Uloga inzulinskog i leptinskog receptora u rastu karcinoma endometrija

Ževrnja, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:925679

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

Mia Ževrnja

ULOGA INZULINSKOG I LEPTINSKOG RECEPTORA U RASTU KARCINOMA ENDOMETRIJA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

Mia Ževrnja

ULOGA INZULINSKOG I LEPTINSKOG RECEPTORA U RASTU KARCINOMA ENDOMETRIJA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc.dr.sc Andrijana Müller, dr.med.spec.ginekologije i opstetricije

Rad ima 50 listova, 6 tablica i 12 slika.

Zahvala.

Želim prije svega zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Andrijani Mùller na savjetima i podršci prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem dr. Dimitriju Milojkoviću, prof. prim. dr. sc. Milanki Mrčeli i prof. dr. sc. Zlatku Topolovecu na suradnji, Marti Balog na savjetima i Miloradu Zjaliću na pomoći oko izrade statistike.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Heffer na utrošenom vremenu, strpljenju i stalnoj dostupnosti tijekom provedbe istraživanja i pisanja rada.

Neizmjerno hvala dr. sc. Vedrani Ivić na ogromnoj podršci i pomoći, razumijevanju i povjerenju. Vedrana, hvala Vam što ste uvijek imali strpljenja i vremena za moje upite i što ste mi osnažili znanje i samopouzdanje!

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno mami, koja je bila uz mene i bodrila me tijekom studiranja.

Veliko HVALA svima!

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA ENDOMETRIJA 1
1.2. HISTOLOGIJA ENDOMETRIJA 1
1.3. HORMONSKA OVISNOST KARCINOMA ENDOMETRIJA 2
1.4. PATOLOGIJA 2
1.5. KLINIČKI TIJEK I KLASIFIKACIJA 3
1.6. DIJAGNOSTIKA 5
1.7. LIJEČENJE 5
1.8. ETIOPATOGENEZA KARCINOMA ENDOMETRIJA 6
1.8.1. Pretilost i karcinogeneza 7
1.8.2. Dijabetes tip II i karcinogeneza 8
1.8.3. Leptin i leptinski receptori u karcinomu endometrija 8
1.8.4. Estrogen i receptori estrogena u karcinomu endometrija 10
1.8.5. Inzulin i receptori inzulina u karcinomu endometrija 11
1.8.6. Protein Ki - 67 kao marker agresivnosti tumora 12

2. HIPOTEZA 13

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 14

4. ISPITANICE I METODE 15

4.1. USTROJ STUDIJE 15
4.2. ISPITANICE 15
4.3. METODE 15
4.3.1. Priprema za fluorescentnu imunohistokemiju 16
4.3.2. Fluorescentna imunohistokemija 16
4.3.3. Kvantifikacija fluorescentne imunohistokemije 18
4.3.4. Western blot analiza tkiva maternice na sadržaj ER - α, IR - α i ObR 18
4.3.5. Hemalaun-eozin bojenje tkiva 21
4.3.6. Statističke metode 22

5. REZULTATI 23

5.1. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA RECEPTORA ZA LEPTIN, INZULIN I ESTROGEN U TUMORSKOM I KONTROLNOM TKIVU MATERNICE 23
5.1.1. Izražaj receptora za leptin 24
5.1.2. Izražaj receptora za inzulin 25
5.1.3. Izražaj receptora za estrogen 26
5.1.4. Povezanost receptora (imunohistokemijska metoda) 26
5.2. IZRAŽAJ MARKERA ZA PROLIFERATIVNOST KARCINOMA ANTIGEN KI - 67 27
5.3. WESTERN BLOT ANALIZA OBR, IR I ER RECEPTORA U TUMORSKOM I KONTROLNOM TKIVU MATERNICE 28
5.3.1. Western blot analiza na sadržaj ObR 28
5.3.2. Western blot analiza na sadržaj IR 30
5.3.3. Western blot analiza na sadržaj ER 31
5.3.4. Povezanost receptora (Western blot metoda) 33
5.4. REZULTATI BOJENJA TKIVA HEMALAUN-EOZINOM 34
6. RASPRAVA 35
6.1. ANALIZA IZRAŽAJA OBR 35
6.2. ANALIZA IZRAŽAJA IR 36
6.3. ANALIZA IZRAŽAJA ER 37
6.4. ANALIZA IZRAŽAJA MARKERA ZA PROLIFERATIVNOST KARCINOMA ANTIGEN KI – 67…….. 37
7. ZAKLJUČCI 39
8. SAŽETAK 40
9. SUMMARY 41
10. LITERATURA 42
11. ŽIVOTOPIS 50

POPIS KRATICA:

Akt - protein kinaza, engl. *Serine - threonine kinase,*

ANCA - antineutrofilna citoplazmatska antitijela, engl. *Antineutrophil cytoplasmic antibodies,*

ASR (W) - ponderirana stopa specifična za dob, eng. *Weighted mean of the age - specific rates - word,*

BMI - indeks tjelesne mase, engl. *body mass index*,

cAMP - ciklički adenozin monofosfat,,

DAPI - 4' 6 - diamidino - 2 - fenilindon,

EGF - epidermalni faktor rasta,

ER - α - alfa podjedinica estrogenskog receptora,

FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics,

FITC - fluorofor fluorescein izotiocijanat,

GLOBOCAN - međunarodna organizacija za istraživanje raka i baze podataka,

IGF - 1 - inzulinu sličan faktor rasta 1,

IGFBP - 1 - inzulinu sličan faktor rasta koji veže proteine,

IL - 1 - interleukin 1,

IL - 6 - interleukin 6,

IR - inzulinski receptor,

MAPK - proteinska kinaza aktivirana mitogenom,

Ob - gen za pretilost, engl. *Obesity gene,*

ObR - leptinski receptor,

PAI - 1 - inhibitor plazminogen aktivatora 1,

PBS - fosfatni pufer,

PMSF - inhibitor serinskih proteaza,

SHBP - protein koji veže spolne hormone,

SHGB - globulin koji veže spolne hormone,

TBST - tris pufer s detergentom Tween - 20,

TGFβ - transformirajući faktor rasta,

TNFα - faktor tumorske nekroze alfa.

POPIS SLIKA:

Slika 1. Izražaj ObR, ER i IR u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice 23

Slika 2. Kvantifikacija imunopozitivne reakcije receptora ObR. 24

Slika 3. Kvantifikacija imunopozitivne reakcije receptora IR 25

Slika 4. Kvantifikacija imunopozitivne reakcije receptora ER 26

Slika 5. Analiza izražaja receptora ObR Western blot metodom. 29

Slika 6. Usporedba vrijednosti izražaja receptora ObR u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice 29

Slika 7. Analiza izražaja receptora IR Western blot metodom 30

Slika 8. Usporedba vrijednosti izražaja receptora IR u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice 31

Slika 9. Analiza izražaja receptora ER Western blot metodom 32

Slika 10. Usporedba vrijednosti izražaja receptora ER-α, 36 kDa u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice 32

Slika 11. Usporedba vrijednosti izražaja receptora ER-α, 46 kDa u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice 33

Slika 12. Tumorsko (A) i kontrolno (B) tkivo maternice obojeno hemalaun - eozinom. 34

POPIS TABLICA:

Tablica 1. FIGO klasifikacija karcinoma endometrija 3

Tablica 2. Podjela karcinoma prema stupnju diferenciranosti stanica i izgledu jezgara 4

Tablica 3. Kategorije tjelesne mase prema indeksu tjelesne mase (BMI) 7

Tablica 4. Primarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemijskoj analizi 17

Tablica 5. Sekundarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemijskoj analizi 18

Tablica 6. Izražaj markera Ki-67 27

1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma endometrija

Karcinom endometrija, prema procjeni GLOBOCANA 2018, nalazi se na četvrtom mjestu po učestalosti svih vrsta raka kod žena, odmah poslije karcinoma dojke, pluća i debelog crijeva. Prema procjenama iz 2018. godine europske zemlje s najvišom stopom incidencije su Bjelorusija (24,9 / 100 000), Makedonija (24,3 / 100 000), i Litva (24 / 100 000), a najniže stope imaju Latvija (17,4 / 100 000), Malta (17,8 / 100 000) i Bugarska (18 / 100 000). Hrvatska se nalazi na 10. mjestu, sa stopom incidencije od 19,6 / 100 000 (1).

Posljednji službeni podaci hrvatskog Registra za rak pokazuju da je u 2015. godini od karcinoma endometrija oboljelo 659 žena (gruba stopa 30,3 / 100 000, ASR (W) 5,2 / 100 000). Podaci o mortalitetu Državnog zavoda za statistiku za 2015. godinu pokazuju da je te godine od raka endometrija umrlo 147 žena. Od toga je 84 % bilo starije od 60 godina (2). Prosječna je dob bolesnica pri dijagnosticiranju raka endometrija 55 do 65 godina. Rijetko se nalazi kod žena mlađih od 40 godina, dok je više od 85 % slučajeva kod žena starijih od 50 godina (3). Incidencija raka endometrija je u porastu, a razlog tome je produženje ljudskog vijeka, dostupnost i poboljšanje dijagnostičkih postupaka i povećana izloženost predisponirajućim čimbenicima (4). U zemljama boljeg socioekonomskog statusa povećana je učestalost karcinoma endometrija (5).

1.2. Histologija endometrija

Maternica (lat. *uterus,* grč. *hystera*) građena je od tri sloja: potrbušnice, mišićja i sluznice. Sluznica maternice *(lat. endometrium*) oblaže šupljinu tijela maternice. Građena je od bazalnog sloja, koji izravno naliježe na mišićje maternice i funkcionalnog sloja, koji se dijeli na kompaktni sloj i duboki ili sponginozni sloj. Oba sloja građena su od žljezdane i mezenhimske sastavnice. Iz bazalnog sloja, koji u normalnim uvjetima ne reagira na hormone, obnavlja se endometralna sluznica nakon menstruacije. Funkcionalni sloj podložan je hormonalnim podražajima i tijekom reproduktivne dobi ciklički se ljušti i obnavlja (6).

1.3. Hormonska ovisnost karcinoma endometrija

Karcinom endometrija ovisan je o hormonima. Kod povećane koncentracije estrogena u tkivu dolazi do stimulacije proliferacije stanica, a time i do povećanja mogućnosti za fatalne genetske greške. To dovodi do hiperplazije endometrija, kao i do raka endometrija. U uzorcima tkiva endometrijskog karcinoma uočene su više koncentracije aktivnog estrogena u usporedbi sa uzorcima normalnog endometrija (7). Visoka koncentracija estrogena u tkivu utječe na nastanak endometrijskog karcinoma preko dva glavna mehanizma: izravnog oštećenja DNA s metaboličkim produktima estrogena i djelovanja na stimulaciju proliferacije (8).

1.4. Patologija

Endometrijski karcinomi na osnovu kliničkih i molekularnih obilježja mogu se podijeliti na dvije osnovne skupine: tip I ovisan o estrogenu i tip II neovisan o estrogenu (9). Tip I mnogo je češći (80 %) u odnosu na tip II (20 %) (10).

Tumor ovisan o estrogenu češće nastaje u perimenopauzi i premenopauzi i pojavnost mu je povezana s čimbenicima rizika. Uglavnom su to dobro diferencirani tumori, češće adenokarcinomi s povećanim izražajem estrogenskih i progesteronskih receptora a rjeđe adenoskvamozni karcinomi. Adenokarcinom ima povoljniju prognozu, minimalnu invaziju, rijetko metastazira i recidivira (11). Morfološki, većina tumora iz te skupine su endometrioidni adenokarcinomi koji se razvijaju preko kompleksne endometrijske hiperplazije. Tumor ovisan o estrogenu javlja se kod mlađih, pretilih žena i nerotkinja (12).

Tumor neovisan o estrogenu nema estrogenske i progesteronske receptore i javlja se kod žena u kasnoj menopauzi. To je podtip s lošijom prognozom, dubokom infiltracijom miometrija, čestim metastazama i recidivima (13). Razvija se u atrofičnom endometriju iz različitih lezija, odnosno metaplazija, označenih kao intraepitelijski karcinom endometrija (EIC). Pojavljuje se u morfološkim oblicima seroznog, papilarnog, svjetlostaničnog adenokarcinoma, sitnostaničnog karcinoma, miješanog te nediferenciranog karcinoma (14).

1.5. Klinički tijek i klasifikacija

Prvi simptomi koji se pojavljuju su: abnormalna i nepravilna krvarenja, povećanje maternice, bolovi u donjem dijelu trbuha, anovulacija u premenopauzi (13). Najčešći uzrok krvarenja je hiperplazija endometrija koja označava promjene endometrijskih žlijezda i strome kao rezultat dugotrajne neoponirane estrogenske stimulacije (15). Hiperplazija se klasificira kao: *Hyperplasia simplex* kod koje je vjerojatnost razvoja karcinoma 1 %, *Hyperplasia simplex atypica* s vjerojatnošću razvoja karcinoma od 8 %, *Hyperplasia complex* i *Hyperplasia complex atypica* kod kojih je vjerojatnost nastanka karcinoma 2, odnosno 29 % (16).

Širenje karcinoma endometrija je *per continuitatem* u cervikalni kanal, vaginu i miometrij, hematogeno u jetru , kosti i pluća, limfogeno u pelvične, paraaortalne i ingvinalne limfne čvorove, transtubarno u trbušnu šupljinu i jajnike (15).

Prema FIGO (The International Federation of Gynecology and Obstetrics) klasifikaciji iz 2009. godine, karcinomi endometrija se dijele u nekoliko stupnjeva.

Tablica 1. FIGO klasifikacija karcinoma endometrija

I	Tumor ograničen na tijelo maternice
I A	Tumor bez invazije ili s invazijom manjom od polovine debljine miometrija
I B	Invazija ≥ polovine debljine miometrija
II	Zahvaćena maternica i cerviks ali bez širenja van maternice
III	Lokalni i/ili lokoregionalno prošireni tumor
III A	Tumor invadira serozu trupa maternice i/ili adneksa

III B	Širenje na vaginu i/ili parametrije. Status limfnih čvorova se ne može procijeniti. Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni.
III C	Presadnice u zdjelične i/ili para-aortalne limfne čvorove
III C1	Pozitivni zdjelični limfni čvorovi
III C2	Pozitivni para-aortalni limfni čvorovi ± pozitivni zdjelični limfni čvorovi
IV	Tumor zahvaća sluznicu mjehura ili crijeva ili daje udaljene metastaze
IV A	Tumor zahvaća mjehur ili sluznicu crijeva ili oboje. Nema udaljenih presadnica.
IV B	Udaljene metastaze uključujući intraabdominalne ili ingvinalne limfne čvorove ili oboje

Gradus ili stadij proširenosti se određuje prema odnosu solidne i žljezdane komponente u tumoru, izgledu i veličini jezgara, broju i veličini nukleola i izgledu kromatina .

Tablica 2. Podjela karcinoma prema stupnju diferenciranosti stanica i izgledu jezgara

GRADUS	**STUPANJ DIFERENCIRANOSTI STANICA**	**IZGLED JEZGARA**
I	Do 5 % neskvamoznog solidnog tkiva	Stanice s ovalnim ili izduženim jezgrama, fino raspršenog kromatina s mjerljivim nukleolima i pokojom mitozom
II	6 - 50 % neskvamoznog solidnog tkiva	Stanice s jezgrama karakteristika između gradusa I i III
III	> 50 % neskvamoznog solidnog tkiva	Stanice s nepravilnim polimorfnim jezgrama, grubo zgrudanog kromatina s velikim eozinofilnim nukleolima s brojnim mitozama

1.6. Dijagnostika

Dijagnoza se postavlja patohistološkim pregledom uzoraka endometrija. Zlatni standard u definiranju histološke dijagnoze je frakcionirana eksplorativna kiretaža, a može se učiniti i biopsija pod kontrolom histeroskopije ili neka od drugih metoda dobivanja uzoraka endometrija pogodnih za histološku analizu (17).

Definitivna dijagnoza i procjena stupnja proširenosti bolesti može se potvrditi patohistološkom analizom materijala dobivenog nakon histerektomije, adneksektomije i zdjelične i paraaortalne limfadenektomije , osim kod seroznog karcinoma endometrija gdje je uz ovo potrebno učiniti ispirak peritoneuma, slijepe biopsije peritoneuma zdjelice i gornjeg dijela abdomena i resekciju infrakoličnog dijela omentuma (18).

1.7. Liječenje

Osnovno liječenje je kirurško. Uz njega se mogu primijeniti radioterapija, kemoterapija i hormonska terapija (5).

Kirurški zahvat sastoji se od histerektomije s bilateralnom salpingoovariektomijom te kirurškog stupnjevanja proširenosti bolesti koje uključuje disekciju zdjeličnih limfnih čvorova, inspekciju i palpaciju trbušnih organa, uzimanje bioptata sumnjivih promjena te ispirak peritoneuma (19).

Nakon patološke procjene stadija tumora određuje se daljnja terapija. U liječenju bolesnica sa stadijem Ia može se izostaviti zdjelična i paraaortalna limfadenektomija. U stadiju II i IIb mora se napraviti zdjelična limfadenektomija s paraaortalnom limfadenektomijom ili bez nje (20). Nakon kirurškog zahvata u tom stadiju zrači se zdjelica i paraaortalno područje ako su limfni čvorovi pozitivni. Stadiji III i IV s dokazanom bolesti izvan maternice liječe se kombinacijom kirurške terapije s kemoterapijom i zračenjem. U

stadiju III nakon kirurškog zahvata provodi se postoperativna radioterapija. U stadiju IV, provodi se kombinacija perkutane iradijacije zdjelice, cijelog abdomena i brahiterapije. U slučaju proširenosti bolesti izvan zdjelice, provodi se sistemska kemoterapija i hormonska terapija. Hormonska terapija medroksiprogesteron acetatom koristi se kod pozitivnih estrogenskih i progesteronskih receptora tijekom najmanje 12 tjedana. Kemoterapija se preferira kod slabije diferenciranog tumora s niskim koncentracijama steroidnih receptora ili u visokim stadijima bolesti (15).

1.8. Etiopatogeneza karcinoma endometrija

Uzrok nastanka endometrijskog karcinoma nije do kraja poznat, ali postoje brojna saznanja o čimbenicima rizika. Jedan od najvažnijih čimbenika je hormonska neravnoteža, pogotovo s obzirom na činjenicu da većina stanica raka endometrija sadrži estrogenske i / ili progesteronske receptore (21). Najvažniji rizični čimbenici su metabolički sindrom i adipozitet. Adipozno je 70 % svih pacijentica, a predominira indeks tjelesne mase (BMI) 25 - 30. Relativni rizik za karcinom endometrija je za 2,54 puta veći kod BMI iznad 30 (22). Nezavisni rizični faktori su dijabetes tip II, hipertonija i hipertrigliceridemija. Rizik za endometrijski karcinom povećavaju i ranije menarhe, kasnije menopauze, tumori koji produciraju estrogene, hereditet - nasljedni čimbenici, Lynchov sindrom te egzogena estrogena ekspozicija kod tamoksifena (23).

Pretilost označava višak masnog tkiva, a kao mjere pretilosti koriste se indeks tjelesne mase (BMI) i opseg struka (engl. *waist circumference, WC*). Prekomjerna tjelesna masa podrazumijeva BMI > 25 kg / m² te opseg struka WC > 80 cm za žene, dok pretilost obuhvaća BMI > 30 kg / m² te WC > 88 cm za žene (24).

Tablica 3. Kategorije tjelesne mase prema indeksu tjelesne mase (BMI)

Stupanj uhranjenosti	Pothranjenost	Normalna TM	Prekomjerna TM	Pretilost I stupnja	Pretilost II stupnja	Pretilost III stupnja
BMI(KG/M²)	< 18,5	18,5 - 24,9	25,0 - 29,9	30,0 - 34,9	36,0 - 39,9	> 40

1.8.1. Pretilost i karcinogeneza

Mehanizmi na kojima se temelji odnos između pretilosti i karcinoma nisu u potpunosti definirani, ali su poznate promjene u profilu adipokina. Povišena razina leptina i snižena razina adiponektina, zanimljiva su veza između pretilosti i ubrzanog rasta karcinoma. Svaki od ovih hormona, a osobito njihova kombinacija, može djelovati proliferativno na stanice endometrija. Pretilost može utjecati na rast karcinoma na nekoliko različitih razina: sustavno, tako da utječe na medijatore upale i imunosni odgovor, lokalno parakrinim lučenjem hormona i izravno, lučenjem adipocita koji se nalaze u mikrookolišu karcinomske mase. Proizvodnja faktora rasta i proangiogenih čimbenika od strane adipocita, mitohondrijska disfunkcija povezana s oksidacijsko-redukcijskim potencijalom, promjene u upalnom odgovoru, neravnoteža steroidnih hormona i disregulacija inzulinske osi još su neke od mogućnosti koje potencijalno povezuju pretilost i karcinom (25). Masne stanice ili adipociti luče adipocitokine koji djeluju na imunološki sustav . Širenjem adipoznog tkiva dolazi do oksidativnog stresa i upalnih odgovora. Međudjelovanjem adipocita i imunosnog sustava dolazi do infiltracije masnog tkiva u upalne i imunosne stanice te se tako povećava lokalni i sustavni odgovor raznim upalnim citokinima. Navedena neravnoteža u proizvodnji citokina i adipokina znatno pridonosi početku raznih komplikacija vezanih uz debljinu, kao što je i karcinom (26).

Pretilost je i jedna od glavnih pokretačkih sila neravnoteže hormona estrogena i progesterona. Ona uzrokuje nekoliko hormonalnih poremećaja koji potencijalno pridonose hiperplaziji i karcinogenezi u endometriju.

Disfunkcionalno masno tkivo oslobađa abnormalnu količinu proupalnih citokina poput IL - 6, faktora tumorske nekroze - α (TNF - α) i drugih proteina, kao što su leptin i inhibitor

plazminogen aktivatora - 1 (PAI - 1), što može dovesti do promjene ključnih signalnih putova. Ovo upalno stanje dovodi do inzulinske rezistencije i abnormalnih odgovora urođenog i adoptivnog imuniteta , te u konačnici, tumorogenog okoliša (27).

1.8.2. Dijabetes tip II i karcinogeneza

Pretilost je čimbenik koji pogoduje razvoju inzulinske rezistencije. Produkti procesa u adipocitima imaju učinak na nastanak rezistencije. To se poglavito odnosi na citokine (IL - 1,TNF - α) i slobodne masne kiseline koje smanjuju unos glukoze u mišićne stanice, povećavaju glukogenezu u jetri i oštećuju funkciju β - stanica gušterače (28). S porastom stupnja inzulinske rezistencije, veći je porast glukoze u krvi i nastaje kompenzatorna hiperinzulinemija, a nakon iscrpljivanja ovog kompenzatornog mehanizma nastaje dijabetes tipa II (29). Nekoliko studija dokumentiralo je povezanost pretilosti, dijabetesa i karcinoma endometrija (30). Pronađeno je da su niske razine adiponektina, surogat markera za inzulinsku rezistenciju povezane s rizikom od karcinoma endometrija, neovisno o BMI. Radi ovoga inzulinska rezistencija može biti neovisni čimbenik rizika za karcinom endometrija (31).

1.8.3. Leptin i leptinski receptori u karcinomu endometrija

Masno tkivo nije samo spremnik energije, već i aktivni metabolički organ. Adipociti izlučuju proteine adipokine, male molekule slične citokinima, koje moduliraju metabolizam, upalu, imunosni odgovor i angiogenezu. Prvi otkriveni adipokin, leptin, poznat je po svojoj ulozi u održavanju energetske ravnoteže i središnjoj regulaciji sitosti (32). Osim adipocita mogu ga izlučivati i stanice jajnika, posteljice, epitel tkiva dojke, skeletni mišići, koštana srž, hipofiza i jetra (33). Leptin djeluje na receptore u hipotalamusu, izaziva osjećaj sitosti i djeluje na smanjenje apetita. U pretilosti, masno tkivo izlučuje previše leptina, a istovremeno se u mozgu javlja rezistencija na leptin. Izlučivanje leptina dodatno potiču inzulin, glukokortikoidi, TNF - α i estrogeni (34).

1. UVOD

Leptin je proizvod gena za pretilost (Ob) i izražava se u normalnim, ali i malignim tkivima (7). Veličine je 16 kDa. Izlučuje se iz masnog tkiva i primarno sudjeluje u održavanju energetske homeostaze utječući na središnji anoreksigeni put. Suprotno tome, u pretilosti leptin sudjeluje u proupalnim procesima i održava stanje inzulinske rezistencije (35).

Leptin djeluje preko svojih transmembranskih receptora (ObR). Postoji barem pet oblika leptinskih receptora. Najrasprostranjeniji je kratki oblik koji je zastupljen u najviše tkiva i služi za transport leptina u mozak. Dugi oblik zastupljen je u hipotalamusu i jezgrama moždanog debla. Cirkulirajući oblik veže leptin u krvotok i može mijenjati njegovo djelovanje (36).

Izražaj ObR veći je u karcinomima nego u normalnom tkivu. Vezivanje leptina na ObR aktivira Janus kinazu (JAK), signalni pretvarač i aktivator transkripcijskog signalizacijskog puta. Indukcija JAK stimulira fosfoinozitol 3 - kinazu (PI3 - kinaza). Aktivacija PI3 - kinaze povećava migraciju i invaziju stanica putem Rac / Rho puteva i stimulira Akt, glavni put rasta i preživljavanja (37).

Nekoliko kliničkih studija pokazalo je da leptin i ObR igraju ulogu u patološkim procesima karcinoma endometrija. U različitim staničnim linijama karcinoma endometrija laboratorijski rezultati pokazali su vezu leptina s neoplastičnim fenomenima kao što su stanična proliferacija, angiogeneza i estrogena aktivnost.

U studijama in vitro istraživači su pokazali da tretiranje leptinom povećava koncentraciju hormonski osjetljivih Ishikawa stanica (ECC1 - tip I, stanice karcinoma endometrija tipa I) te da leptin snažno inducira invaziju stanica raka endometrija (38). Također, tretiranje leptinom stimuliralo je proliferaciju i invaziju SPEC - 2 stanica, koje su stanična linija raka endometrija tipa II (39). Leptin dodan humanim staničnim linijama raka endometrija kao što su Ishikawa stanice, HEC - 1A stanice (umjereno diferencirani adenokarcinom), RL95 - 2 stanice (umjereno diferencirani adenoskvamozni karcinom) i ANCA (antineutofilna citoplazmatska antitijela) stanice, stimulirao je povećanje izražaja mRNA ciklooksigenaze 2 (COX) - 2, ekspresiju aromatazne mRNA i proizvodnju prostaglandina E2 (PGE2) (40). Osim toga, leptin uzrokuje smanjenje apoptoze u stanicama

Ishikawe i HEC - 1A pa je razumljivo da njegova prisutnost u mikrookruženju tumora može igrati značajnu ulogu utječući na brojne biološke mehanizme kao što su upala, stanična proliferacija i smanjenje apoptoze (41).

Izražaj ObR je u korelaciji sa estrogen receptorima, što ukazuje na ovisnost jednih o drugima u endometriju (42).

1.8.4. Estrogen i receptori estrogena u karcinomu endometrija

Glavna poveznica između raka endometrija i prekomjerne tjelesne mase su promjene u metabolizmu endogenih hormona. Poznato je da je rizik za rak endometrija povezan sa ranom menarhom i kasnom menopauzom, što ukazuje na njegovu ovisnost o povećanoj izloženosti estrogenu (43). Učinak estrogena na sluznicu maternice je promitotički. Osim što povećava broj mitoza, znatno povećava i broj svojih i progesteronskih receptora (2), povisuje sintezu DNA, potiče aktivnost čimbenika rasta: IGF - 1, TGF - β, inhibira interleukine (IL - 1, IL - 6), povisuje krvne protoke i angiogenezu (44). Neravnoteža estrogena i progesterona uključena je u progresiju endometrijskog karcinoma tipa I (45).

U pretilosti dolazi do porasta koncentracije estrogena radi aktivnosti enzima aromataze koji pospješuje sintezu estrogena. Aromatazu dodatno stimuliraju inzulin, leptin, TNF - α i IL - 6, čije su razine povišene u pretilosti (46). Također i povišene razine IGF - 1 i hiperinzulinemija doprinose porastu razine slobodnog estrogena smanjujući raspoloživost proteina koji veže spolne hormone (engl. *A plasma steroid binding protein*, SHBP) (47).

Estrogen je signalna molekula koja ulazi pasivno u ciljnu stanicu i tu se veže za jezgrine receptore koji su transkripcijski čimbenici i potiču ekspresiju gena ranog i kasnog odgovora. Estrogenski receptori izraženi su samo u ciljnim tkivima. Pripadaju superobitelji hormonskih receptora u koju je uključen velik broj DNA vežućih proteina. Nakon što ih različiti ligandi aktiviraju vežu se za specifična mjesta u DNA i djeluju kao transkripcijski faktori (48). Dva su tipa receptora čiji je ligand 17β - estradiol (estrogen): ER, intracelularni estrogenski receptor te GPR30, membranski receptor povezan s G - proteinazom. Receptorske tirozin kinaze u ER signalnom putu sudjeluju u aktivaciji kinaza ovisnih o mitogenima (MAPK) što povećava unutarstaničnu razinu sekundarnih glasnika poput cAMP. Na taj se

način oponaša aktivacija MAPK kaskade i estrogen, zajedno s čimbenicima rasta (EGF, IGF, TGF) potiče proliferaciju stanica. Uz to estrogen potiče i samu sintezu faktora rasta (49). Povećane stope proliferacije povećavaju vjerojatnost nakupljanja mutacija u protoonkogenima i tumor supresorskim stanicama (50).

Mutageni učinak estrogena nastaje kao posljedica genotoksičnosti estrogena i njegovih metabolita. U stanicama se estradiol i estron metaboliziraju oksidativnim mehanizmom putem citokrom P - 450 enzima u 2 - hidroksikatehol estrogen, koji ima benigni učinak, ili u 4 - hidroksikatehol estrogen koji djeluje karcinogeno. Oksidacijom enzimima ili metalnim ionom 4 - hidroksikatehol estrogen se metabolizira u elektrofilni reaktivni estradiol - 3,4 - kvinon koji se veže adicijom za adenin i gvanin te narušava stabilnost DNA i rezultira apurinskim mjestima (51). Smanjenje apoptoze omogućuje stanicama s takvim mutacijama da prežive i da se klonalno šire te kumuliraju mutacije dok ne postignu punu malignost (52)

1.8.5. Inzulin i receptori inzulina u karcinomu endometrija

Pretilost, u kombinaciji sa smanjenom sintezom adiponektina, dovodi do inzulinske rezistencije koja uzrokuje hiperglikemiju i povećanu proizvodnju inzulina (31). Osim toga inzulinsku rezistenciju potiču i povišene razine slobodnih masnih kiselina, kao i brojni proupalni citokini prisutni u pretilosti zbog upale niskog stupnja (53).

Nekoliko je mehanizama preko kojih inzulin sudjeluje u karcinogenezi endometrija. Kao prvo, inzulin može djelovati kao faktor rasta, s učincima sličnim onima IGF - I, a poznato je da tumorska tkiva endometrija imaju povišene razine IGF - I receptora i inzulinskih receptora. Potom, inzulin povećava aktivnost IGF - I u tkivu endometrija suzbijanjem ekspresije gena endometrijskog IGFBP - 1 (54, 55). IGF - 1 je peptidni faktor rasta koji stimulira proliferaciju i diferencijaciju stanica te sintezu proteina. On je u cirkulaciji vezan na proteine koji vežu IGF (IGFBP), čime se kontrolira njegova raspoloživost i učinak na rast i preživljenje (56). Kako su razine IGFBP snižene, u hiperinzulinemiji nastaje povećana razina IGF-a, što dovodi do hiperstimulacije receptora. Stoga se previsoke vrijednosti receptora za inzulin (IR) i IGF (IGF - IR) povezuju s nastankom, ali i progresijom

karcinoma. Osim inzulina na ove receptore vežu se i ligandi IGF - 1 i IGF - 2 (57). To vezanje dovodi do aktivacije dvaju glavnih signalnih puteva, metaboličkog i antiapoptotičkog (PI3K) i mitogenog MAPK . U prvome putu dolazi do aktivacije fosfoinozitid – 3 - kinaze kojom se inducira protein kinaza B (AKT). AKT inhibira BAD, Bcl - 2 asocirani promotor smrti i konačni ishod je inhibicija apoptoze .

Aktivacija drugog signalnog puta MAPK završava izraženijom genskom ekspresijom i staničnom proliferacijom (58).

Osim navedenoga, inzulin daje ključni poticaj za sintezu androgenih hormona te tako direktno doprinosi višku estrogena i manjku progesterona (11). Višak signalizacije inzulina rezultira promjenama endometrija u smislu pro-proliferacije slične onoj kod estrogena. Poznato je da inzulinska rezistencija i kompenzacijska hiperinzulinemija dovode do sinteze androgena što je posebno opasno za žene u postmenopauzi. Osim toga inzulin inhibira sintezu globulina koji veže spolne hormone (engl. *Sex hormone-binding globulin,* SHGB), čija je uloga regulacija njihove aktivnosti. Prema tome, kod povećane razine inzulina ova inhibicija dovodi do povećanja slobodnih spolnih hormona (estrogena i androgena) i stimulira karcinogenezu (59).

1.8.6. Protein Ki - 67 kao marker agresivnosti tumora

Ekspresija humanog Ki - 67 proteina snažno je povezana s proliferacijom i rastom tumorskih stanica. Prisutan je u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G_1, S, G_2 i M), ali ne i u fazi mirovanja (G_0). Njegova ekspresija povezana je s proliferativnom aktivnošću intrinzičnih staničnih populacija u karcinomima pa se koristi kao marker agresivnosti tumora (60).

2. HIPOTEZA

U usporedbi s kontrolnim tkivom maternice, ekspresija estrogenskog, inzulinskog i leptinskog receptora u karcinomima endometrija povećana je.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

a) Kvantificirati i usporediti izražaj receptora za estrogen (ER), leptin (ObR), inzulin (IR) te markera za proliferativnost karcinoma antigen Ki - 67 u kontrolnom tkivu maternice i tkivu pacijentica s karcinomom endometrija korištenjem imunohistokemijske metode.
b) Korištenjem Western blot metode odrediti razinu ekspresije sva tri navedena receptora u tkivu sluznice maternice kontrolnih ispitanica i ispitanica s karcinomom endometrija.

4. ISPITANICE I METODE

4.1. Ustroj studije

Retrospektivna studija parova.

4.2. Ispitanice

Istraživanje je provedeno na uzorcima tkiva prikupljenim u periodu od 8. 12. 2017. do 10. 9. 2018. godine. Uzorke tkiva sačinjavaju arhivirani uzorci tkiva karcinoma endometrija i kontrolnog tkiva maternice prikupljenih za vrijeme operativnog postupka nakon kojeg su uzorci uključeni u pilot-projekt u suradnji Laboratorija za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC Osijek te Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek. U studiju je uključeno 10 uzoraka kontrolnih tkiva i 10 uzoraka tkiva karcinoma endometrija. U studiju su uključene žene starije od 18 godina. Uzorci kontrolnog tkiva dobiveni su prilikom odstranjenja maternice zbog nemalignog ginekološkog razloga (miomi, prolaps maternice, nepravilna ponavljajuća krvarenja i posljedična anemija). Uzorci tumorskog tkiva izuzeti su prilikom operacije primarnog tumora. Prosječna dob kontrolne skupine bila je 54,3 godine, a prosječna dob pacijentica s karcinomom endometrija bila je 66,05 godina. Sve ispitanice potpisale su informirani pristanak na studiju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek, 30. travnja 2019. (Klasa: 602 – 04 / 19 – 08 / 04, Broj: 2158 – 61 – 07 – 19 – 41).

4.3. Metode

Od svakog uzorka jedna polovica tkiva je odmah smrznuta na suhom ledu i pohranjena na - 80°C do analize, a druga polovica je fiksirana 4 % -tnim paraformaldehidom, krioprotektirana u saharozi i smrznuta na - 80°C. Fiksirani uzorci su narezani u kriostatu na rezove debljine 10 μm i zaljepljeni na predmetna stakalca presvučena želatinom. Fiksirano i narezano tkivo je metodom fluorescentne imunohistokemije bojano na receptore za estrogen (ER), leptin (ObR) i inzulin (IR). Preparati su slikani digitalnim fotoaparatom spojenim sa svjetlosnim mikroskopom te su prikupljene slike analizirane korištenjem FIJI računalnog programa (61). Razina ekspresije spomenutih receptora uspoređena je s ekspresijom Ki - 67 markera u istim tkivima. Korištenjem metode Western blot nefiksirano, homogenizirano tkivo

je analizirano na sadržaj ER, ObR i IR. Rezultati su analizirani pomoću ImageLab računalnog programa. Učinjeno je i histološko bojenje tkiva hemalaun / eozin (HE).

4.3.1. Priprema za fluorescentnu imunohistokemiju

Od svakog uzorka tkiva jedna polovica je odmah smrznuta na suhom ledu i pohranjena na - 80°C do analize, a druga polovica je fiksirana 4 % -tnim paraformaldehidom (Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey, SAD; kataloški broj 416785000), krioprotektirana u saharozi (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; kataloški broj S0389) i smrznuta na - 80°C. Fiksirani uzorci su narezani u kriostatu (CM3050S, Leica Biosystems, Njemačka) na rezove debljine 10 μm pri temperaturi OT - 15°C, CT - 22°C i zaljepljeni na predmetna stakalca presvučena želatinom. Potom su preparati spremljeni u histološku kutiju na sušenje.

4.3.2. Fluorescentna imunohistokemija

Osušeni preparati su rehidrirani 15 min. u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi i okruženi s repelentom tekućine (Liquid blocker super PAP pen, Daido Sangyo Co., Ltd., Tokio, Japan). Imunohistokemijska analiza je provedena prema sljedećem protokolu:

- inkubacija rezova na 4 h pri + 4 °C s otopinom za blokiranje (5 % kozji serum (Thermo Fisher Scientific, kataloški broj 16210072) i 1 % albumin iz seruma goveda (Capricorn Scientific, kataloški broj BSA-1U) u puferu 1 x PBS pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH2PO4, 1,8 mM KH2PO4));
- inkubacija rezova preko 2 noći pri + 4 °C u vlažnoj komori s primarnim protutijelima na receptore: IR - α (korišteno u razrjeđenju 1:500), ObR (korišteno u razrjeđenju 1:100) i ER - α (korišteno u razrjeđenju 1:100) (Tablica 4.);
- ispiranje 3 x u trajanju 10 min u 1x PBS-u
- inkubacija u vlažnoj komori 4 h pri + 4 °C sa sekundarnim protutijelima i to protuzečijim IgG konjugiranim s FITC u slučaju IR - α i ObR (korišteno u razrjeđenju 1:300) i protumišjim IgG konjugiranim s FITC u slučaju ER - α (korišteno u razrjeđenju 1:300) (Tablica 5.);
- ispiranje 3 x u trajanju 10 min u 1 x PBS-u

- inkubacija s 4′,6 – diamidino – 2 – fenilindolom (DAPI) (Boehringer Manheim GmBH kataloški broj 236276, korišteno u razrjeđenju 1:1000);
- prekrivanje medijem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, SAD; kataloški broj H - 1000) i pokrovnim stakalcem.

Tablica 4. Primarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemijskoj analizi

Naziv protutijela	**Organizam u kojem je protutijelo napravljeno**	**Klasa protutijela**	**Proizvođač i kataloški broj**
Alfa podjedinica inzulinskog receptora, IR - α	Zec	IgG, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology Inc,Texas,SAD;SC-710
Leptinski receptor, ObR	Zec	IgG, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, SAD; SC-8325
Alfa podjednica estrogenskog receptora, ERα	Miš	IgG, poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, SAD; SC-787

Tablica 5. Sekundarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemijskoj analizi

Naziv protutijela	Organizam u kojem je protutijelo napravljeno	Klasa protutijela	Proizvođač i kataloški broj
Protuzečje IgG konjugirano s FITC	Koza	IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK; 111 – 095 – 144
Protumišje IgG konjugirano s FITC	Koza	IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK; 115 – 025 – 166

4.3.3. Kvantifikacija fluorescentne imunohistokemije

Preparati su slikani digitalnim fotoaparatom, Olympus D70 (Olympus, Tokio, Japan), spojenim na svjetlosni mikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) na povećanju od 400 x. Fotografije preparata spremljene su u tiff formatu te su analizirane računalnim programom FIJI (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD, dostupan u javnoj domeni, https://fiji.sc/) (61).

4.3.4. Western blot analiza tkiva maternice na sadržaj ER - α, IR - α i ObR

Prvi korak u Western blot analizi bilo je homogeniziranje uzoraka pomoću pomoću Potter - Elvehjemovog manualnog homogenizatora s teflonskim tučkom (Potter - Elvehjem homogenizator s teflonskim tučkom (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, SAD)) i motoriziranog homogenizatora ultra - Turrax (ultra - Turrax T 25 basic, IKA - Werke GmBH & CO, KG, Staufen, Njemačka). Uzorci su najprije izvagani, a potom u kapi homogenizacijskog pufera (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 1 mM CaCl2) s inhibitorima proteaza (100 mM

PMSF[1], 500 mM NaF[2], 200 mM Na_3VO_4[3], 1x smjesa inhibitora proteaza[4], Sigma Aldrich, kataloški broj P8340) sterilnim skalpelom usitnjeni. Uzorci su nakon toga prebačeni u manualni homogenizator, dodan im je 1 ml homogenizacijskog pufera te su homogenizirani. Otopina je prebačena u epruvetu volumena 15 ml (Fisher Scientific, SAD, kataloški broj 14-959 - 53A), dodan je još 1 ml homogenizacijskog pufera i smjesa je još jednom homogenizirana ultra - Turrax homogenizatorom. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min pri + 4 °C na 1000 g (1000 rcf) (Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Njemačka), prikupljen je supernatant, a talog odbačen.

Određena je koncentracija proteina korištenjem Qubit 3 fluorometra (Thermo Fisher Scientific, kataloški broj Q33216) i pribora Qubit protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, kataloški broj Q33212) koji se koristi za fluorescencijsko određivanje koncentracije proteina u uzorku s preciznošću od 12,5 μg / ml do 5 mg / ml. Pripremljene su epruvete volumena 0,5 ml specifično izrađene za Qubit fluorometar (Qubit assay tubes, kataloški broj Q3256) i radna otopina sačinjena od proteinskog reagensa i pufera u omjeru 1:200. Otopina je razdijeljena u epruvete i to po 190 μL za standardne otopine i uzorke. Dodano je 10 μL standarda i 10 μL uzorka u epruvete te je sadržaj kratko promiješan na miješalici (Cole - Parmer, Staffordshire, UK), a zatim inkubiran 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga izmjerena je koncentracija proteina pazeći da nije prošlo 10 min nakon inkubacije. Zatim je prema izmjerenoj koncentraciji proteina određen volumen uzorka koji će se pomiješati s 6 puta koncentriranim Laemmlijev puferom (35 % 1M Tri s/ 28 mM SDS pH 8,5, 1M SDS, 38 % glicerol, 0,18 mM bromfenol plavilo, 60,29 mM ditiotreitol u destiliranoj vodi). Smjesa uzorka i pufera za uzorke inkubirana je 5 min pri 95 °C na grijaćem bloku (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

[1] PMSF – od engl. *phenylmethylsulphonyl fluoride,* fenilmetilsulfonil fluorid, inhibitor serinskih proteaza.

[2] NaF – natrijev fluorid, inhibitor proteaza.

[3] Na_3VO_4 – natrijev ortovanadat, inhibitor proteaza.

[4] Smjesa proteaza sastoji se od serinskih, cisteinskih, kiselih proteaza i aminopeptidaza

Prethodno izlivenom poliakrilamidnom gelu (4 % - 12 % Tris-glicin) (62), odstranio se češljić za jažice, jažice su isprane s puferom za elektroforezu (25 mM Tris, 1,92 mM glicin, 0,1 % SDS), gel je smješten u kadicu za elektroforezu (Mini gel tank, Thermo Fisher Scientific, kataloški broj A25977) te su uzorci i proteinski standard (See Blue Plus 2 Pre-stained Protein Standard; ThermoFisher Scientific; kat. br. LC5925) nanešeni na gel. Proteini su razdvojeni elektroforezom u trajanju 1,5 h pri naponu od 60 V kroz gornji sabijajući gel, a potom pri 100 V kroz donji razdvajajući gel. Po završetku elektroforetskog razdvajanja proteina gel je izvađen iz kalupa te stavljen u pufer za prijenos (184 mM Tris, 140 mM glicin, 20 % metanol) da se ispere od soli i detergenta. Za to vrijeme je poliviniliden difluorid (PVDF) membrana (Immobilon - P PVDF Membrane, Millipore, IPVH00010) aktivirana inkubacijom s metanolom na 30 sekundi, isprana destiliranom vodom dok nije izgubila masni sjaj te potom stavljena u pufer za prijenos. Složen je sustav za transfer proteina s gela na PVDF membranu prema uputama proizvođača (Mini blot module, Thermo Fisher Scientific, kataloški broj B1000). Transfer proteina na membranu proveden je pri naponu od 20 V tijekom 1,5 h. Potom je membrana inkubirana s otopinom za blokiranje (5 % albumin iz seruma goveda pripremljen u (0,1 % Tween - 20 u puferu 50 mM Tris, 154 mM NaCl pH 7,4 (1 x TBST)) u trajanju od 1 h pri sobnoj temperaturi na tresilici (Rotamax 120, Heidolph, 544 – 41200 – 00). Uslijedila je inkubacija membrane s primarnim protutijelom preko noći, pri + 4 °C na rotatoru (Bio RS - 24, Biosan, Riga, Latvija). Korištena su primarna protutijela na IR-α (korišteno u razrjeđenju 1:100), ObR (korišteno u razrjeđenju 1:100) i ER - α (korišteno u razrjeđenju 1:100) (Tablica 4.). Nakon toga membrana je isprana 2 puta kratko i 3 puta po 5 min u 1 x TBST-u.

Uslijedila je inkubacija sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s enzimom peroksidazom hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) u trajanju 1 h pri sobnoj temperaturi na rotatoru. Korištena su sekundarna protutijela protuzečje IgG konjugirano s HRP pripremljeno u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, SAD; kataloški broj SC - 2034) za detekciju IR i ObR te protumišje IgG konjugirano s HRP pripremljeno u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, SAD; kataloški broj SC - 2005) za detekciju ER. Membrana je isprana 3 puta po 5 min u 1 x TBST - u, a potom je učinjeno razvijanje s kemiluminiscentnim supstratom (Super Signal West Femto max sensitivity substrate; Thermo Scientific, kataloški broj 34096). Slike membrana prikupljene su pomoću uređaja Chemidoc MP (Biorad, Hercules, CA, SAD) uz

automatski određeno vrijeme ekspozicije. Za normalizaciju učinjenih Western blotova membrane su nakon vizualizacije isprane s 1 x TBST- om, a zatim blokirane s otopinom za blokiranje (5 % -tno nemasno mlijeko u prahu (Santa Cruz, SC - 2324) u 1 x TBST) na 1 h pri sobnoj temperaturi. Uslijedilo je inkubiranje membrane s protutijelom na gliceraldehid - 3 - fosfat dehidrogenazu konjugiranim s HRP (engl. Anti-glyceraldehide - 3 - phosphate dehydrogenase, anti - GAPDH) pripremljenom u razrjeđenju 1:10.000 u otopini za blokiranje (Proteintech, Manchester, UK; kat.br. HRP60004). Nakon ispiranja 3 x 5 min u 1 x TBST - u uslijedila je vizualizacija s kemiluminiscentnim supstratom (Amersham biosciences; kataloški broj RPN2106V2) te prikupljanje slika koristeći uređaj Chemidoc MP. Pomoću FIJI računalnog programa učinjena je denzitometrija izražaja IR, ObR, ER i GAPDH. Rezultati su prebačeni u računalni program Excel te je učinjena normalizacija navedenih receptora u odnosu na izražaj GAPDH.

4.3.5. Hemalaun-eozin bojenje tkiva

Hemalaun-eozin bojenje tkiva provedeno je pri sobnoj temperaturi prema sljedećem protokolu:

- hidracija u destiliranoj vodi, 5 min
- hidracija u seriji etanola (70 %, 96 %, 100 %, 100 %) po 5 min
- ksilen, 5 min
- dehidracija u seriji etanola (100 %, 100 %, 96 %, 70 %) po 5 min
- destilirana voda, 5 min
- bojenje hemalaunom, 10 min
- ispiranje destiliranom vodom, 1 min
- ispiranje tekućom vodom, 10 min
- destilirana voda, 1 min
- bojenje eozinom, 30 sec
- ispiranje destiliranom vodom, 5 sec
- serija etanola (70 %, 96 %, 100 %, 100 %) po 5 puta
- uklanjanje etanola ksilenom, 5 min

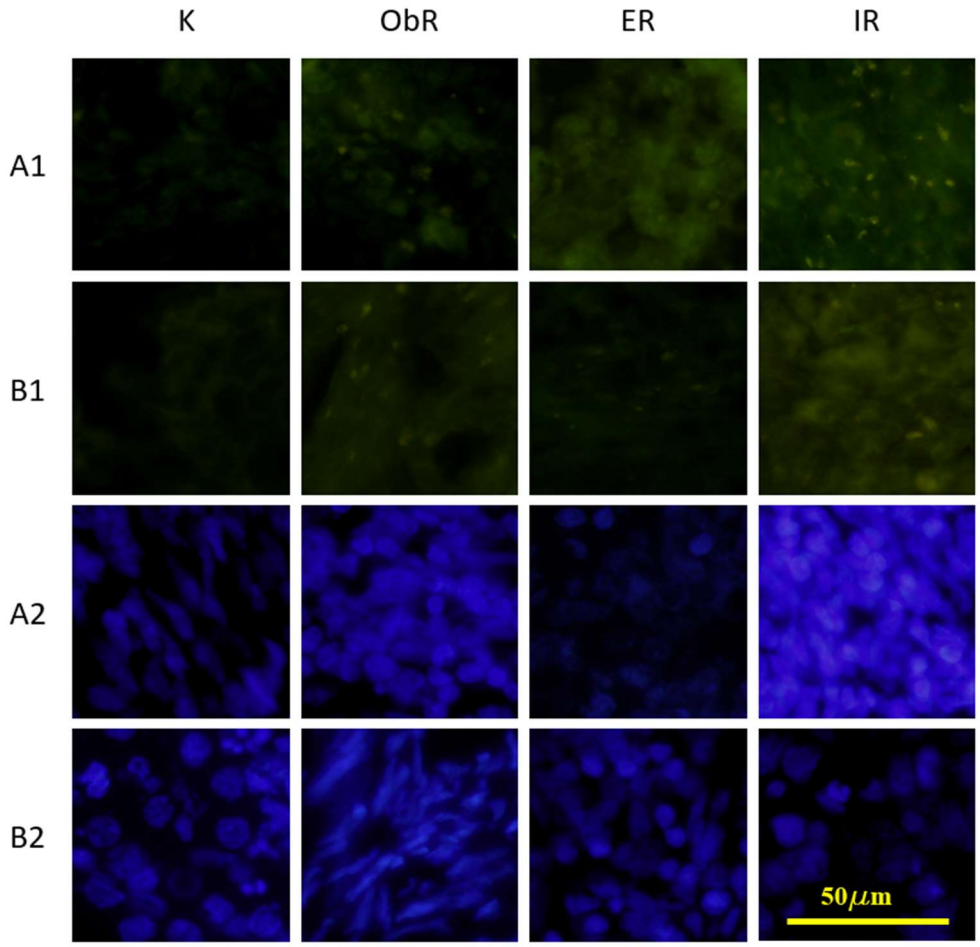
4.3.6. Statističke metode

Za statističku analizu korišten je statistički program Statistica 12 (Dell, SAD). Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro-Wilk testom. Brojčani podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom po potrebi. Razina značajnosti određena je s $p < 0,05$. Kod normalne distribucije koristio se Studentov t-test, a kod ostalih primjenio se Wilcoxonov test sume rangova. Povezanost je ocijenjena Pearsonovim koeficijentom korelacije r.

5. REZULTATI

5.1. Imunohistokemijska analiza receptora za leptin, inzulin i estrogen u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice

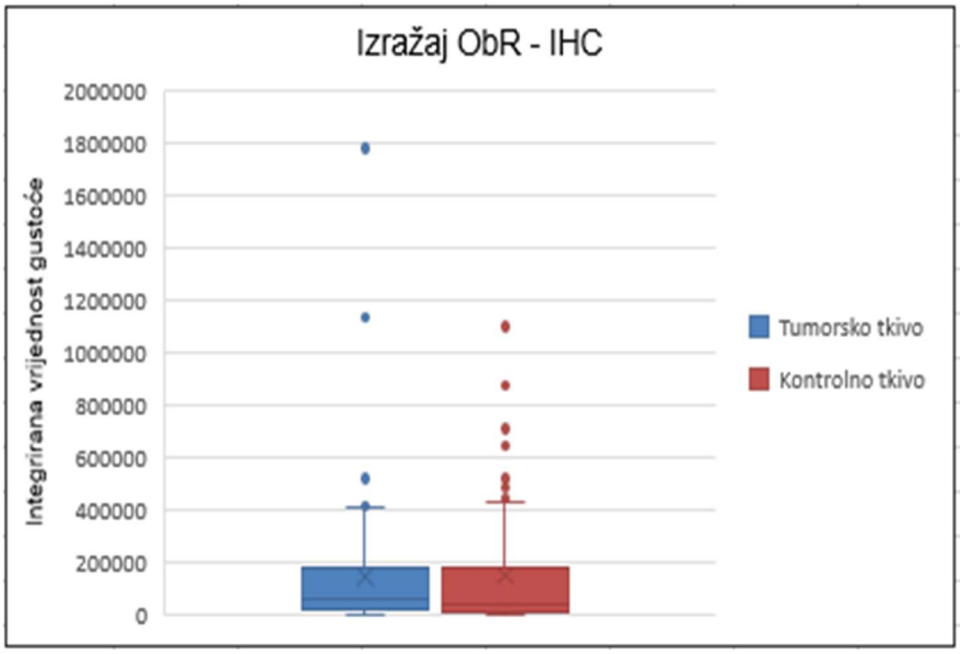
Analiziran je izražaj ObR, IR i ER receptora u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice, a rezultati su prikazani za svaki receptor posebno.



Slika 1. Izražaj ObR, ER i IR u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice. Povećanje 400 X, skala 50 μm. **Legenda:** A1 i B1 - tumorsko i kontrolno tkivo obilježeno fluorescentnom bojom (FITC), A2 i B2 - tumorsko i kontrolno tkivo obilježeno nuklearnom bojom 4',6 - diamidino - 2 - fenilindolom (DAPI), ER - receptor za estrogen ,IR - receptor za inzulin, K - negativna kontrola za sekundarno protutijelo, ObR - receptor za leptin

5.1.1. Izražaj receptora za leptin

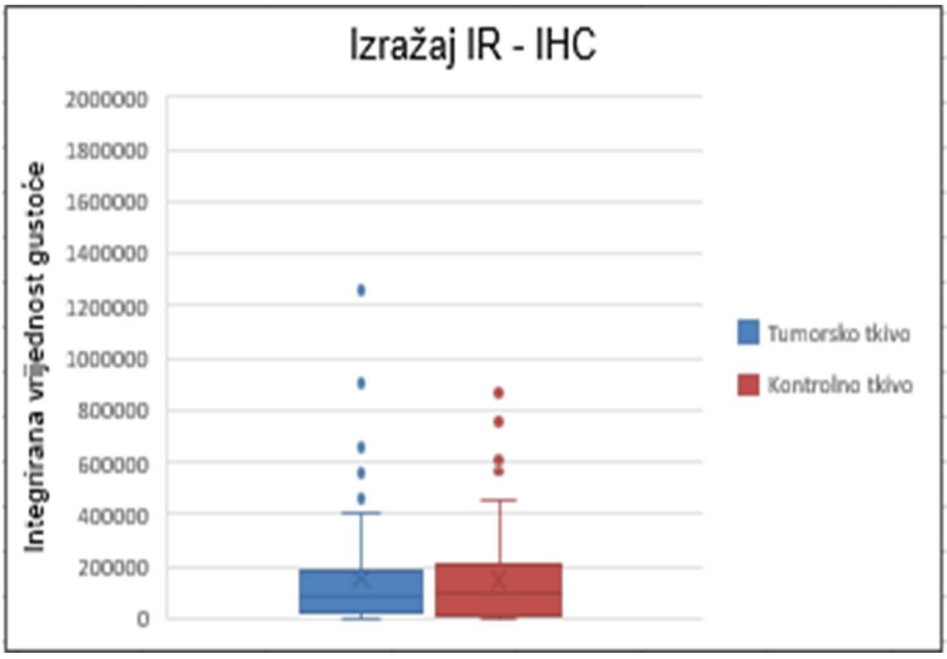
Imunohistokemijska analiza je pokazala da je ObR izražen u obe analizirane skupine (A - tumorsko tkivo maternice, B - kontrolno tkivo maternice). U skupini A obrađeno je 79 uzoraka, a u skupini B 76 uzoraka. Ekspresija ObR receptora nije slijedila normalnu distribuciju (distribucija testirana *Shapiro-Wilk Normalitiy* testom), pa su se razlike između varijabli utvrdile Wilcoxonovim testom sume rangova. Razlike nisu bile statistički značajne ($p = 0,35$). Skupina A imala je veću izraženost ObR (medijan je iznosio 63632,66) nego skupina B (medijan je iznosio 40755,94) i nekoliko ekstrema (najveći je 1778809).



Slika 2. Kvantifikacija imunopozitivne reakcije receptora ObR. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$, kružići - stršeće vrijednosti.

5.1.2. Izražaj receptora za inzulin

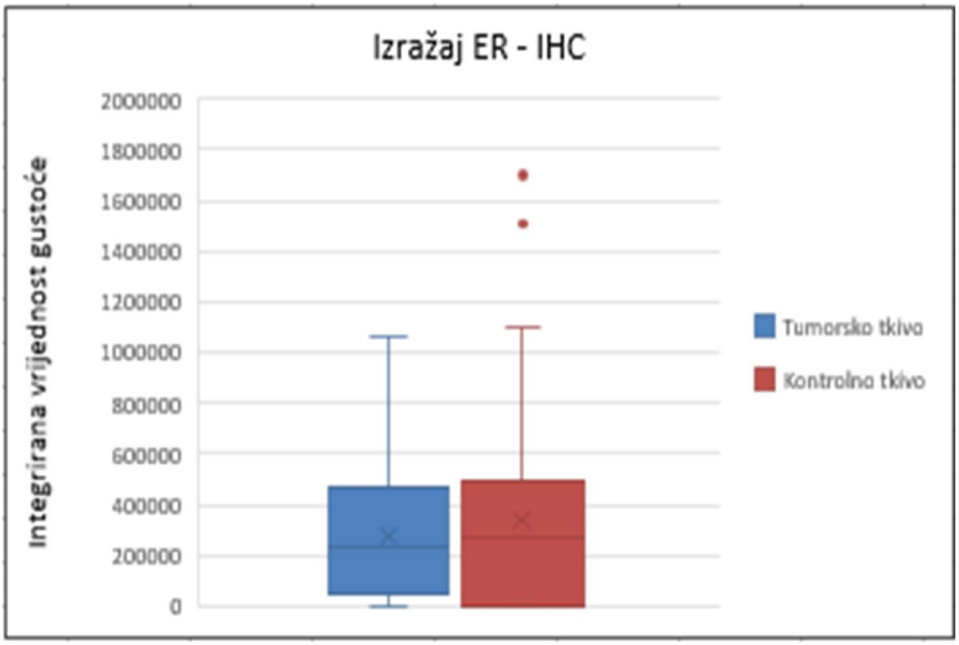
Imunohistokemijska analiza je pokazala da je IR izražen u obe analizirane skupine (A - tumorsko tkivo maternice, B - kontrolno tkivo maternice). U skupini A obrađeno je 80 uzoraka, a u skupini B 77 uzoraka. Ekspresija IR receptora nije slijedila normalnu distribuciju (distribucija testirana *Shapiro-Wilk Normalitiy* testom), pa su se razlike između varijabli utvrdile Wilcoxonovim testom sume rangova. Razlike nisu bile statistički značajne (p = 0,83). Skupina A imala je manju izraženost IR (medijan je iznosio 84356,8) nego skupina B (medijan je iznosio 98452,9) iako je imala nekoliko ekstrema od kojih je najveći 1257959.



Slika 3. Kvantifikacija imunopozitivne reakcije receptora IR. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$, kružići - stršeće vrijednosti.

5.1.3. Izražaj receptora za estrogen

U skupini A obrađeno je 79 uzoraka, a u skupini B 82 uzorka. Ekspresija ER receptora nije slijedila normalnu distribuciju (distribucija testirana *Shapiro-Wilk Normalitiy* testom), pa su se razlike između varijabli utvrdile Wilcoxonovim testom sume rangova. Razlike nisu bile statistički značajne (p = 0,87). Skupina A (tumorsko tkivo) imala je manju izraženost ER (medijan je iznosio 227407,4) nego kontrolna skupina B (medijan je iznosio 268070,3).



Slika 4. Kvantifikacija imunopozitivne reakcije receptora ER. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$, kružići - stršeće vrijednosti.

5.1.4. Povezanost receptora (imunohistokemijska metoda)

U kontrolnom tkivu izražaj ObR bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem ER u tkivu karcinoma maternice (koeficijent korelacije r = 0,37 , p = 0,001).

U kontrolnom tkivu izražaj ObR bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem ER u kontrolnom tkivu (koeficijent korelacije r = 0,32, p = 0,005).

U kontrolnom tkivu izražaj ObR bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem IR u tkivu karcinoma maternice (koeficijent korelacije r = 0,35, p = 0,002).

U kontrolnom tkivu izražaj IR bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem ER u tkivu karcinoma maternice (koeficijent korelacije r = 0,32, p = 0,004).

5.2. Izražaj markera za proliferativnost karcinoma antigen Ki - 67

Tablica 6. Izražaj markera Ki - 67

Uzorci tkiva	Dijagnoza*	% Ki - 67 (+) stanica
1	HGSPCE	80 %
2	CEEsPD G2	65 %
3	CEE G3	65 %
4	CEE G2	45 %
5	HGSPCE	70 %
6	CEE G2	40%
7	CEEsPD G1	45 %
8	CEE G1	20 %
9	CEE G3	60 %
10	CEEvg G1	25 %

* HGSPCE - serozni papilarni karcinom endometrija visokog stupnja, CEEsPD - endometrioidni karcinom endometrija s pločastom diferencijacijom, CEE - endometrioidni karcinom endometrija, CEEvg - endometrioidni karcinom endometrija viloglandularni, G1 - G3 - histološki gradus tumora 1 - 3.

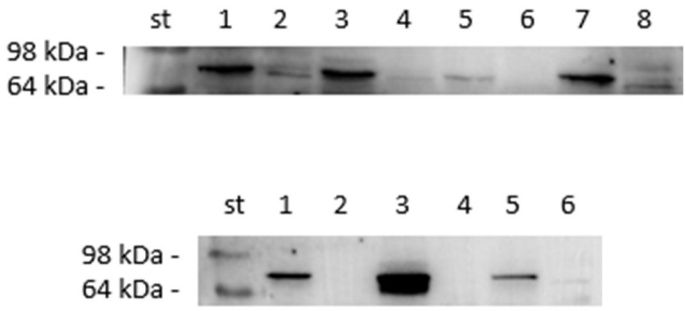
Marker za proliferativnost karcinoma antigen Ki - 67 bio je pozitivan u svim uzorcima. Najviši rezultat bio je 80 %.

5.3. Western blot analiza ObR, IR i ER receptora u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice

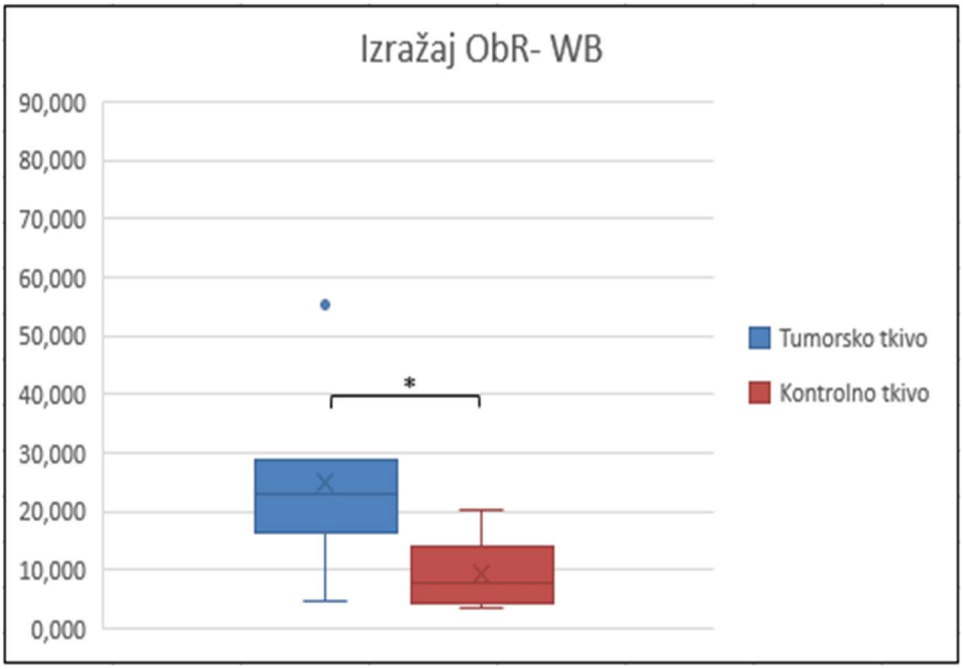
Western blot metodom analiziran je sadržaj ObR, IR i ER u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice, a rezultati su prikazani za svaki receptor posebno.

5.3.1. Western blot analiza na sadržaj ObR

U skupini A i B testirano je po 7 uzoraka. Skupina A imala je statistički značajno višu izraženost leptinskog receptora (aritmetička sredina iznosila je 24,8 sa standardnom devijacijom od 15,5) od skupine B (aritmetička sredina iznosila je 9,3 sa standardnom devijacijom od 5,9). Među skupinama ima statistički značajne razlike u izražaju ObR-a (Wilcoxonov test sume rangova, $p = 0,02$). Denzitometrijski su analizirane izoforme ObR-a u razini veličine proteina od 98 kDa do 64 kDa (slika 5.).



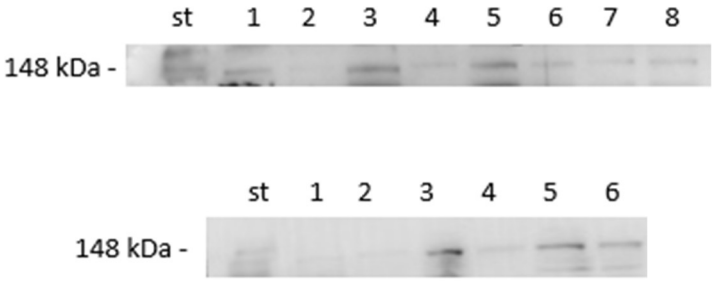
Slika 5. Analiza izražaja receptora ObR Western blot metodom. st - standard, brojevi 1 - 8 označavaju broj uzorka (gornja slika: 1, 3, 5, 7 - uzorci skupine A; 2, 4, 6, 8 - uzorci skupine B; donja slika: 1, 3, 5 - uzorci skupine A; 2, 4, 6 - uzorci skupine B).



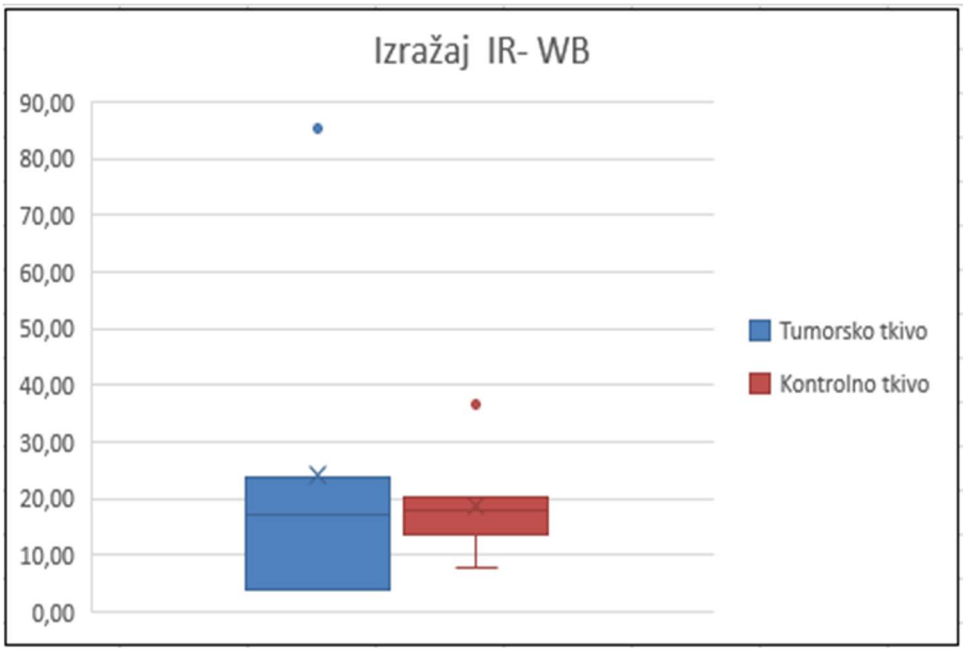
Slika 6. Usporedba vrijednosti izražaja receptora ObR u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$, kružić - stršeća vrijednost,*- označuje statistički značajnu razliku između skupina.

5.3.2. Western blot analiza na sadržaj IR

U skupini A i B testirano je po 7 uzoraka. Skupina A pokazuje nešto višu izraženost inzulinskog receptora (aritmetička sredina iznosila je 23,9 sa standardnom devijacijom od 28,3) od skupine B (aritmetička sredina iznosila je 18,5 sa standardnom devijacijom od 8,9) te jedan ekstrem od 85,48. Među skupinama nema statistički značajne razlike u izražaju IR-a (Wilcoxonov test sume rangova, p = 0,90). Denzitometrijski su analizirane izoforme IR-a u razini veličine proteina od 148 kDa .



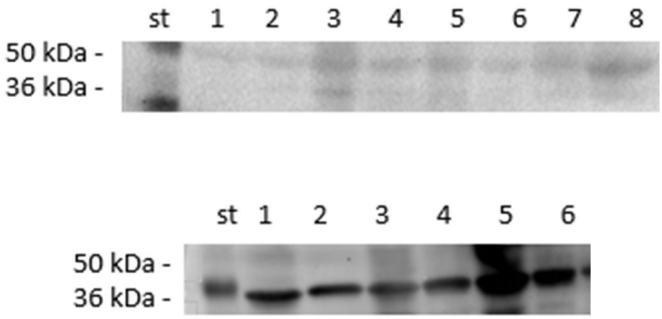
Slika 7. Analiza izražaja receptora IR Western blot metodom. st - standard, brojevi 1 - 8 označavaju broj uzorka (gornja slika: 1, 3, 5, 7 - uzorci skupine A; 2, 4, 6, 8 - uzorci skupine B; donja slika: 1, 3, 5 - uzorci skupine A; 2, 4, 6 - uzorci skupine B).



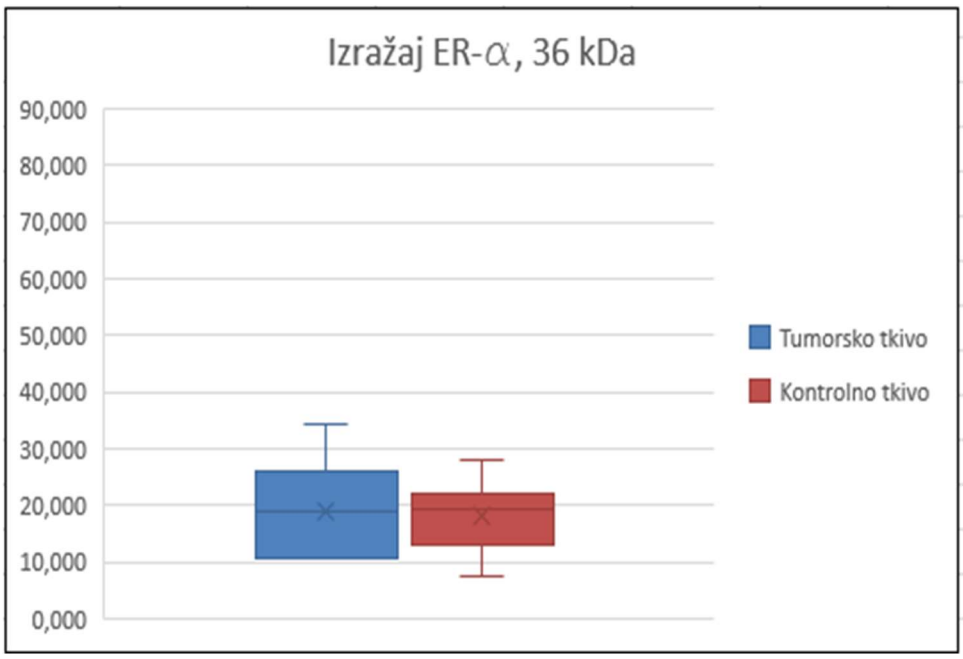
Slika 8. Usporedba vrijednosti izražaja receptora IR u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$, kružići -stršeće vrijednosti.

5.3.3. Western blot analiza na sadržaj ER

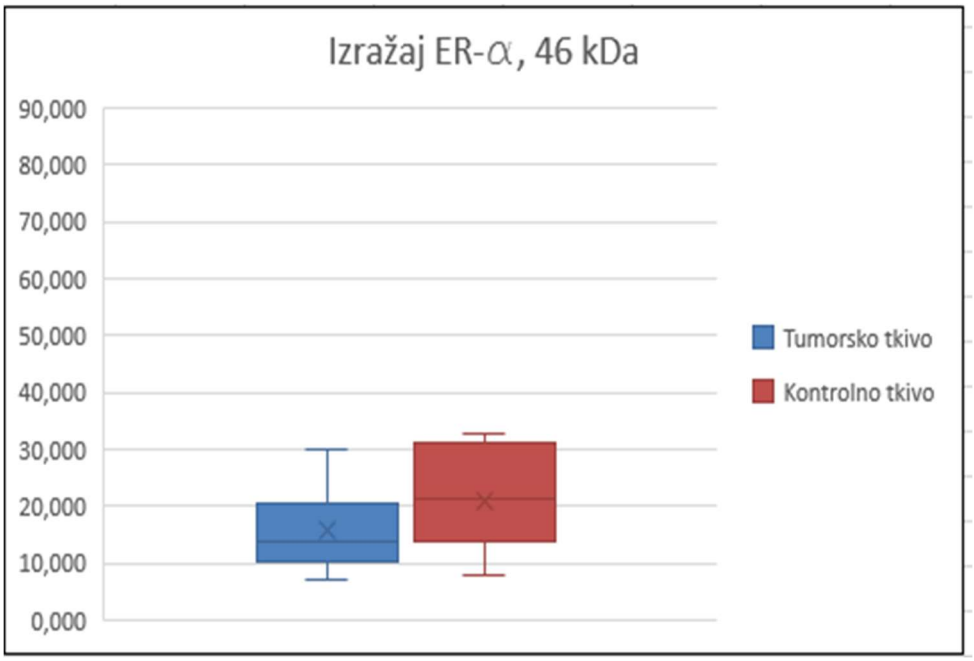
U skupini A i B testirano je po 7 uzoraka. Skupina A pokazuje nešto višu izraženost estrogenskog receptora (aritmetička sredina iznosila je 18,8 sa standardnom devijacijom od 9,03) od skupine B (aritmetička sredina iznosila je 17,9 sa standardnom devijacijom od 6,7) na 36 kDa, a na 46 kDa skupina A pokazuje manju izraženost (aritmetička sredina iznosila je 15,8 sa standardnom devijacijom od 7,6) od skupine B (aritmetička sredina iznosila je 21 sa standardnom devijacijom od 8,9). Među skupinama nema statistički značajne razlike u izražaju ER-a (Studentov t-test, na 36 kDa p = 0,48, a na 46 kDa p = 0,72). Denzitometrijski su analizirane izoforme ER-α u razini veličine proteina od 36 kDa i 46 kDa .



Slika 9. Analiza izražaja receptora ER Western blot metodom. st - standard, brojevi 1 - 8 označavaju broj uzorka (gornja slika: 1, 3, 5, 7 - uzorci skupine A; 2, 4, 6, 8 - uzorci skupine B; donja slika: 1, 3, 5 - uzorci skupine A; 2, 4, 6 - uzorci skupine B).



Slika 10. Usporedba vrijednosti izražaja receptora ER-α, 36 kDa u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$.



Slika 11. Usporedba vrijednosti izražaja receptora ER-α, 46 kDa u tumorskom i kontrolnom tkivu maternice. Medijan - crta u kutiji, kutija - gornja i donja kvartila, brkovi - minimum i maksimum, aritmetička sredina - $\bar{x}$.

5.3.4. Povezanost receptora (Western blot metoda)

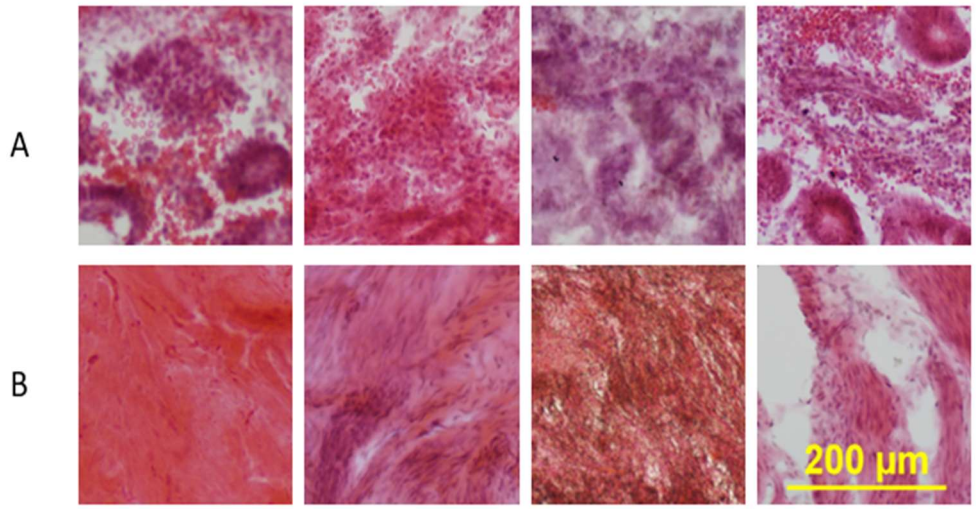
U kontrolnom tkivu izražaj između ER-α 46 bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem IR u kontrolnom tkivu (koeficijent korelacije r = 0,80, p = 0,03).

U kontrolnom tkivu izražaj ER-α 36 bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem ER-α 46 u tkivu karcinoma maternice (koeficijent korelacije r = 0,80, p = 0,03).

U kontrolnom tkivu izražaj ER-α 36 bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem ER-α 46 u kontrolnom tkivu (koeficijent korelacije r = 0,93, p = 0,003).

U tkivu karcinoma maternice ER-α 36 bio je statistički značajno pozitivno koreliran s izražajem ER-α 46 u tkivu karcinoma maternice (koeficijent korelacije r = 0,93, p = 0,003).

5.4. Rezultati bojenja tkiva hemalaun-eozinom



Slika 12. Tumorsko (A) i kontrolno (B) tkivo maternice obojeno hemalaun - eozinom. Povećanje 400 X, skala 200 µm.

Tumorsko tkivo je endometrij maternice, a kontrolno tkivo većinom miometrij (68 %).

6. RASPRAVA

6.1. Analiza izražaja ObR

Leptin, produkt gena za pretilost (Ob) proizvodi se u masnom tkivu, izražava se u normalnim i malignim tkivima. Razine leptina pozitivno koreliraju s BMI i količinom masnog tkiva. Leptin ima proupalno djelovanje koje stimulira proizvodnju IL - 1, IL - 6, IL - 12, TNF - α, leukotriena i ciklooksigenaze 2 (COX2) (63). Djeluje preko svojih transmembranskih receptora (ObR).Vezanje leptina na ObR aktivira Janus kinazu (JAK), a ona stimulira PI3 - kinazu koja povećava migraciju i invaziju stanica te stimulira glavni put rasta i preživljavanja Akt- a (37).

Brojne studije pokazale su povezanost povećane tjelesne mase sa rizikom za karcinom endometrija, ali precizna uloga leptina u nastanku i progresiji raka još nije do kraja istražena. Studija slučajeva i kontrola u Grčkoj pokazala je da leptin u serumu ima jaku pozitivnu povezanost s karcinomom endometrija. Pokazala je i povezanost cirkulirajućih razina leptina i mogućeg uključivanja leptinskog receptora u patogenezu raka endometrija, ali izravna uloga leptina u progresiji raka endometrija nije razjašnjena (64). Studija Sharme i sur. iz 2006. godine pokazala je da tretiranje leptinom povećava koncentraciju hormonski osjetljivih Ishikawa stanica (ECC1 - tip I, stanice karcinoma endometrija tipa I) te da leptin snažno inducira invaziju stanica raka endometrija. Također, tretiranje leptinom stimuliralo je proliferaciju i invaziju SPEC - 2 stanica, koje su stanična linija raka endometrija tipa II (38). Neke studije pokazale su da je ObR pozitivan i u normalnim stanicama i stanicama karcinoma (7), što je u skladu s rezultatima ovoga istraživanja.

Imunohistokemijska analiza ObR-a nije pokazala statistički značajnu razliku izraženosti ObR-a između tumorskog i kontrolnog tkiva maternice iako je u tumorskom tkivu ekspresija bila nešto veća sa nekoliko ekstrema. Razlog takvih rezultata mogla bi biti različitost u skupinama tkiva, jer je tumorsko tkivo bilo endometrij, a kontrolno tkivo maternice većinom miometrij (68 %), ili manja osjetljivost metode. Western blot analiza dala je znakovitije rezultate jer je uočena statistički značajna razlika u izraženosti ObR-a između

tumorskog i kontrolnog tkiva maternice, što je u skladu s rezultatima nekih *in vitro* i *in vivo* studija (65, 66). Nedavne studije pokazale su da se signalizacija ObR-a može križati sa signalizacijom ER-a jer leptin povećava stabilnost estrogenog receptora α (ERα). Također, leptin može povisiti razinu estrogena aktivacijom ekspresije i aktivnosti aromataze (67). Ta pozitivna korelacija uočena je u ovom istraživanju.

6.2. Analiza izražaja IR

Inzulin je regulator metabolizma stanica, ali i faktor rasta. Njegovi efekti u ciljnim stanicama posredovani su receptorom za inzulin (IR), transmembranskim proteinom s tirozin kinaznom aktivnošću (68). Vjerojatno je da povišene razine inzulina povećavaju aktivnost IGF - 1 u tkivu endometrija suzbijanjem ekspresije gena endometrijskog GFBP - 1 (63). Stoga se previsoke vrijednosti receptora za inzulin (IR) i IGF (IGF - IR) povezuju s nastankom, ali i progresijom karcinoma. Osim inzulina na ove receptore vežu se i ligandi IGF - 1 i IGF - 2 (57). To vezanje dovodi do aktivacije dvaju glavnih signalnih puteva, metaboličkog i antiapoptotičkog (PI3K) i mitogenog MAPK. U prvome putu dolazi do aktivacije fosfoinozitid 3 - kinaze kojom se inducira protein kinaza B (AKT). AKT inhibira BAD, Bcl - 2 asocirani promotor smrti i konačni ishod je inhibicija apoptoze (58).

Tumorska tkiva, uključujući tumore endometrija općenito imaju povišene razine inzulinskog receptora (IR). Inzulinski receptor izražen je u stanicama karcinoma endometrija, ali i u zdravim stanicama, što je u skladu s rezultatima imunohistokemijske i Western blot analize koje su pokazale izraženost IR receptora u tumorskom i kontrolnom tkivu. Nešto veća izraženost uočena je u tumorskom tkivu. Mnogi tumori izražavaju inzulinski receptor u visokim razinama jer je poznato da nenormalna signalizacija povećava metaboličku aktivnost stanica dovodeći do oksidativnog stresa i oštećenja DNA u vidu mutacija (63). Rezultati ove studije nisu pokazali statistički značajnu razliku u izraženosti IR između tumorskog i kontrolnog tkiva maternice.

Inzulin daje i ključni poticaj za sintezu androgena te tako doprinosi višku estrogena. Osim toga inzulin inhibira sintezu globulina koji vežu spolne hormone (eng. *Sex hormone-*

binding globulin, SHGB) te na taj način regulira njihovu aktivnost i posljedično dovodi do povećanja estrogena (63).

Rezultati ove studije pokazuju pozitivnu korelaciju između receptora IR i ER.

6.3. Analiza izražaja ER

Estrogen je signalna molekula koja pasivno ulazi u ciljnu stanicu i veže se za jezgrine receptore koji su transkripcijski čimbenici i potiču ekspresiju gena ranog i kasnog odgovora. Estrogenski receptori (ER) pripadaju superobitelji hormonskih receptora i eksprimirani su samo u ciljnim tkivima. ER putem receptorskih tirozin kinaza sudjeluje u aktivaciji kinaza ovisnih o mitogenima (MAPK) što povećava razinu cAMP-a i potiče proliferaciju stanica (48).

Jedna od glavnih karakteristika karcinoma endometrija je izraženost estrogenskih receptora (ER). Poznato je da povećanje estrogena dovodi do mitotičke aktivnosti stanica endometrija, povećanog broja pogrešaka u replikaciji i somatskih mutacija koje rezultiraju malignim fenotipom (69). Dosadašnje studije pokazale su da je ER izražen u tumorskim i normalnim stanicama, što je u skladu s rezultatima ove studije. Novije imunohistokemijske metode s protutijelima omogućile su bolju analizu ER i dovele do spoznaje da je razina estrogenskog receptora u tumoru obrnuto proporcionalna njegovom stadiju što je razumljivo jer su tumori višeg stadija nezreliji (70). Mnoge studije govore o korelaciji negativnog statusa ER s lošim prognostičkim čimbenicima. Gubitak ER ukazuje na poodmaklu molekularnu patologiju tumora s poremećajem regulacije signalnih putova (71).

U ovom istraživanju nije uočena statistički značajna razlika u izraženosti ER između tumorskog i kontrolnog tkiva maternice.

6.4. Analiza izražaja markera za proliferativnost karcinoma antigen Ki - 67

Ki - 67 antitijela prepoznaju nuklearni protein koji je izražen samo u proliferirajućim stanicama pa je Ki - 67 široko korišteni marker proliferacije kao i prognostički faktor kod karcinoma endometrija (72).

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju marker Ki - 67 bio je pozitivan u svih 10 uzoraka u rasponu od 20 do 80 %. Najviše vrijednosti imali su serozni papilarni karcinom endometrija visokog stupnja i endometrioidni karcinom endometrija s pločastom diferencijacijom i karcinomi višeg gradusa.

Kako je u radu uočen statistički značajan izražaj ObR u karcinomu endometrija rezultati izražaja markera Ki - 67 potvrđuju njegov proliferativni učinak na stanice karcinoma.

Zaključno, metoda Western blot pokazala se osjetljivijom za analizu izraženosti receptora ObR, IR i ER. Statistički značajna pokazala se samo razlika izražaja ObR između tumorskog i kontrolnog tkiva maternice. Kako je poznato da je pretilost faktor rizika za karcinom endometrija leptin bi mogao poslužiti kao korisna osnova za definiranje molekularnih podtipova. Također, visok izražaj markera za proliferativnost karcinoma antigen Ki – 67 ukazuje na proliferativni učinak leptina na stanice karcinoma endometrija.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

- U usporedbi s kontrolnim tkivom maternice, ekspresija leptinskog receptora u karcinomima endometrija povećana je.
- U usporedbi s kontrolnim tkivom maternice, ekspresija inzulinskog receptora u karcinomima endometrija nije povećana.
- U usporedbi s kontrolnim tkivom maternice, ekspresija estrogenskog receptora u karcinomima endometrija nije povećana.
- Visoki izražaj markera Ki-67 ukazuje na proliferativni učinak leptina na stanice karcinoma endometrija.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Kvantificirati i usporediti ekspresiju receptora za estrogen (ER), leptin (ObR), inzulin (IR) te markera za proliferativnost karcinoma antigen Ki - 67 u kontrolnom tkivu maternice i tkivu karcinoma endometrija korištenjem imunohistokemijske metode i Western blot metodom odrediti razinu ekspresije sva tri navedena receptora u kontrolnom tkivu maternice i tkivu karcinoma endometrija.

Nacrt studije: Retrospektivna studija parova.

Ispitanice i metode: U studiju je uključeno 10 uzoraka kontrolnih tkiva i 10 uzoraka tkiva karcinoma endometrija. Prosječna dob kontrolne skupine bila je 54,3 godine, a pacijentica s karcinomom endometrija 66,05 godina. Fiksirani uzorci su narezani u kriostatu na rezove debljine 10 μm i zaljepljeni na predmetna stakalca presvučena želatinom. Fiksirano i narezano tkivo je metodom fluorescentne imunohistokemije bojano na receptore za estrogen (ER), leptin (ObR) i inzulin (IR). Preparati su slikani digitalnim fotoaparatom spojenim sa svjetlosnim mikroskopom, a prikupljene slike analizirane korištenjem FIJI računalnog programa. Razina ekspresije spomenutih receptora uspoređena je s ekspresijom Ki - 67 markera u istim tkivima. Korištenjem metode Western blot nefiksirano, homogenizirano tkivo je analizirano na sadržaj ER, ObR i IR. Rezultati su analizirani pomoću ImageLab računalnog programa. Učinjeno je i HE (hemalaun - eozin) bojenje tkiva.

Rezultati: Rezultati imunohistokemijske analize nisu pokazali statistički značajnu razliku u ekspresiji receptora ObR, IR i ER između tumorskog i kontrolnog tkiva maternice. Statistički značajna razlika u ekspresiji recepora ObR između tumorskog i kontrolnog tkiva maternice dobivena je Western blot metodom.

Zaključak: Ekspresija receptora ObR povećana je u karcinomu endometrija dok ekspresija receptora IR i ER nije.

Ključne riječi: ER; imunohistokemijska metoda; IR; ObR; Western blot metoda

9. SUMMARY

Role of insulin and leptin receptors in the growth of endometrial cancer

Objectives: To quantify and to compare the expression of estrogen receptors (ER), leptin receptors (ObR), insulin receptors (IR) and proliferation marker Ki - 67 in the control uterine tissue and the endometrial cancer tissue. To determine the level of expression of the three above mentioned receptors in the control uterine tissue and the endometrial cancer tissue by using immunohistochemical method and Western Blot method.

Study Design: Retrospective matched pair study.

Participants and Methods: The study includes 10 specimens of control uterine tissues and 10 specimens of the endometrial cancer tissues. The average age of the control group was 54,3 years, while the average age of those with endometrial cancer was 66,05. The fixed specimens were sliced in microtome-cryostat to 10μm thick slices and mounted to gelatin-coated slide glass. The fixed and sliced tissues were immunohistochemically stained to estrogen receptors, leptin receptors and insulin receptors. Prepared mount slides were taken picture of with a camera connected to optical microscope. The pictures were than analyzed by FIJI software. The level of the expression of the mentioned receptors was compared with the expression of Ki-67 marker in the same tissues. Western Blot method was used to analyze the non-fixed, homogenized tissue for the consistence of ER, ObR and IR. The results were analyzed by ImageLab software. Hematoxylin and eosin (HE) stain was conducted as well.

Results: The results of immunohistochemical analysis did not show statistically relevant difference in the expression of ObR, IR and ER between control uterine tissue and the endometrial cancer tissue. Statistically relevant difference in the expression of ObR between control uterine tissue and the endometrial cancer tissue was obtained by Western Blot method.

Conclusion: The expression of ObR is higher in the endometrial cancer tissue while the expression of IR and ER is not.

Keywords: ER, immunohistochemical method, IR, ObR, Western Blot Method

10. LITERATURA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistic 2018. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424.

2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Bilten br. 40. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018.

3. Damjanov I, Jukić S i Nola M. Patologija. 3.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

4. Šimunić V, i sur. Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001.

5. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. 1.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.

6. Mutter GL, Ferenczy A. Anatomy and histology of the uterine corpus. U: Kurman RJ, urednik. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5. izd. New York: SpringerVerlag; 2002. str. 383-419.

7. Mariani A, Dowdy SC, Podratz KC. Rethinking traditional surgical–pathologic criteria for early endometrial cancer: studies of patterns of failure. Prog Predict Fact Gynecol Canc. 2007;15:155.

8. Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. Mod Pathol. 2000 Mar 1;13(3):295-308.

9. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 1983;15(1):10-17.

10. Barakat RR, Markman M, Randall M, editors. Principles and practice of

gynecologic oncology. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

11. Sénéchal C, Cottereau E, de Pauw A, Elan C, Dagousset I, i sur. Environmental and genetic risk factors for endometrial carcinoma. Bull Cancer. 2015;102(3):256-69.

12. Shiozawa T, Konishi I. Early endometrial carcinoma: clinicopathology, hormonal aspects, molecular genetics, diagnosis, and treatment. Int J Clin Oncol. 2006;11(1):13-21.

13. Daniilidis A, Pantelis A, Dinas K, Tantanasis T, Loufopoulos PD, Angioni S, i sur. Indications of diagnostic hysteroscopy, a brief review of the literature. Gynecol Surg. 2012;9(1):23-8.

14. Ryan AJ, Susil B, Jobling TW, Oehler MK. Endometrial cancer. Cell Tissue Res. 2005;322(1):53-61.

15. Sanderson PA1, Critchley HO2, Williams AR3, Arends MJ4,5, Saunders PT1. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. Hum Reprod Update. 2017 Mar 1;23(2):232-254.

16. Emons G, Beckmann MW, Schmidt D, Mallmann P. New WHO classification for endometrial Hyperplasis. Geburtdhilfe Frauenheilkd. 2015;75(2):135-6.

17. McKenney JK, Longacre TA. Low-grade endometrial adenocarcinoma: a diagnostic algorithm for distinguishing atypical endometrial hyperplasia and other benign (and malignant) mimics. Adv Anat Pathol 2009; 16(1):1–22.

18. Takeshima N, Nishida H, Tabata T i sur. Positive peritoneal cytology in endometrial cancer: enhancement of other prognostic indicators. Gynecol Oncol 2001;82(3):470–473.

19. Mariani A, Dowdy SC, Cliby WA i sur. Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: a paradigm shift in surgical staging. Gynecol Oncol 2008;109(1):11–18.

20. Moore DH. Surgical Staging and Cervical Cancer: after 30 years, have we reached a conclusion? Cancer 2008;112:1874–6.

21. Liu L, Segara A, Hagemann AR. Obesity Education Strategies for Cancer Prevention in Women's Health. Curr Obstet Gynecol Rep. 2015;4:249-58.

22. Köchli OR, Sevin BU, Benz J, Petru E, Haller U. Gynäkologische Onkologie: Manual für Klinik und Praxis. Springer-Verlag; 2017.

23. Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, de Latour M, Le Bouedec G, Penault-Llorca F. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. Gynecol Oncol. 2000 Aug 1;78(2):181-6.

24. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. BMJ. 1995; 311:158-161.

25. Zyromski NJ, White PB. Pancreatic Cancer in Obesity: Epidemiology, clinical observations, and basic mechanisms. Anti-Cancer Agents in Med Chem 2011;11:470–8.

26. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. J Obes 2013;2013:291-546.

27. Divella R, De Luca R, Abbate I, et al. Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. J Cancer. 2016;7:2346–2359.

28. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to inuslin resistance and type 2 diabetes. Nature. 2006; 444:840-846.

29. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, i sur. Interna medicina. Endokrini sustav, bolesti metabolizma i bolesti skeleta. Pretilost i metabolički sindrom. Zagreb: Naklada ljevak; 2008.

30. Shoff SM, Newcomb PA. Diabetes, body size, and risk of endometrial cancer. Am J Epidem. 1998;148(3):234-40.

31. Soliman PT, Wu D, Tortolero-Luna G, Schmeler KM, Slomovitz BM, Bray MS, i sur. Association between adiponectin, insulin resistance, and endometrial cancer. Cancer. 2006;106(11):2376-81.

32. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2006;6:772–83.

33. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, i sur. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. Int J Obes Relat Metab Disord. 2002; 26:1407-1433.

34. Gautron L, Elmquist JK. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. J Clin Invest. 2011; 121:2087-2093.

35. Dogan S, Rogozina OP, Lokshin AE, et al. Effects of chronic vs. intermittent calorie restriction on mammary tumor incidence and serum adiponectin and leptin levels in MMTV-TGF-α mice at different ages. Oncol Lett. 2010;1:167–276.

36. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. Clin Chem 2004;50:1511.

37. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. J Cell Physiol. 2006;207:12–22.

38. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, et al. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. Endocr Relat Cancer. 2006;13:629–640.

39. Wu X, Yan Q, Zhang Z, et al. Acrp30 inhibits leptin-induced metastasis by downregulating the JAK/STAT3 pathway via AMPK activation in aggressive SPEC-2 endometrial cancer cells. Oncol Rep. 2012;27:1488–1496.

40. Gao J, Tian J, Lv Y. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. Cancer Sci. 2009;100:389–395.

41. Zhou X, Li H, Chai Y, et al. Leptin inhibits the apoptosis of endometrial carcinoma cells through activation of the nuclear factor κB-inducing kinase/IκB kinase pathway. Int J Gynecol Cancer. 2015;25:770–778.

42. Méndez-López LF, Dávila-Rodríguez MI, Zavala-Pompa A, et al. Expression of leptin receptor in endometrial biopsies of endometrial and ovarian cancer patients. Biomed Rep. 2013;1:659–663.

43. Grady D., Ernster V. L. Endometrial Cancer Schottenfeld D. Fraumeni F. J. eds. . Cancer Epidemiology and Prevention, 1058-1089, Oxford University Press New York 1996.

44. Šimunić V, Barišić D, Pavičić Baldani D. Nenormalna krvarenja iz maternice. Zagreb, Fotosoft. 2014.

45. Bokhman JV. 'Two pathogenetic types of endometrial Carcinoma'. Gynecol Oncol. 1983;15:10–7.

46. Rose DP, i sur. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. Obes Rev. 2004; 5:153-156.

47. Allan LA, Morrice N, Brady S, i sur. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. Nat Cell Biol. 2003; 5:647-654.

48. Schulz W.A., 2005. Molecular Biology of Human Cancers. Springer Science + Business Media, Inc, pp. 357-382.

49. Yager J.D., Davidson N.E., Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. N Engl J Med. 2006; 354: 270-282.

50. Russo J., Tay L. K., Russo I. H. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis.Breast Cancer Res, Treat.1982; 2: 5-73.

51. Bolton J.L., Thatcher G.R.J., Potential Mechanisms of Estrogen Quinone Carcinogenesis. Chem Res Toxicol.2008; 21: 93-101.

52. Scott R. E., Maercklein P. B. An initiator of carcinogenesis selectively and stably inhibits stem cell differentiation: a concept that initiation of carcinogenesis involves multiple phases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 2995-2999.

53. Cohen DH, LeRoith D. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. Endocr Relat Cancer. 2012; 19:F27-45.

54. Talavera F., Reynolds R. K., Roberts J. A., Menon K. M. Insulin-like growth factor I receptors in normal and neoplastic human endometrium. Cancer Res.1990; 50: 3019-3024.

55. Werner H., Leroith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. Adv. Cancer Res. 1996;68: 183-223.

56. Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A, i sur. Insulin resistance and cancer risk: an overview od the patogenetic mechanisms. Exp Diabetes Res. 2012; 2012:789174-789192.

57. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signaling in neoplasia. Nat Rev Cancer. 2008; 8:915-928.

58. Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The link between the metabolic syndrome and cancer. Int J Biol Sci. 2011; 7(7):1003-1015.

59. Tian W, Teng F, Zhao J, Gao J, Gao C, Sun D, i sur. Estrogen and insulin synergistically promote type 1 endometrial cancer progression. Cancer Biol Ther. 2017 Dec 2;18(12):1000-1010.

60. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell. Physiol.2000;182:311-322.

61. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", Nature methods 9(7): 676-682.

62. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

63. Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 Dec;11(12):1531-1543.

64. Petridou E, Belechri M, Dessypris N, Koukoulomatis P, Diakomanolis E, Spanos E, Trichopoulos D. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. Annals of Nutrition and Metabolism. 2002;46:147–151.

65. Mueck AO, Seeger H. Hormone therapy after endometrial cancer. Endocrine-Related cancer. 2004;11:305–314.

66. Yuan SS, Tsai KB, Chung YF, Chan TF, Yeh YT, Tsai LY, Su JH. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer. Gynecologic Oncology. 2004;92:769–775.

67.Yabushita H, Iwasaki K, Obayashi Y, Wakatsuki A. Clinicopathological roles of adiponectin and leptin receptors in endometrial carcinoma. Oncol Lett. 2014 Apr;7(4):1109-1117.

68. Vigneri R, Goldfine ID, Frittitta L. Insulin, insulin receptors, and cancer. J Endocrinol Invest. 2016 Dec;39(12):1365-1376.

69. Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;943:296-315.

70. Kounelis S , Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. Mod Pathol. 2000 Apr;13(4):379-88.

71. Chambers J. T. Sex steroid receptors in endometrial cancer. Yale J Biol Med. 1988 Jul-Aug; 61(4): 339–350.

72. Horie K, Yamamoto H, Karube K, Takebayashi K, Yoshino H, Yoshioka H i sur. Cyclin A is a reliable proliferation marker in endometrial cancer cell lines. Oncol Lett. 2019 May;17(5):4455-4462.

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

- Ime i Prezime: Mia Ževrnja
- Datum i mjesto rođenja: 20. travanj 1995, Split
- Adresa stanovanja: Križine 16, 21 000 Split
- Kontakt: 091 / 5807 510
- E-mail: mia.zevrnja@hotmail.com

OBRAZOVANJE

- 2002. – 2010. Osnovna škola „Trstenik“, Split
- 2010. – 2014. Opća gimnazija „Marko Marulić“, Split
- 2014. – 2017. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu – preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike
- 2017. – 2019. Medicinski fakultet Osijek, diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

- Engleski jezik: aktivno
- Talijanski jezik: aktivno
- Francuski jezik: osnovno
- Korištenje računala: Microsoft office paket

SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA

PASIVNO

- 7. - 8. veljače 2019. - Osječki studentski kongres OSCON
  Međunarodni kongres translacijske medicine studenata i mladih liječnika
- 17. - 22. lipnja 2019. - 11. ISABS (International Society for Applied Biological Sciences) konferencija Split