receptor
FIGO	klasifikacija, prama franc. Fédération Internationale deGynécologie et d'Obstétrique

cAMP	cAMP sekundarni glasnik, prema engl. Cyclic adenosine monophosphate
ATP	adenozin trifosfat, prema engl. Adenosine triphosphate
SuFu	SuFu protein, SuFu gen, prema engl. Suppressor Of Fused Homolog
Rep	represorska domena, prema engl. Repressor domain
TAD	transaktivirajuća domena, prema engl. transactivation domain
Ci	Ci protein, Ci gen, prema lat. <i>Cubitus interruptus</i>
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta beta prema engl. Transforming growth factor beta
EGF	epidermalni čimbenik rasta prema engl. Epidermal growth factor
TBS	Tris pufer, prema engl. Tris-buffered saline
DAB	kromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid, prema engl. 3,3'-Diaminobenzidine

## SADRŽAJ

<b>1. SAŽETAK</b>	
<b>2. SUMMARY</b>	
<b>3. UVOD.....</b>	<b>1</b>
3.1. Serozni karcinom jajnika.....	1
3.2. Hedgehog- GLI signalni put.....	3
<b>4. HIPOTEZA.....</b>	<b>9</b>
<b>5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>10</b>
<b>6. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>11</b>
6.1. MATERIJALI.....	11
6.1.1. Preparati tumorskog tkiva jajnika .....	11
6.1.2. Protutijela za imunohistokemijsko bojanje .....	11
6.2. METODE .....	12
6.2.1. Imunohistokemijska metoda prikaza proteina .....	12
6.3. Analiza obojanih rezova .....	13
6.3.1. Statistička analiza podataka .....	14
<b>7. REZULTATI.....</b>	<b>15</b>
7.1. Histopatološke odlike kohorte.....	15
7.2. Ekspresija GLI1 proteina .....	15
7.2.1. Usporedba ekspresije GLI1 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkivu zdravog jajnika .....	15
7.2.2. Usporedba ekspresije GLI1 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i tkivu zdravog jajnika .....	15
7.2.3. Usporedba ekspresije GLI1 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC).....	16
7.2.4. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkiva zdravog jajnika .....	17
7.2.5. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama zdravog jajnika.....	17
7.2.6. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC).....	18
7.3. Ekspresija GLI3 proteina .....	18
7.3.1. Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkivu zdravog jajnika .....	18

7.3.2.	Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i tkivu zdravog jajnika .....	19
7.3.3.	Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) .....	19
7.3.4.	Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i jezgrama zdravog jajnika .....	20
7.3.5.	Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama tkiva zdravog jajnika .....	20
7.3.6.	Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) .....	21
7.4.	Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3.....	21
7.4.1.	Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u tkivu zdravog jajnika .....	21
7.4.2.	Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) .....	22
7.4.3.	Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) .....	24
7.4.4.	Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC).....	24
7.4.5.	Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC).....	26
<b>8.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>27</b>
<b>9.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>30</b>
<b>10.</b>	<b>ZAHVALE .....</b>	<b>31</b>
<b>11.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>32</b>
<b>12.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>36</b>



## 1. SAŽETAK

### Uloga proteina GLI u razvoju seroznih karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti

Matea Slavica

GLI proteini su transkripcijski čimbenici koji djeluju kao medijatori *Hedgehog* signalnog puta. Dosadašnja istraživanja povezuju aberantnu aktivnost tog signalnog puta i disregulaciju GLI proteina sa nastankom brojnih karcinoma među kojima su karcinom dojke, rabdomyosarkom, kolorektalni karcinom, karcinom pankreasa i glioblastom. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ekspresiju proteina GLI1 i GLI3 u seroznim karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti metodom indirektno imunohistokemije. Sakupljeni su uzorci karcinoma jajnika visokog i niskog stupnja malignosti kao i uzorci zdravog tkiva jajnika koji su korišteni kao kontrola. Imunohistokemijski rezultati kvantificirani su stereološkom varijablom volumenske gustoće ( $V_v$ ,  $\text{mm}^0$ ) te su statistički obrađeni. Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti u odnosu na zdravo tkivo jajnika, dok te razlike u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti u odnosu na zdravo tkivo jajnika nije bilo. Također, dobivena je statistički značajno jača ekspresija GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti u odnosu na serozni karcinom jajnika visokog stupnja malignosti. Gledajući ekspresiju u jezgrama, dobivena je statistički značajno jača ekspresija GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma niskog i visokog stupnja malignosti u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika. Štoviše, rezultati pokazuju statistički značajno jaču ekspresiju GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u seroznom karcinomu visokog i niskog stupnja malignosti, tkivu zdravog jajnika te u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnu ulogu *Hedgehog* signalnog puta u razvoju seroznih karcinoma jajnika te bi daljnja istraživanja ne samo pomnije objasnila njihovu ulogu u karcinogenezi već i omogućila njihovo korištenje u dijagnostici i terapiji.

Ključne riječi: *Hedgehog* signalni put, GLI proteini, serozni karcinom jajnika.

## 2. SUMMARY

GLI proteins are transcriptional factors which act as of *Hedgehog* signal pathway mediators. Current research link the occurrence of many carcinomas with aberrant activity of the *Hedgehog* signal pathway. Among these are breast cancer, rhabdomyosarcoma, colorectal cancer, pancreatic cancer and glioblastoma. The goal of this study was to examine the expression of GLI1 and GLI3 proteins in both high and low grade serous ovarian carcinomas using indirect immunohistochemistry. Tissue samples of high and low grade serous ovarian carcinomas were collected as well as samples of healthy ovarian tissue which represented control. The results of immunohistochemistry were quantified using the stereological variable of volumetric density ( $V_v, \text{mm}^0$ ) and were statistically analyzed. Results showed a statistically significant higher expression level of GLI1 and GLI3 in low grade serous carcinoma than in healthy ovarian tissue, while statistically significant difference of expression level in high grade serous ovarian carcinoma was in comparison to healthy ovarian tissue was not found. Furthermore, a statistically significant higher expression level of GLI1 and GLI3 in low grade serous ovarian carcinoma than in high grade serous ovarian carcinoma was obtained. Examining the nuclear expression level, a statistically significant higher expression level of GLI3 in the cell nuclei of low and high grade serous ovarian carcinoma than in the cell nuclei of healthy ovarian tissue was found. Moreover, a statistically significant higher expression level of GLI3 in relation to GLI1 expression level in both low and high grade serous ovarian carcinoma , healthy ovarian tissue and cell nuclei low grade serous carcinoma nuclei was reported. Results of this research emphasize the significant role of *Hedgehog* signal pathway in the development of serous ovarian carcinoma. Moreover, further research could not only more closely clarify the role of GLI proteins in carcinogenesis but also enabled their use in diagnostics and therapy.

**Key words:** *Hedgehog* signal pathway, GLI proteins, serous ovarian carcinoma.

### 3. UVOD

#### 3.1. Serozni karcinom jajnika

Karcinom jajnika peti je po učestalosti smrti od malignih bolesti u žena, a godišnje u svijetu od njega oboli 225.500 žena (1). U Hrvatskoj je stopa incidencije karcinoma jajnika 2013. godine iznosila 19.4/100.000 stanovnika (2). Karcinom jajnika najčešće se otkriva kod žena u perimenopauzi i postmenopauzi. Stope incidencije rastu s dobi te se najviša stopa bilježi kod žena starijih od 85 godina i iznosi 51.0/100.000 žena (2). Godišnje u svijetu od karcinoma jajnika umre 140 200 žena što ga čini najučestalijim uzročnikom smrti među karcinomima ženskog reproduktivnog sustava (1).

Karcinomi jajnika histološki se dijele u nekoliko tipova i podtipova. Epitelni tip karcinoma je najčešći te čini otprilike 90% ukupno dijagnosticiranih karcinoma, dok se ostali tipovi neepitelnih karcinoma dijagnosticiraju u znatno manjem broju i čine ostatak od 10% sveukupnog broja karcinoma ovarija. Histološki podtip epitelnog karcinoma je serozni, koji je ujedno i najčešći, a ostali podtipovi su mucinozni, endometrioidni, karcinom svijetlih stanica, prijelaznih stanica, pločastih stanica, miješani karcinomi te nediferencirani (3). S obzirom na atipiju jezgre i broj mitozu razlikujemo serozne karcinome jajnika visokog (od engl. High-grade serous ovarian carcinoma HGSOC) i niskog stupnja malignosti (od engl. Low grade serous ovarian carcinoma LGSOC) (4).

Podjela seroznih karcinoma jajnika na HGSOC i LGSOC temelji se na različitom podrijetlu nastanka te dvije skupine tumora (5). Pretpostavlja se da LGSOC nastaje dugotrajnom pretvorbom iz seroznog cistadenoma ili adenofibroma kao ishodišne lezije. Benigna ishodišna lezija prelazi u tipični serozni borderline tumor, a zatim u neinvazivni mikropapilarni borderline tumor te na kraju u invazivni mikropapilarni serozni karcinom. LGSOC ima nižu nuklearnu atipiju i slabiju mitotičku aktivnost (6). HGSOC je brzo progresivni karcinom, agresivnijeg rasta te se češće otkriva u kasnoj fazi bolesti i povezan je s lošijim ishodom nego LGSOC (5). Za razliku od LGSOC, u HGSOC nije moguće identificirati ishodišnu leziju te se smatra da nastaje *de novo* ili iz intraepitelnog karcinoma jajovoda (5). U rijetkim slučajevima moguća je pretvorba

LGSOC u HGSOC (5). Između ova dva tipa seroznih karcinoma postoji i molekularno biološka razlika u genskim mutacijama. LGSOC ima karakteristične mutacije *KRAS*, *BRAF* i *ERBB2* gena koji dovode do ubrzane proliferacije tumorskog tkiva djelujući na MAPK (od engl. mitogen-activated protein kinase) (7,8). Tipične mutacije HGSOC zahvaćaju *TP53*, *BRCA1* i *BRCA2* gene (9,10). Mutacije *BRCA1* i *BRCA2* gena povezane su sa nasljednom sklonošću razvoja karcinoma jajnika. *BRCA1* i *BRCA2* mutacije nisu tipične za LGSOC stoga se LGSOC ne povezuje sa nasljednim karcinomom jajnika (5). Karcinomi jajnika u ranoj fazi bolesti uglavnom rastu asimptomatski što predstavlja veliki dijagnostički izazov prilikom otkrivanja karcinoma nižeg stadija. Većina karcinoma dijagnosticira se u višem stadiju kada se počinju javljati simptomi bolesti. U Republici Hrvatskoj je u 2013. godini od ukupno 430 novodijagnosticiranih slučajeva 120 bilo otkriveno u III stadiju po FIGO klasifikaciji (2).

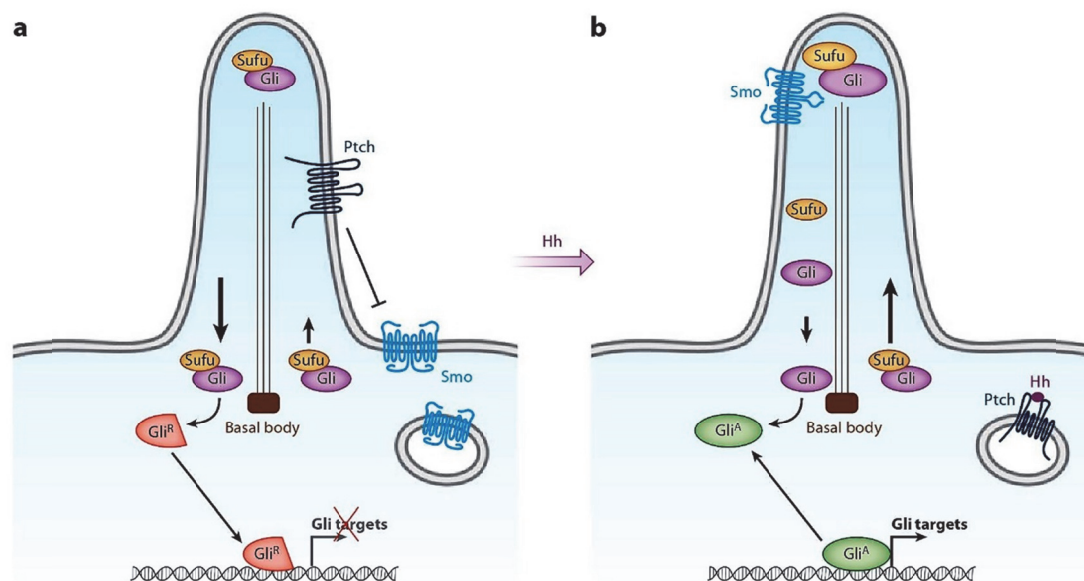
Petogodišnje preživljenje ovisi o histološkom tipu i stadiju bolesti. S obzirom na to da je većina karcinoma otkrivena u uznapredovalom stadiju prosječno petogodišnje preživljenje iznosi 45% (American Cancer Society, 2016)

Liječenje karcinoma jajnika ovisi o brojnim čimbenicima od kojih je najvažniji stadij bolesti. Standard u liječenju operabilnih tumora kod žena starijih od 40 godina je radikalni kirurški zahvat koji se sastoji od obostrane ooforektomije i salpingektomije s histerektomijom. Žene mlađe od 40 godina i one koje žele zadržati svoju reproduktivnu sposobnost mogu biti podvrgnute poštednom zahvatu koji štedi maternicu, kontralateralni jajnik i jajovod. Uz kirurško odstranjenje tumorske mase kao primarna linija liječenja koristi se neoadjuvantna i adjuvantna kemoterapija. Radioterapija se uglavnom koristi u palijativnom liječenju karcinoma ovarija (1).

### 3.2. Hedgehog- GLI signalni put

Hedgehog-GLI signalni put (Hh-GLI) otkriven je 80-ih godina prošlog stoljeća kada je uočen njegov značaj u diferencijaciji, proliferaciji i morfogenezi stanica u razvoju vinske mušice, *Drosophila melanogaster* (11). Hh-GLI je evolucijski konzerviran signalni put te je njegova uloga značajna u embrionalnom razvoju sisavaca uključujući i čovjeka. Aberantna aktivacija Hh-GLI signalnog puta povezana je sa nastankom 30% karcinoma kod ljudi među kojima se navode glioblastom, karcinom bazalnih stanica, karcinom pankreasa, kolorektalni karcinom i karcinom dojke (12).

Aktivacija Hh-GLI signalnog puta (*Slika 1*) počinje vezanjem jednog od tri homologna proteina *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) ili *Desert Hedgehog* (DHH) za transmembranski protein *Patched* (Ptch). Ptch je dokazani tumor supresor koji ima sposobnost inhibicije proteina *Smoothed* (Smo) (13). U sisavaca su pronađene dvije izoforme proteina *Patched*, Ptch1 i Ptch2, od kojih je uloga Ptch2 relativno slabo istražena te se smatra da je Ptch1 više zastupljen u karcinogenezi (14). Kada je za Ptch1 vezan Hh ligand (jedan od tri homologna proteina) on gubi sposobnost inhibicije proteina Smo. Hh proteini mogu se vezati za Ptch1 receptor uz pomoć minimalno jednog od tri koreceptora (15). Koreceptori Gas1 (od engl. Growth arrest-specific 1), Cdo (od engl. CAM-related/down-regulated by oncogenes) i Boc (od engl. Brother of Cdo) sinergistički sudjeluju u složenom mehanizmu moduliranja aktivnosti Hh-GLI signalnog puta. Cdo i Boc su očuvani u brojnih vrsta, od vinske mušice do miša, dok je Gas1 specifičan koreceptorski protein kod kralješnjaka (16). Vezanjem Hh liganda dolazi do promjene lokalizacije Ptch1 i Smo receptora.



*Slika 1. Shematski prikaz aktivacije Hh-GLI signalnog puta.*

(a) U nedostatku Hh liganda Ptch inhibira Smo, a GLI se nalazi vezan za SuFu što uvjetuje stvaranje GLI<sup>R</sup> oblika. (b) Prilikom Hh aktivacije Ptch gubi represivnu ulogu nad Smo što omogućava ulazak Smo u primarnu ciliju i odvajanje GLI od SuFu i stvaranje GLI<sup>A</sup> oblika koji potiče ekspresiju ciljanih gena. Slika je preuzeta i prilagođena prema Hui i Angers (2011), str. 523 (17).

Ptch1 internalizira se u stanicu te na taj način gubi represivnu funkciju nad Smo receptorom. Istovremeno na C-kraju proteina Smo dolazi do fosforilacije koja uvjetuje stvaranje aktivnih dimera te premještanje Smo receptora iz citoplazmatskih vezikula u primarnu ciliju (18).

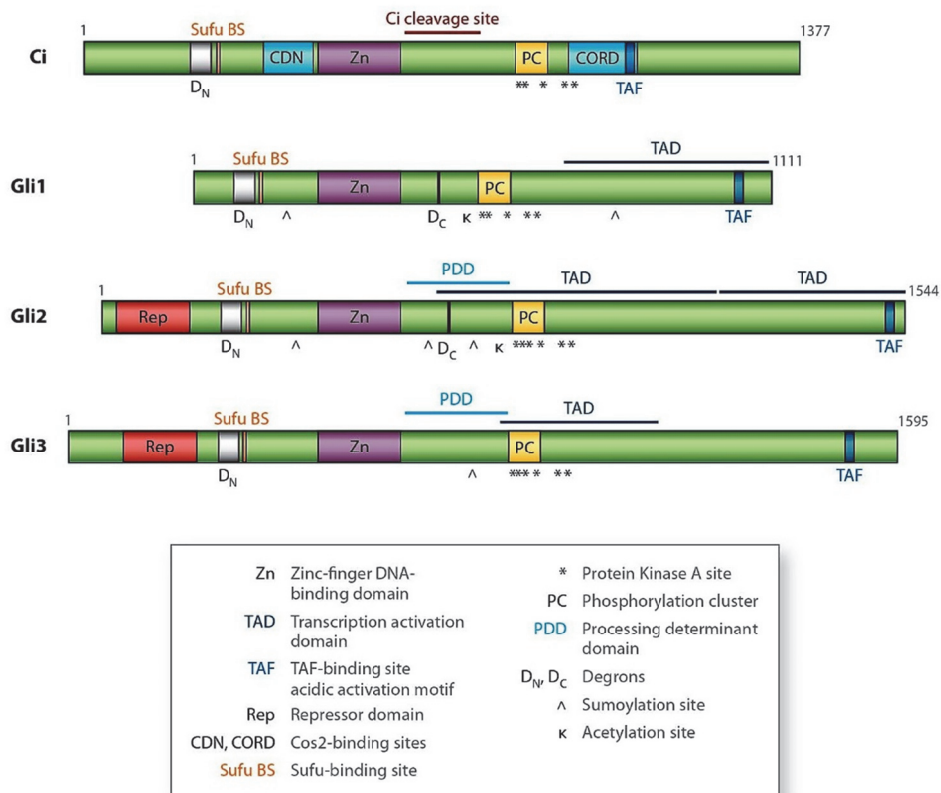
Smo je transmembranski protein sa sedam domena koji je po aminokiselinskom slijedu sličan ostalim proteinima G protein vezanih receptora (GPCR) klase F.(19) U stanicama sisavaca pronađeni su konstitutivno aktivni receptori SmoM2 koji vežu heterotrimerne G proteine i aktiviraju njihovu Gi podjedinicu. Aktivni oblik Smo receptora povećava razinu aktivnosti Gi. U eksperimentalnim ispitivanjima na stanicama miša zabilježena je povećana razina aktivnost i utilizacija Gi podjedinice do 60% prilikom dezinhibicije Smo (20). Aktivirana Gi podjedinica inhibitornim djelovanjem na metabolizam ATP-a smanjuje staničnu koncentraciju cAMP-a (20). Smo može provoditi signal preko Gi podjedinice iako nije vjerojatno da je takav način prijenosa signala dostatan za aktivaciju GLI transkripcijskih čimbenika (20). Smatra se da je glavni način prijenosa signala posredovan fosforilacijom i premještanjem Smo receptora u primarnu ciliju (18).

GLI (od engl. Glioma- Associated Oncogene 1) proteini sastavni su dio Hh-GLI signalnog puta i prvi su puta otkriveni u glioblastomu po kojemu su nazvani. Kod sisavaca postoje tri GLI proteina GLI1, GLI2 i GLI3. Članovi su velike obitelji proteina cinkovih prstiju, a njihova domena ima klasične, Krüppel tip, Cys2His2 strukturne motive (21). GLI proteini imaju funkciju transkripcijskih čimbenika koji se svojom domenom vežu na ciljane dijelove DNA te reguliraju ekspresiju odgovarajućih gena (22).

Iako su strukturno slični, GLI proteini imaju različitu funkciju. GLI2 i GLI3 posjeduju aktivirajuću (C-kraj) i represivnu (N-kraj) domenu te mogu imati ulogu aktivatora ( $GLI^A$ ) ili represora ( $GLI^R$ ) ekspresije ciljanih gena (17). Za razliku od GLI2 i GLI3, GLI1 ima samo aktivirajuću domenu (*Slika 2*) te može isključivo poticati ekspresiju gena (23). Ekspresija gena ovisi o balansu  $GLI^A$  i  $GLI^R$  proteina. Naime, u nedostatku Hh signalnih molekula GLI2 i GLI3 vezani su za SuFu (od engl. Suppressor Of Fused Homolog) koji je negativni regulator Hh signalnog puta (24). On potiče njihovu

proteolizu GLI u proteosomima kojom se stvara GLI<sup>R</sup> oblik. U prisutnosti Hh liganda dolazi do postepene dezinhibicije GLI proteina koji se pretvaraju u GLI<sup>A</sup> oblik što aktivira ekspresiju ciljanih gena (17). Smatra se da je GLI2 glavni aktivator ekspresije GLI1 i ostalih ciljanih gena dok GLI3 uglavnom ima inhibitornu ulogu (17).





Slika 2. Shematski prikaz strukture GLI proteina.

GLI2 i GLI3 posjeduju represivnu (Rep) i aktivirajuću (TAD) domenu dok GLI1 ima samo aktivirajuću (TAD) domenu. Ci (od lat. *Cubitus interruptus*) je ekvivalent GLI proteina u vinske mušice *Drosophila melanogaster*. Slika preuzeta i prilagođena prema prema Hui i Angers (2011), str. 516 (17).

Aberantna aktivacija Hh signalnog puta može se ostvariti na više načina: ligand neovisnim signaliziranjem, ligand ovisnim autokrinim signaliziranjem i ligand ovisnim parakrinim signaliziranjem. Ligand neovisno signaliziranje temelji se na mutacijama dobitka funkcije (od engl. gain-of-function) gena *Smo*, mutacijama gubitka funkcije (od engl. loss-of-function) gena *SuFu* i *Ptch1* te mutacijama krivog smisla (od engl. missense) gena *GLI1* i *GLI3* (25). Temelj ligand ovisnog autokrinog signaliziranja jest autonomna aktivacija stanice gdje povećana proizvodnja Hh liganda djeluje na receptore te iste stanice. U parakrinoj ligand ovisnoj aktivaciji, Hh ligand proizveden u jednoj vrsti stanica djeluje na drugu vrstu stanica. Takva aberantna aktivacija zabilježena je u kolorektalnom karcinomu i epitelnom karcinomu jajnika (25). Nužno je spomenuti i mogućnost nekanonske aktivacije signalnog puta koja je moguća u epitelnim karcinomima. U nekanonskoj aktivaciji TGF- $\beta$  (od engl. Transforming growth factor beta) i EGF (od engl. Epidermal growth factor) preko odgovarajućih receptora potiču stvaranje GLI<sup>A</sup> oblika te ekspresiju gena (26). Preliminarna istraživanja karcinoma jajnika pokazuju povećanu ekspresiju GLI1 proteina kao i *Smo* i *SHH* (27). Također se smatra da su povišene razine GLI1 i *Ptch1* povezane sa lošijim preživljenjem, a prekomjerna razina GLI1 povećava invanzivnost, proliferaciju, mobilnost i promjene u diferencijaciji stanica raka (28). Međutim postoje i konflikti rezultati istraživanja uloge Hh signalnog puta u razvoju epitelnih karcinoma jajnika. Yang i sur. su procjenom važnosti uloge Hh signalnog puta u razvoju epitelnih karcinoma jajnika pokazali da samo manji udio karcinoma ima povećanu ekspresiju Hh signalnog puta (29).

#### **4. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja je da će ekspresija proteina GLI1 biti izraženija u tumorima jajnika visokog stupnja malignosti u usporedbi s tumorima niskog stupnja malignosti, dok će ekspresija proteina GLI3 biti manja.

## **5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Opći cilj ovog istraživanja je ispitati ekspresiju GLI1 i GLI3 proteina u definiranoj kohorti seroznih tumora jajnika visokog i niskog stupnja malignosti.

Specifični cilj istraživanja je:

1. Ispitati ekspresiju proteina GLI1 u seroznim karcinomima jajnika niskog i visokog stupnja malignosti
2. Ispitati ekspresiju proteina GLI3 u seroznim karcinomima jajnika niskog i visokog stupnja malignosti
3. Utvrditi postoji li razlika u ekspresiji proteina GLI1 i GLI3 između ove dvije skupine tumora

## **6. MATERIJALI I METODE**

### **6.1. MATERIJALI**

#### **6.1.1. Preparati tumorskog tkiva jajnika**

Uzorci koji su korišteni u istraživanju su postojeća tkiva (formalin-fiksirana, parafin-uklopljena tkiva tumora jajnika) prethodno prikupljena u dijagnostičke svrhe. Uzorci su dio zbirke tumorskih uzoraka koji pripadaju Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a koji su već prikupljeni iz baze KB Merkur u suradnji s doc. dr. sc. Anitom Škrtić, dr. med.

Preparate čine histološki rezovi tumorskog tkiva jajnika uz koje se nalazi pridruženo zdravo tkivo jajnika (kontrola). Istraživanje se radilo na ukupno 53 uzorka seroznih karcinoma jajnika od kojih je 11 uzoraka seroznih karcinoma niskog stupnja malignosti, a 42 uzorka seroznih karcinoma visokog stupnja malignosti.

U istraživanju su korišteni i preparati tkiva zdravog jajnika koji su odstranjeni zbog drugih ne-ginekoloških indikacija.

#### **6.1.2. Protutijela za imunohistokemijsko bojanje**

Primarna protutijela korištena u ovom istraživanju su poliklonalna protutijela: GLI1 (engl. rabbit polyclonal anti-human; Clone: ab-92611, Abcam, Cambridge, MA, razrjeđenje 1:200) i GLI3 (engl. rabbit polyclonal anti-human; Clone: ab-117099, Abcam, Cambridge, MA, razrjeđenje 1:1000).

## 6.2. METODE

### 6.2.1. Imunohistokemijska metoda prikaza proteina

Imunohistokemijska analiza provedena da bi se ustanovila razina ekspresije i stanična lokalizacija proteina GLI1 i GLI3. Parafinski uklopljeni rezovi uzoraka debljine 4- $\mu$ m postavljeni su na silanizirana predmetna stakla (DakoCytomation, Denmark). Korištena su primarna poliklonska protutijela: GLI1 (engl. rabbit polyclonal anti-human; Clone: ab-92611, Abcam, Cambridge, MA, razrjeđenje 1:200) i GLI3 (engl. rabbit polyclonal anti-human; Clone: ab-117099, Abcam, Cambridge, MA, razrjeđenje 1:1000). Prije imunohistokemijskog bojanja uzorci su deparafinizirani i rehidrirani provođenjem kroz niz ksilola u trajanju od četiri puta po 10 minuta, apsolutnog i 96%-tnog alkohola u trajanju od dva puta po 5 minuta, 70%-tnog alkohola u trajanju od 2 minute, te destilirane vode u trajanju od 30 sekundi. Deparafinizirani i rehidrirani rezovi uzoraka zagrijavani su u Dako Target Retrieval Solution (Dako Corporation, USA) u mikrovalnoj pećnici dva puta po 10 minuta na 600 W zbog demaskiranja epitopa. Preparati su zatim tretirani s 3%-tnom otopinom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minuta radi inaktivacije endogene peroksidaze. Slijedilo je ispiranje u puferu TBS dva puta po 3 minute. Uzorci su, nakon opisane pripreme, tretirani optimalno razrijeđenim primarnim protutijelom (GLI1 i GLI3) preko noći na temperaturi od 4 °C. Nakon inkubacije, uzorci su dva puta po 3 minute ispirani u puferu TBS. Za detekciju primarnog protutijela korišten je Dako REAL Envision detection system (DakoCytomation, Carpinteria, USA; K500711) u vlažnoj komori kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi. Cijeli proces vizualiziran je, u trajanju od 10 minuta, supstrat-kromogen otopinom u kojoj kao supstrat služe koncentrirani Tris-HCl pufer i 0,8%-tna otopina vodikovog peroksida, a kao kromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Navedena otopina ispirana je vodovodnom vodom, a potom destiliranom vodom.

Primjena ovog supstrat-kromogen kompleksa rezultirala je nastajanjem netopivog smeđeg precipitata na antigenskom mjestu. Zatim su uzorci kontrastirani hemalaunom u kojem su se bojili 1 minutu. Nakon toga, uzorci su ispirani 5 minuta u vodovodnoj vodi 30 sekundi u destiliranoj vodi, te su dehidrirani provođenjem kroz uzlazni niz etilnog alkohola (70%EtOH i 96%EtOH) u trajanju od 5 sekundi, a zatim u

apsolutnom alkoholu prvi puta 1 minutu te drugi puta 2 minute. Preparati su zatim izbistreni uranjanjem u ksilol dva puta po 5 minuta. Obrada je završila poklapanjem pokrovnim stakalcem i medijem za pokrivanje koji se koristi u rutinskoj histološkoj dijagnostici. Negativna kontrola tijekom eksperimenta je bila uzorak koji nije inkubiran s primarnim protutijelom tijekom imunohistokemije.

### **6.3. Analiza obojanih rezova**

Dobiveni imunohistokemijski rezultati analizirani su stereologijom pomoću Weibleovog mnogonamjenskog sistema s 42 testne točke. Preliminarno mjerenje napravljeno je za svaki analizirani protein i za svaku analiziranu skupinu. Veličina uzorka određena je nakon analize uzorka na 10 polja i uz 95%-tni interval povjerenja prema formuli: „n“ =  $(200/y \cdot s/x)^2$  gdje je „n“ broj polja koje treba analizirati, x je aritmetička sredina orijentacijskog uzorka, s je standardna devijacija orijentacijskog uzorka i y je dopušteno odstupanje od rezultata aritmetičke sredine. Izmjerena je volumenska gustoća pozitivnih stanica (volumenski udio pozitivnih stanica u jedinici volumena ( $1\mu\text{m}^3$ ), odnosno postotak proučavane faze u jedinici volumena). Mjerenje volumenske gustoće izračunava se prema formuli:  $V_v = P_f/P_t$  gdje je  $V_v$  volumenska gustoća mjerene strukture,  $P_f$  broj točaka koje padaju na mjerenu strukturu,  $P_t$  broj svih točaka unutar referentnog prostora. Testna ravnina prekrivana je testnim sistemom sa skupom linija. Testni sistem izabiran je tako da profil tipične čestice bude pogođen s testnom linijom jedanput ili najviše dvaput, odnosno da je prosječna površina profila tipične čestice malo manja ili najviše jednako velika kao d testnog sistema. Mnogonamjenski testni sistem (kao što je M 42 Weibel) ima unutar testne plohe  $A_t$  određen broj dužina duljine d. Krajevi svih dužina su testne točke, a sve dužine zajedno sastavljaju testnu liniju ukupne duljine  $L_t$ . Mnogonamjenski testni sistem s 21 linijom ima 42 testne točke.

### **6.3.1. Statistička analiza podataka**

U statističkoj obradi dobivenih podataka korištena je srednja vrijednost, standardna pogreška i medijan, a razlike između proučavanih skupina analizirane su Mann-Whitney testom. Kao značajna razlika na razini stupnja vjerojatnosti priznala se  $p < 0,05$ . Distribucija podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, Lilliefors testa i Shapiro-Wilks W-testa. Za statističku analizu korišten je program GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).



## 7. REZULTATI

Ukupno je analizirano 53 uzoraka seroznih karcinoma jajnika visokog (HGSOC) i niskog stupnja malignosti (LGSOC) koji su imunohistokemijski pobožani na GLI1 i GLI3 protutijelo. Kao kontrola koristilo se tkivo zdravih jajnika koji su odstranjeni zbog druge, ne-ginekološke etiopatologije. Rezultati su prikazani tablično.

### 7.1. Histopatološke odlike kohorte

Uzorke ukupno čini 53 seroznih adenokarcinoma jajnika od kojih su 42 HGSOC i 11 LGSOC. Tkivo 9 zdravih jajnika koristilo se kao kontrolno tkivo za usporedbu ekspresije analiziranih proteina.

### 7.2. Ekspresija GLI1 proteina

#### 7.2.1. Usporedba ekspresije GLI1 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkivu zdravog jajnika

Ekspresija proteina GLI1 u seroznim karcinomima niskog stupnja malignosti kao i u zdravim kontrolama jajnika izražena je kao medijan i prikazana u tablici 1.

*Tablica 1. Usporedba seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI1
LGSOC	11	0.4333
Kontrola	9	0.1565
Ukupno	20	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u skupini pacijentica oboljelih od LGSOC u odnosu na tkivo zdravog jajnika ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test).

#### 7.2.2. Usporedba ekspresije GLI1 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i tkivu zdravog jajnika

U Tablici 2 prikazana je usporedba volumenske gustoće ( $V_v, \text{mm}^0$ ) ekspresije GLI1 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 2. Usporedba seroznog karcinoma visokog stupnja malignosti (HGSOC) i tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI1
HGSOC	42	0.1976
Kontrola	9	0.1565
Ukupno	51	

Ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji GLI1 u skupini pacijentica oboljelih od HGSOC u odnosu na tkivo zdravog jajnika ( $p= 0.2006$ , Mann-Whitney test).

### **7.2.3. Usporedba ekspresije GLI1 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC)**

U Tablici 3 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 u analiziranim uzorcima.

*Tablica 3. Usporedba seroznog karcinoma visokog (HGSOC) niskog (LGSOC) stupnja malignosti.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI1
HGSOC	42	0.1976
LGSOC	11	0.4333
Ukupno	53	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u LGSOC u odnosu na HGSOC ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test).

#### **7.2.4. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkiva zdravog jajnika**

U Tablici 4 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 antigena u jezgrama analiziranih uzoraka.

*Tablica 4. Usporedba ekspresije proteina GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI1
LGSOC jezgra	11	0.1333
Kontrola jezgra	9	0.0
Ukupno	20	

U jezgrama tkiva zdravog jajnika nismo uopće detektirali prisutnost GLI1 antigena dok je njegov medijan ekspresije u LGSOC tumorima bio 0.05556. Od ukupno 11 uzoraka tumora jajnika niskog stupnja malignosti, njih 10/11 (90,91%) je pokazivalo ekspresiju ovog antigena u svojim jezgrama.

#### **7.2.5. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama zdravog jajnika**

U Tablici 5 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 u analiziranim uzorcima.

*Tablica 5. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI1
HGSOC jezgra	42	0.03030
Kontrola jezgra	9	0.0
Ukupno	51	

U jezgrama tkiva zdravog jajnika nismo uopće detektirali prisutnost GLI1 antigena dok je njegov medijan ekspresije u HGSOC tumorima bio 0.04762. Od ukupno 42 uzorka tumora jajnika visokog stupnja malignosti, njih 40/42 (95,24%) je pokazivalo ekspresiju ovog antigena u svojim jezgrama.

### 7.2.6. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC)

U Tablici 6 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 u analiziranim uzorcima.

*Tablica 6. Usporedba ekspresije GLI1 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC).*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI1
HGSOC jezgra	42	0.03030
LGSOC jezgra	11	0.1333
Ukupno	53	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u jezgrama LGSOC tumora u odnosu na jezgre HGSOC tumora ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test).

### 7.3. Ekspresija GLI3 proteina

#### 7.3.1. Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkivu zdravog jajnika

Pozitivnu kontrolu čini zdravo tkivo jajnika. Ekspresija GLI3 je izražena kao medijan (Tablica 7).

*Tablica 7. Usporedba seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI3
LGSOC	11	0.5000
Kontrola	9	0.3810
Ukupno	20	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u LGSOC u odnosu na zdravo tkivo jajnika ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test).

### 7.3.2. Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i tkivu zdravog jajnika

U Tablici 8 prikazana je usporedba brojčano prikazanih dobivenih rezultata ekspresije GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 8. Usporedba seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI3
HGSOC	42	0.4324
Kontrola	9	0.3810
Ukupno	51	

Ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji GLI3 u skupini pacijentica oboljelih od HGSOC u odnosu na zdravo tkivo jajnika ( $p=0.1169$ , Mann-Whitney test).

### 7.3.3. Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC)

U Tablici 9 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI3 u analiziranim uzorcima.

*Tablica 9. Usporedba ekspresije GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC).*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI3
HGSOC	42	0.4324
LGSOC	11	0.5000
Ukupno	53	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u LGSOC u odnosu na HGSOC tumore ( $p<0.0001$ , Mann-Whitney test).

#### 7.3.4. Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i jezgrama zdravog jajnika

U Tablici 10 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 10. Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC) i ekspresije u jezgrama tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI3
LGSOC jezgra	11	0.3750
Kontrola jezgra	9	0.1579
Ukupno	20	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u jezgrama LGSOC tumora u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test).

#### 7.3.5. Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama tkiva zdravog jajnika

U Tablici 11 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 11. Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i ekspresije u jezgrama tkiva zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI3
HGSOC jezgra	42	0.2957
Kontrola jezgra	9	0.1579
Ukupno	51	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u jezgrama HGSOC tumora u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test).

### 7.3.6. Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC) i jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC)

U Tablici 12 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 12. Usporedba ekspresije GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog (HGSOC) i niskog (LGSOC) stupnja malignosti.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija GLI3
HGSOC jezgra	42	0.2957
LGSOC jezgra	11	0.3750
Ukupno	53	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u jezgrama LGSOC tumora u odnosu na jezgre HGSOC ( $p=0.0005$ , Mann-Whitney test)

### 7.4. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3

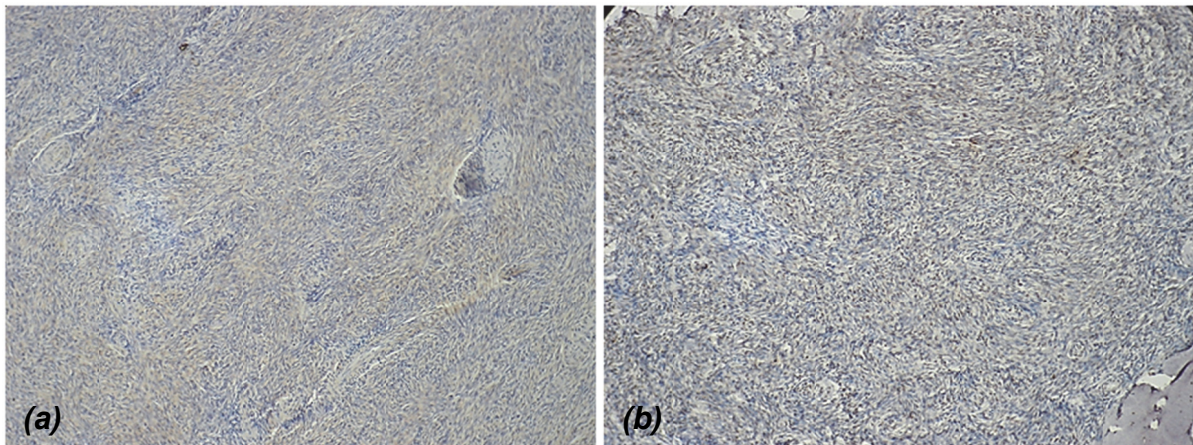
#### 7.4.1. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u tkivu zdravog jajnika

U Tablici 13 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 i GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 13. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u tkivu zdravog jajnika.*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija
Kontrola GLI1	9	0.1565
Kontrola GLI3	9	0.3810
Ukupno	18	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u tkivu zdravog jajnika ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test). Na *Slici 3.* može se vidjeti ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u tkivu zdravog jajnika.



*Slika 3. Imunohistokemijska ekspresija proteina GLI 1 i GLI3 u tkivu zdravog jajnika  
Usporedba ekspresije (a) GLI1 i (b) GLI3 u tkivu zdravog jajnika pokazuje veću  
ekspresiju GLI3 proteina (x10).*

#### **7.4.2. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC)**

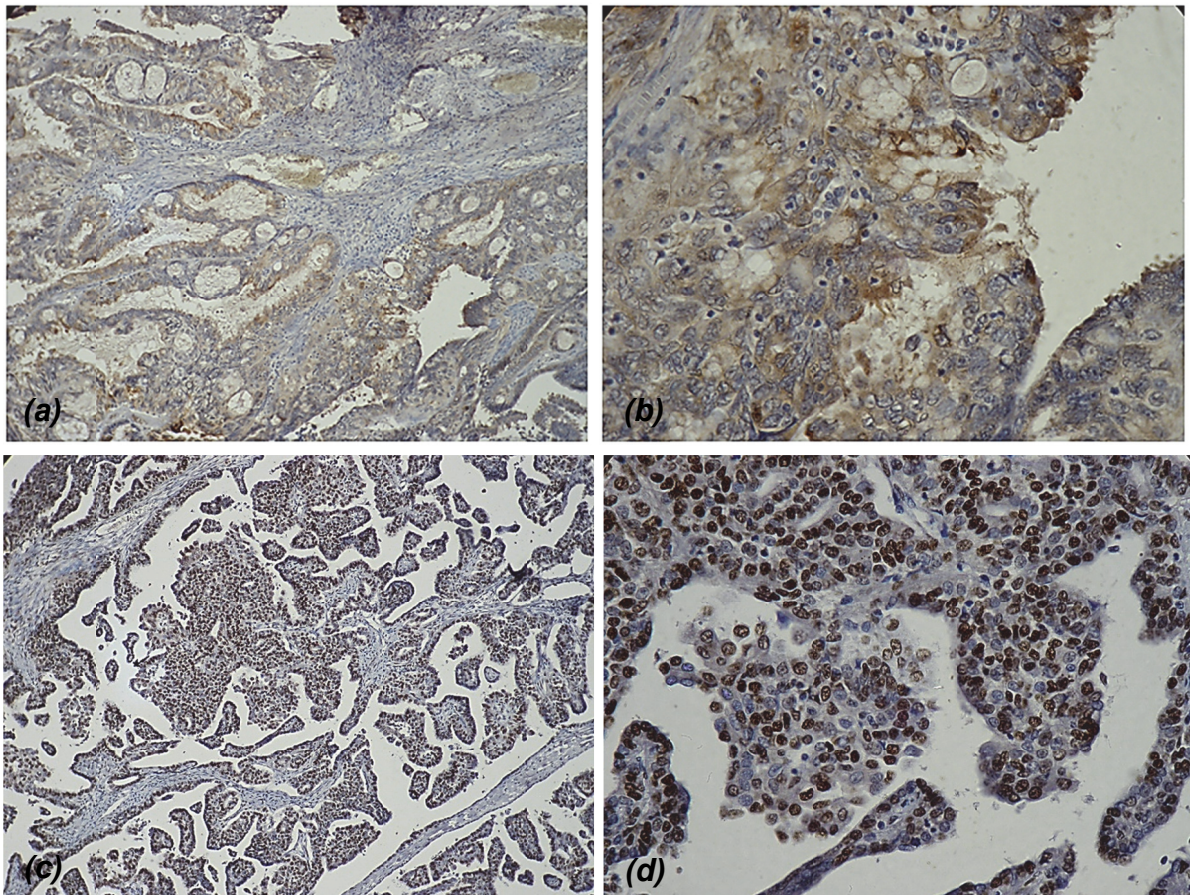
U Tablici 14 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 i GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 14. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC).*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija
LGSOC GLI1	11	0.4333
LGSOC GLI3	11	0.5000
Ukupno	22	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u LGSOC tumorima ( $p=0.0031$ , Mann-Whitney test). Ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u LGSOC može se vidjeti i na *Slici 4*.





*Slika 4. Imunohistokemijska ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u LGSOC*

*Usporedba ekspresije GLI1 u LGSOC (a) povećanje x10 i (b) x40 u odnosu na GLI3 (c) povećanje x10 i (d) x40 pokazuje jaču ekspresiju GLI3 proteina lokaliziranog pretežno u jezgrama dok se GLI1 nalazi većinom u citoplazmi.*

#### 7.4.3. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC)

U Tablici 15 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 i GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 15. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika niskog stupnja malignosti (LGSOC).*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija
LGSOC jezgra GLI3	11	0.3750
LGSOC jezgra GLI1	11	0.1333
Ukupno	22	

Statistički je značajno veća ekspresija GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u jezgrama LGSOC ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test) (*Slika 4.*).

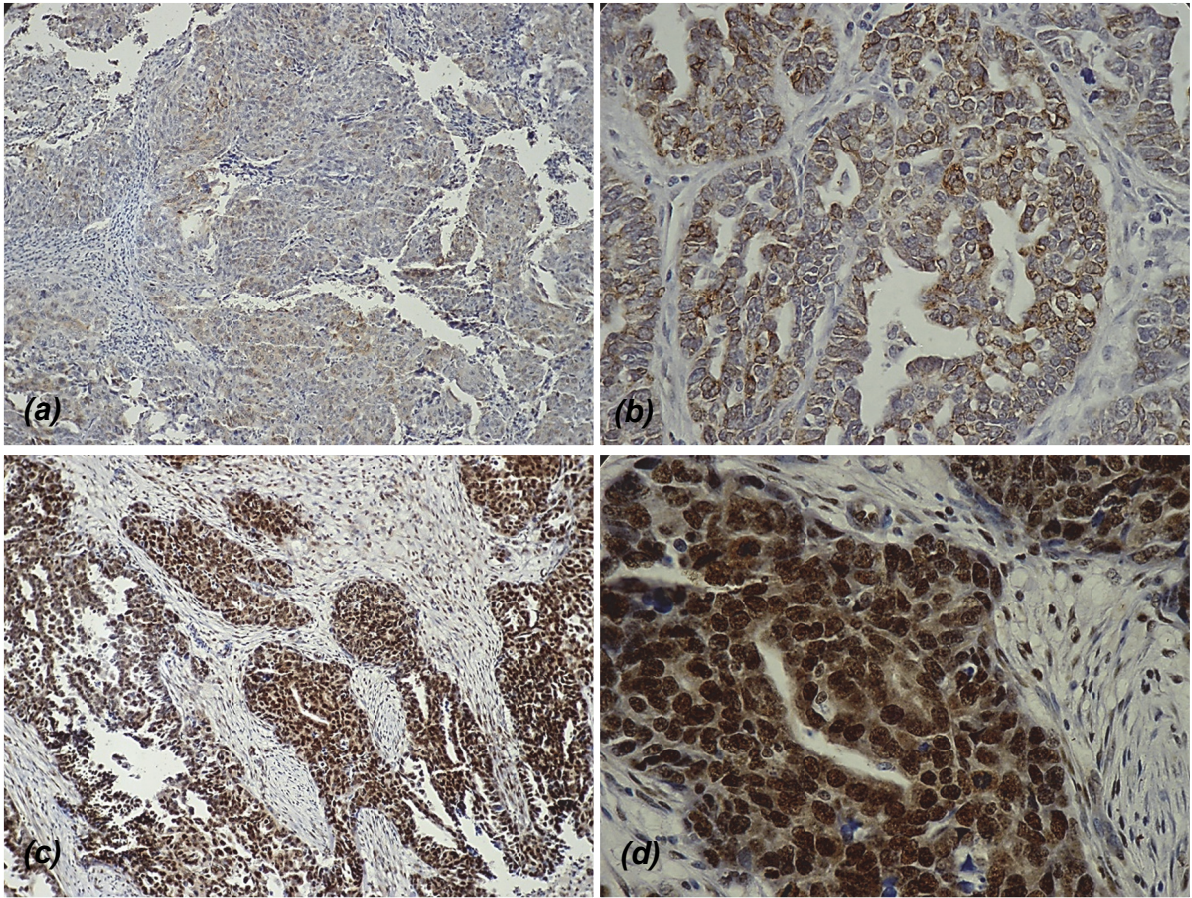
#### 7.4.4. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC)

U Tablici 16 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 i GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 16. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC).*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija
HGSOC GLI1	42	0.1976
HGSOC GLI3	42	0.4324
Ukupno	84	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u HGSOC ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test). Na *Slici 5.* Prikazana je ekspresija ova dva proteina u seroznim karcinomima jajnika visokog stupnja malignosti.



*Slika 5. Imunohistokemijska ekspresija proteina GLI1 i GLI3 u HGSOc.*

*Usporedba ekspresije GLI1 u HGSOc (a) povećanje x10 i (b) x40 u odnosu na ekspresiju GLI3 (c) povećanje x10 i (d) x40 pokazuje jaču ekspresiju GLI3.*

#### 7.4.5. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC)

U Tablici 17 brojčano su prikazani dobiveni rezultati ekspresije GLI1 i GLI3 antigena u analiziranim uzorcima.

*Tablica 17. Usporedba ekspresije GLI1 i GLI3 u jezgrama seroznog karcinoma jajnika visokog stupnja malignosti (HGSOC).*

Status	Broj uzoraka	Ekspresija
HGSOC jezgra GLI1	42	0.03030
HGSOC jezgra GLI3	42	0.2957
Ukupno	84	

Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u jezgrama HGSOC ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test) (*Slika 5.*).

## 8. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li razlika u razini ekspresije proteina GLI1 i GLI3 u seroznom karcinomu visokog i niskog stupnja malignosti te u tkivu zdravog jajnika. Pretpostavili smo da će GLI1, kao glavni aktivator signalnog puta, biti značajno više ekspimiran u seroznom karcinomu visokog stupnja malignosti nego u seroznom karcinomu niskog stupnja malignosti, a najmanju ekspresiju imati će u zdravom tkivu jajnika. GLI3, glavni inhibitor signalnog puta, bi trebao biti više ekspimiran u seroznom karcinomu niskog stupnja malignosti nego u seroznom karcinomu visokog stupnja malignosti. Recentna istraživanja pokazuju različite rezultate povezanosti aberantne aktivacije *Hedgehog* signalnog puta sa nastankom karcinoma jajnika. Pojedina istraživanja ukazuju na važnost aberantne aktivacije *Hedgehog* signalnog puta u procesima stanične proliferacije i karcinogeneze te ističu povezanost povišene ekspresije GLI1 s lošijim preživljenjem kod oboljelih od epitelnog karcinoma jajnika (28) dok drugi autori smatraju da povećana aktivnost *Hedgehog* signalnog puta kao ni ekspresija GLI proteina nije učestala u razvoju epitelnih karcinoma jajnika (29).

Rezultati rada pokazuju statistički značajno jaču ekspresiju GLI1 u LGSOC karcinomima u odnosu na tkivo zdravog jajnika što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima koja povezuju prekomjernu ekspresiju GLI1 sa nastankom karcinoma jajnika. Međutim, nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji GLI1 u skupini pacijentica oboljelih od HGSOE u odnosu na tkivo zdravog jajnika. Također, statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u LGSOC tumorima u odnosu na HGSOE tumore. Iako se u nekim istraživanjima ističe važnost GLI1 kao negativnog prognostičkog čimbenika postoje istraživanja koja su oprečna toj tvrdnji, tako Yang i sur. u svom istraživanju navode da tek približno 26% svih epitelnih karcinoma ima povišenu ekspresiju GLI1 (29).

Uspoređujući ekspresiju GLI1 po lokalizaciji proteina u stanicama, nađena je statistički značajno jača ekspresija GLI1 u jezgrama LGSOC tumora u odnosu na jezgre HGSOE tumora. Također, oba tumora pokazuju statistički značajno jaču ekspresiju u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika. Ovi rezultati mogu označavati povećanu aktivnost *Hedgehog* signalnog puta u stanicama karcinoma kad se aktivni oblik GLI1 (GLI1<sup>A</sup>) premješta u jezgru kako bi započeo ekspresiju ciljanih gena (17).

Isto tako, u odnosu na zdravo tkivo jajnika, statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u LGSOC u odnosu na HGSOC tumore i zdravo tkivo jajnika što je u skladu sa očekivanjima. Usporedbom HGSOC tumora i zdravog tkiva jajnika nije nađena značajna razlika. Točan mehanizam djelovanja GLI3 u nastanku karcinoma jajnika nije ustanovljen ali smatra se da GLI3, iako je primarno supresor *Hedgehog* signalnog puta, može imati i aktivirajuću ulogu (17). Daljnjim istraživanjem egzaktne uloge GLI3 proteina u nastanku epitelnih karcinoma jajnika moglo bi se ponuditi objašnjenje dobivenih rezultata.

Rezultati usporedbe GLI3 po lokalizaciji u stanicama pokazuju da je statistički značajno jača ekspresija GLI3 u jezgrama LGSOC i HGSOC u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika. Ti rezultati ukazuju na povećanu aktivnost *Hedgehog* signalnog puta. Naime, u nedostatku aktivacije signalnog puta ligandom, većina GLI3 proteina nalazi se vezana za SuFu u citoplazmi (24,30). Usporedbom ekspresije GLI3 u jezgrama LGSOC i HGSOC nije nađena značajna razlika. Razjašnjenje egzaktne uloge GLI3 bi moglo dati objašnjenje ovih rezultata.

U LGSOC karcinomima je značajno veća ekspresija GLI3 nego GLI1 proteina što je u skladu sa očekivanjima. Također, rezultati pokazuju da je u HGSOC veća ekspresija GLI3 što je u suprotnosti sa istraživanjima koja navoda ja je GLI1 povezan sa većim malignim potencijalom i invanzivnošću (28). Međutim, pojedina istraživanja navode da univarijantnom analizom podataka nije nađena korelacija ekspresije GLI1 sa gradusom tumora kao ni sa ostalim kliničko-patološkim karakteristikama (31).

Rezultati pokazuju statistički značajno jaču ekspresiju GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u tkivu zdravog jajnika što je u skladu sa očekivanjima, a može se objasniti neaktivnošću signalnog puta kad ne dolazi do stvaranja GLI1 proteina dok se GLI3 nalazi pretežno u citoplazmi (17).

Usporedbom ekspresije GLI proteina po lokalizaciji u stanicama LGSOC tumora dobivena je značajno jača ekspresija GLI3 u odnosu na GLI1. Isti rezultati su dobiveni u HGSOC tumora gdje je GLI3, također, bio značajno više eksprimiran od GLI1. U mnogim istraživanjima se navodi da je GLI1 uglavnom lokaliziran u citoplazmi iako se ponekad može pronaći jednolično raspoređen u stanicama (31,32).

Poznavanje molekularne uloge određenih signalnih puteva uvelike pridonosi boljem razumijevanju nastanka karcinoma kao i učinkovitijim strategijama liječenja. Uloga *Hedgehog* signalnog puta prepoznata je kao čimbenik razvoja mnogih karcinoma. Amplifikacija GLI1 i mutacije gubitka funkcije *Ptch1* povezane su s nastankom meduloblastoma i rabdomiosarkoma (33). Također, smatra se da povišena ekspresija GLI1 ima značajnu ulogu u razvoju karcinoma dojke te da kolerira sa ekspresijom estrogenskih receptora (34). Primjenom inhibitora *Hedgehog* signalnog puta otvaraju se mogućnosti nove strategije liječenja. Zabilježena je značajna inaktivacija medijatora *Hedgehog* signalnog puta i smanjenje tumorske mase primjenom ciklopamina, inhibitora *Smo* (33). Povećana apoptoza, smanjenje staničnog rasta i mobilnosti te invanzivnosti zabilježeni su primjenom ciklopamina u pretkliničkim istraživanjima na staničnim kulturama karcinoma ovarija (27,28). Iako točan mehanizam ostaje nepoznat, smatra se da GLI3 može povećati otpornost karcinoma na terapiju ciklopaminom što ukazuje na moguću važnost razvoja supresora GLI3 koji bi zajedno sa ciklopaminom omogućili bolju terapiju bolesti (35).

Uzevši u obzir sve navedeno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da aberantna aktivnost *Hedgehog* signalnog puta ima određenu ulogu u razvoju seroznih karcinoma jajnika, međutim, nije nađena povezanost u ekspresiji GLI1 i HGSOC što otvara mogućnost aktivacije *Hedgehog* signalnog puta u ovisnosti o staničnom mikrookolišu gdje u nekim stanicama i tkivima postoje povoljni uvjeti za njegovu aktivaciju, a u nekima ne. Daljnja istraživanja uloge *Hedgehog* signalnog puta nužna su kako bi se pomnije dokazali mehanizmi njegovog djelovanja na razvoj karcinoma te ponudile učinkovitije terapijske mogućnosti.

## 9. ZAKLJUČCI

Analizom proteina GLI1 i GLI3, transkripcijskih čimbenika *Hedgehog* signalnog puta, u seroznim karcinomima jajnika visokog i niskog stupnja malignosti, došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u LGSOC u odnosu na HGSOC tumore i tkivo zdravog jajnika dok ne postoji statistička značajna razlika u ekspresiji GLI1 u skupini pacijentica oboljelih od HGSOC u odnosu na tkivo zdravog jajnika.
2. Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u jezgrama LGSOC i HGSOC u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika
3. Statistički je značajno jača ekspresija GLI1 u jezgrama LGSOC tumora u odnosu na jezgre HGSOC tumora.
4. Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u LGSOC u odnosu na HGSOC i tkivo zdravog jajnika dok ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji GLI3 u skupini pacijentica oboljelih od HGSOC u odnosu na tkivo zdravog jajnika.
5. Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u jezgrama LGSOC i HGSOC u odnosu na jezgre tkiva zdravog jajnika dok je u jezgrama LGSOC ekspresija GLI3 statistički značajno veća nego u jezgrama HGSOC.
6. Statistički je značajno jača ekspresija GLI3 u odnosu na ekspresiju GLI1 u LGSOC, HGSOC, zdravim jajnicima kao i u jezgrama LGSOC.



## **10. ZAHVALE**

Zahvaljujem se voditeljici rada prof. dr. sc. Ljiljani Šerman na savjetima, trudu i pomoći prilikom nastajanja ovog rada.

Zahvaljujem se mag. mol. biol. Valentini Karin na uloženom trudu i za pomoć pri radu imunohistokemijskih metoda.

Zahvaljujem mojoj obitelji i Raulu na podršci.

## 11. LITERATURA

1. Pötter R, Liu S, Liu B, Gouvy S, Lax S, Leblanc E, et al. Gynaecological cancers. In: Kerr DJ, Haller DG, Velde CJH van de, Baumann M, editors. Oxford textbook of oncology. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2016. p. 576–601.
2. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. [Internet]. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2015. Available from: [www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-nadzor-i-istrazivanje-ne-zaraznih-bolesti/odsjek-za-zlocudne-bolesti-s-registrom-za-rak/](http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-nadzor-i-istrazivanje-ne-zaraznih-bolesti/odsjek-za-zlocudne-bolesti-s-registrom-za-rak/)0APublisher:
3. Schmid S, Bieber M, Zhang F, Zhang M, He B, Jablons D, et al. Wnt and Hedgehog Gene Pathway Expression in Serous Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(6):975–80.
4. Rosen D, Yang G, Liu G, Mercado-Uribe I, Chang B, Xiao X (Sherry), et al. Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci*. 2009;14(January):2089–102.
5. Vang R, Shih I-M, Kurman RJ. OVARIAN LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS CARCINOMA: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems.”. *Advances Anat Pathol*. 2009;16(5):267–82.
6. Singer G, Kurman RJ, Chang H, Cho SKR, Shih I. Diverse Tumorigenic Pathways in Ovarian Serous Carcinoma. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1223–8.
7. Singer G, Ili RO, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS Characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(6):484–6.
8. Sieben NLG, Macropoulos P, Roemen GMJM, Kolkman-uljee SM, Jan G, Houmadi R, et al. In ovarian neoplasms , BRAF , but not KRAS , mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol*. 2004;202(3):336–40.
9. Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R, Gardner G, Bristow R. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a

- higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(3):487–91.
10. Werness BA, Ramus SJ, Alice S, Garlinghouse- K, Oakley-girvan I, Dicioccio RA, et al. Ovarian Carcinoma In Situ With Germline BRCA1 Mutation and Loss of Heterozygosity at BRCA1 and TP53. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(13):1–4.
  11. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(November 1980):795–801.
  12. Gupta S, Takebe N, Lorusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2010;2(4):237–50.
  13. Taipale J, Cooper M., Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*. 2002;418(August):892–6.
  14. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-trench G, et al. Isolation and characterization of human Patched 2 ( PTCH2 ), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet*. 1999;8(2):291–7.
  15. Roibo NA, Ho L. Hedgehog Signaling Protocols. In: Roibo NA, Walker JM, editors. *Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. Philadelphia; 2015. p. 5–10.
  16. Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang J-S, Charron F, et al. Overlapping roles and collective requirement for the co-receptors Gas1, Cdo and Boc in Shh pathway function. *Dev Cell*. 2011;20(6):19–22.
  17. Hui C, Angers S. Gli Proteins in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27(July):513–37.
  18. Goetz SC, Ocbina PJR, Anderson K V. The Primary Cilium as a Hedgehog Signal Transduction Machine. *Methods Cell Biol*. 2010;94(8):199–222.
  19. Ruiz-Gómez A, Molnar C, Holguín H, Mayor F, Celis JF De. The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(4):901–12.
  20. Riobo NA, Saucy B, Dilizio C, Manning DR. Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet].

- 2006;103(33):12607–12. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885213>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1567926>
21. Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao F, Law ML, et al. The GLI-Kruppel Family of Human Genes. *Mol Cell Biol.* 1988;8(8):3104–13.
  22. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI Gene Encodes a Nuclear Protein Which Binds Specific Sequences in the Human Genome. *Mol Cell Biol.* 1990;10(2):634–42.
  23. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic Hedgehog-induced Activation of the Gli1 Promoter Is Mediated by GLI3. *J Biol Chem.* 1999;274(12):8143–52.
  24. Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, et al. Characterization of the human Suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 1999;112(23):4437–48.
  25. Haixia L, Jinghua;Li, Feng L. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2016;40(December):152–7. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2015.11.014>
  26. Chen Q, Gao G, Luo S. Hedgehog signaling pathway and ovarian cancer. *Chinese J Cancer Res.* 2013;25(3):346–53.
  27. Bhattacharya R, Kwon J, Ali B, Wang E, Patra S, Shridhar V, et al. Role of Hedgehog Signaling in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):7659–66.
  28. Liao X, Siu MKY, Au CWH, Wong SY, Chan HY, Ip PPC, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):131–40.
  29. Yang L, He J, Huang S, Zhang X, Bian Y, He N, et al. Activation of hedgehog signaling is not a frequent event in ovarian cancers. *Mol Cancer.* 2009;8(112):1–5.

30. Humke EW, Dorn K V, Milenkovic L, Scott MP. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010;24(7):670–82.
31. Ciucci A, Stefano I De, Vellone VG, Lisi L, Bottoni C, Scambia G, et al. Expression of the Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 ( Gli1 ) in Advanced Serous Ovarian Cancer Is Associated with Unfavorable Overall Survival. *PLoS One.* 2013;8(3):e60145.
32. Szkandera J, Kiesslich T, Haybaeck J, Gerger A. Hedgehog Signaling Pathway in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):1179–96.
33. Teglund S, Toftgård R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer [Internet].* 2010;1805(2):181–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.003>
34. Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, et al. Hedgehog Signaling Pathway is a New Therapeutic Target for Patients with Breast Cancer. *Cancer Res.* 2004;64(17):6071–4.
35. Liu H-Y, Zheng D. Gli3 silencing enhances cyclopamine suppressive effects on ovarian cancer. *Onco Targets Ther.* 2014;7(October):2007–11.

## **12. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam u Zagrebu 1992. godine. U Zaprešiću sam pohađala osnovnu i srednju školu. Nakon završene opće gimnazije, 2011. godine upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Od 2015. godine sam student demonstrator na Katedri za fiziologiju i imunologiju. Imam brata Luku i Andreja.