

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Silvija Mašić

**Ekspresija plakofilina 3 u difuznom malignom
pleuralnom mezoteliomu**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Silvija Mašić

**Ekspresija plakofilina 3 u difuznom malignom
pleuralnom mezoteliomu**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Sven Seiwert

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Svenu Seiwertu na vodstvu i pomoći u izradi ovog rada te svima koji su pomogli u ostvarenju ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na njihovoj bezuvjetnoj podršci i potpori.

SADRŽAJ

POPIS SKRAĆENICA

POPIS TABLICA

POPIS SLIKA

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1 Dišni sustav.....	1
1.1.1 Gornji dišni put.....	1
1.1.2 Donji dišni put	2
1.2 Pleura (poplućnica)	4
1.3 Tumori pleure.....	5
1.4 Difuzni maligni pleuralni mezoteliom (DMPM).....	6
1.4.1 Patogeneza.....	7
1.4.2 Klinička slika	10
1.4.3 Prognostički faktori	11
1.4.4 Dijagnostika.....	16
1.4.5 Terapija.....	18
1.4.6 Patologija.....	24
1.5 Plakofilini	26
1.5.1 Plakofilin 1 (PKP 1).....	27
1.5.2 Plakofilin 2 (PKP 2).....	28
1.5.3 Plakofilin 4 (PKP 4, p0071).....	30
1.5.4 Plakofilin 3 (PKP 3).....	31
1.6 Međustanični spojevi	32
1.6.1 Dezmosomi.....	33
1.6.2 SVRHA RADA.....	36
2. HIPOTEZA.....	37
3. CILJEVI RADA	38
4. BOLESNICI I METODE.....	39
4.1 Uzorci.....	39

4.2 Metode.....	39
4.2.1 Imunohistokemija.....	39
4.2.2 Statistička analiza podataka	41
5. REZULTATI	42
5.1 BOLESNICI.....	42
5.3 IZRAŽENOST PLAKOFILINA 3 U DIFUZNOM MALIGNOM PLEURALNOM MEZOTELIOMU. 48	
5.3.1 Izraženost plakofilina 3 u glavnim tipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.....	48
5.4 ANALIZA PREŽIVLJENJA U GLAVNIM TIPOVIMA DIFUZNOG MALIGNOG PLEURALNOG MEZOTELIOMA I PODTIPOVIMA EPITELOIDNOG MEZOTELIOMA	53
5.5 IZLOŽENOST AZBESTU	59
5.6 KLINIČKI STADIJ.....	62
5.7 HISTOLOŠKI PROCIJENJENO ŠIRENJE U VEZIVO, ODNOSNO MAST I /ILI SKELETNI MIŠIĆ 64	
5.8 CITOPLAZMATSKO/ MEMBRANSKI (c/m) OMJER.....	71
5.9 KAPLAN- MEIER KRIVULJE PREŽIVLJENJA	74
6. RASPRAVA	77
7. ZAKLJUČCI.....	84
8. SAŽETAK	86
9. SUMMARY	87
10. POPIS LITERATURE.....	88
11. ŽIVOTOPIS.....	103

POPIS SKRAĆENICA

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

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)

MAP kinaza - mitogen- aktivirana protein kinaza (eng. mitogen- activated protein kinase)

ERK 1 i 2 – kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (eng. extracellular- signal- regulated- kinases 1 and 2)

Fos- Jun obitelj- onkogeni transkripcijski faktori (eng. fos/jun family of transcription factors)

EGF receptor- receptor epidermalnog faktora rasta (eng. epidermal growth factor receptor)

PDGF - faktor rasta trombocita (eng. platelet- derived growth factor)

EGF - epidermalni faktor rasta (eng. epidermal growth factor)

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

p14- tumor supresor protein (eng. p14 protein)

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

Bcl-xL- antiapoptotski protein (eng. B-cell lymphoma-extra large)

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

p16^{INK4a}- tumor supresor protein (eng. p16^{INK4a})

p14^{ARF}- tumor supresor protein (eng. p14^{ARF})

NF2 gen –neurofibromin 2 gen, tumor supresor gen (eng. neurofibromin 2 gene)

BAP 1 gen – BRCA 1- vezan protein gen, tumor supresor gen (eng. BRCA1-Associated Protein 1 gene)

TP53 – tumorski protein p53, tumor supresor gen (eng. tumor protein p53)

PTEN- homolog fosfataze i tenzina, tumor supresor gen (eng. phosphatase and tensin homolog)

PI3K/Akt/mTOR- unutarstanični signalni put bitan u regulaciji staničnih ciklusa (eng. PI3K/AKT/mTOR pathway)

Ras/MAPK- signalni put (eng. Ras/ Mitogen- activated protein kinase)

Hippo put- Hippo signalni put (eng. Hippo signaling pathway)

Wnt put- Wnt signalni put (eng. Wnt signaling pathway)

obitelj bcl proteina- obitelj antiapoptotskih proteina (eng. B- cell lymphoma proteins family)

mikroRNA – mikro ribonukleinska kiselina, kratke nekodirajuće RNA koje reguliraju ekspresiju gena inhibicijom translacije (eng. microRNA)

SV40- Simian virus 40 (eng. Simian virus)

IMIG- International Mesothelioma Interest Group

IASLC- International Association for the Study of Lung Cancer

TNM- T (tumor), N (limfni čvorovi), M (metastaze), (eng. tumor, lymph nodes, metastasis)

TIF- 2- transkripcijski medijator za ligand- ovisnu aktivaciju AF- 2 nuklearnih receptora (eng. transcriptional mediators/ intermediary factor 2)

HtrA1- serinska proteaza, enzim (eng. HtrA serine peptidase 1)

p27- tumor supresor protein (eng. p27)

CD 157- biljeg površine leukocita, enzim, član obitelji NAD-aza/ADP-ribozil ciklaza (eng. CD 157)

BST-1- antigen 1 stanice strome koštane srži, protein (eng. bone marrow stromal cell antigen 1)

MT1- MMP- membranski tip- 1 matriks metaloproteinaza, protein (eng. membrane type-1 matrix metalloproteinase)

MDM2- protoonkogen, protein (eng. mouse double minute 2 homolog)

PD- L1 (B7- H1)- protein (eng. programmed death-ligand 1)

DPPIV (DPPIV/sCD26)- enzim (eng. dipeptidyl peptidase IV)

ERCC1- protein (eng. ERCC Excision Repair 1)

CDKN2A- inhibitor 2A ciklin- ovisne kinaze, protein (eng. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

mikroRNA-17, mikroRNA-30c, mikroRNA-29c-mikro ribonukleinske kiseline, kratke nekodirajuće RNA (eng. micro RNA- 17, microRNA-30c, microRNA-29c)

MAPK- mitogen aktivirana protein kinaza,enzim (eng. mitogen-activated protein kinase)

NF- κ B- nuklearni faktor- pojačivač aktiviranih B stanica od kapa lakih lanaca, jezgrin transkripcijski faktor (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

MMP-2- matriks metaloproteinaza 2,protein (eng. matrix metalloproteinase-2)

MMP-9- matriks metalopeptidaza 9,protein (eng. matrix metalloproteinase- 9)

EGF- epidermalni faktor rasta, protein (eng. epidermal growth factor)

EGFR- receptor epidermalnog faktora rasta, transmembranski protein (eng. epidermal growth factor receptor)

VEGF- faktor rasta vaskularnog endotela, protein (eng. vascular endothelial growth factor)

VEGFR- receptor faktora rasta vaskularnog endotela, protein (eng. vascular endothelial growth factor receptor)

HGF- faktor rasta hepatocita, protein (eng. hepatocyte growth factor)

Bax protein- Bcl2- vezani x protein, regulator apoptoze (eng. Bcl2-associated X protein)

GLUT-1- transporter glukoze 1, protein (eng. glucose transporter 1)

CT- kompjuterizirana tomografija (eng. computerized tomography)

MR- magnetna rezonanca (eng. magnetic resonance)

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

WT-1- Wilmsov tumor 1, tumor supresor gen (eng. Wilms tumor 1)

MOC-31- glikoprotein (eng. epithelial specific Antigen/Ep- CAM)

BG8- marker karcinoma (eng. anti-Lewis-Y, Lewis Y antigen, BG-8)

CEA- karcinoembrijski antigen, marker karcinoma, glikoprotein (eng. carcinoembryonic antigen)

B72.3- monoklonalno protutijelo koje prepoznaje tumor- vezan glikoprotein 72 na površini tumorskih stanica (eng. B 72.3)

Ber-EP4- protutijelo koje prepoznaje određene glikoproteine stanične membrane (eng. epithelial cell adhesion molecule, BerEp4)

TTF-1- tiroidni transkripcijski faktor- 1, marker karcinoma (eng. thyroid transcription factor- 1)

Napsin A- marker karcinoma, proteinaza (eng. napsin A)

CK 5/6- citokeratin 5/6, protein (eng. cytokeratin 5/6)

D2-40- podoplanin, protein (eng. podoplanin)

HBME-1- mezotelni marker (eng. HBME-1)

p53- tumor supresor protein (eng. p53)

EMA- epitelno membranski antigen (eng. epithelial membrane antigen)

ENO2- protein kodirajući gen (eng. Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 2)

R0- resekcija- potpuna resekcija tumora uz negativne histološke rubove (eng. R0 resection)

EGFR TKI – inhibitor tirozin kinaze, monoklonalno protutijelo (eng. epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor)

PDGFR β / C- Kit inhibitor- inhibitor tirozin kinaze, monoklonalno protutijelo (eng. beta platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors)

CTLA4- proteinski receptor (eng. CD152, cluster of differentiation 152)

anti- VEGF protutijelo- anti- faktor rasta vaskularnog endotela, monoklonalno protutijelo (eng. anti- vascular endothelial growth factor)

MET inhibitori- MET inhibitori, inhibitori tirozin kinaze (eng. Met inhibitors)

T limfociti- stanice imunološkog sustava (eng. T lymphocytes)

Arm- repeat proteini- proteini koji sadrže nekoliko armadillo ponavljanja (eng. arm- repeat proteins)

β -katenin- beta- katenin protein, glavni segment kanonskog Wnt signalnog puta (eng. β -catenin)

p120 , p120ctn- p- 120 katenin, protein (eng. p- 120 catenin)

NPRAP- neurojungin, arm- repeat protein (eng. neurojungin)

ARVCF- armadillo repeat protein (eng. armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome)

p0071- plakofilin 4, protein (eng. plakophilin 4)

HR 2- homologna domena 2, dio proteina (eng. homology domain 2)

PKP 1- plakofilin 1, protein (eng. plakophilin 1)

kDa- kilodalton, jedinica molekularne težine (eng. kilodalton)

PKP 1a, 1b- izoforme plakofilina 1, proteini (eng. plakophilin 1a, 1b)

PKP 2- plakofilin 2, protein (eng. plakophilin 2)

RhoA- kinaza- enzim (eng. RhoA kinase)

ARVC- aritmogena kardiomiopatija desnog ventrikla (eng. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy)

PG- plakoglobin, protein (eng. plakoglobin)

DSP- dezmozoplakin, protein (eng. desmoplakin)

DSG2- dezmozoglein-2, protein (eng. desmoglein2)

DSC2- dezmozokolin-2, protein (eng. desmocollin2)

TMEM43- transmembranski protein 43 (eng. transmembrane protein 43)

PLN- fosfolamban, protein (eng. phospholamban)

DES- dezmin, protein (eng. desmin)

LMNA- lamin A/C protein (eng. lamin A/C)

TGFB3- transformirajući beta 3 faktor rasta, protein (eng. transforming growth factor beta-3)

TTN- titin, protein (eng. titin)

RNA- ribonukleinska kiselina (eng. ribonucleic acid)

PKP 4- plakofilin 4, protein (eng. plakophilin 4)

Rab11a- protein, GTP-aza (eng. Rab11a)

E- kadherin- transmembranski protein (eng. E- cadherin)

PABPC1- gen koji kodira za poly (A) vezni protein (eng. poly(A) binding protein, cytoplasmic 1)

FXR1- protein kodirajući gen (eng. fragile x mental retardation, autosomal homolog 1)

G3BP- proteaza (eng. GAP SH3 domain binding protein)

mRNA- glasnička RNA (eng. messenger ribonucleic acid)

K9- K28, K1- K8, K71- K74, K18, K5 , K14- proteini, tipovi keratina (eng. keratins)

Rap1 GTP- aza- hidrolitički enzim (eng. Rap1 GTP-ase)

PKC- protein kinaza C, enzim (eng. protein kinase C)

IgA, IgG, IgM, IgD i IgE- tipovi imunoglobulina (eng. Immunoglobulin A, Immunoglobulin G, Immunoglobulin M, Immunoglobulin D, Immunoglobulin E)

Fab fragment- regija protutijela uz koju se veže antigen (eng. fragment antigen- binding)

Fc segment- regija protutijela koja dolazi u kontakt s proteinima komplementa i receptorima stanične površine (eng. fragment crystallizable region)

c/m omjer- citoplazmatsko/ membranski omjer (eng. cytoplasmic/ membranous ratio)

h/l- high/ low, izraženiji intenzitet imunohistokemijskog bojenja citoplazme u odnosu na membranu

l/h- low/ high, izraženiji intenzitet imunohistokemijskog bojenja membrane u odnosu na citoplazmu

eq- equivocal, podjednako izražen intenzitet imunohistokemijskog bojenja citoplazme i membrane

eIF4F- eukariotski faktor inicijacije 4F, proteinski kompleks, translacijski faktor (eng. eukaryotic initiation factor 4F)

ETV1- protein, transkripcijski faktor (eng. ETS translocation variant 1)

ZEB1- protein, transkripcijski faktor (eng. zinc finger e-box binding homeobox 1)

DNM1-L- GTP- aza, enzim (eng. dynamin 1 like)

PRL3- fosfataza, enzim (eng. phosphatase of regenerating liver 3)

POPIS TABLICA

Tablica 1. Kliničke i patohistološke osobitosti uzoraka

Tablica 2. Usporedba intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni

Tablica 3. Usporedba intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni

Tablica 4. Usporedba duljine preživljenja u danima između spolova u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 5. Usporedba broja dana preživljenja s obzirom na klinički stadij bolesti u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 6. Odnos između izloženosti azbestu i duljini preživljenja u danima u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 7. Odnos intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog bojenja kod svih uzoraka i broja dana preživljenja

Tablica 8. Odnos intenziteta plakofilin 3 membranskog bojenja kod svih uzoraka i broja dana preživljenja

Tablica 9. Usporedba broja dana preživljenja između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni

Tablica 10. Odnos između izloženosti azbestu i dobi pacijenata u vrijeme postavljanja dijagnoze

Tablica 11. Odnos intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 12. Odnos intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 13. Usporedba intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog bojenja s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 14. Usporedba intenziteta plakofilin 3 membranskog bojenja s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 15. Svi uzorci difuznog malignog pleuralnog mezotelioma i podtipovi epiteloidnog mezotelioma i histološki procijenjeno širenje u vezivo te mast i/ili skeletni mišić

Tablica 16. Odnos histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić i dana preživljenja u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 17. Odnos između izloženosti azbestu i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima i podtipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma (solidni, tubulopapilarni, trabekularni)

Tablica 18. Odnos citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 19. Odnos membranske izraženosti plakofilina 3 i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 20. Povezanost intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u podtipovima epiteloidnog mezotelioma

Tablica 21. Povezanost između intenziteta plakofilin 3 membranskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u podtipovima epiteloidnog mezotelioma

Tablica 22. Odnos c/m omjera i dana preživljenja u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 23. Povezanost c/m omjera i duljine preživljenja kod podtipova epiteloidnog mezotelioma

Tablica 24. Odnos c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 25. Odnos c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u podtipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 26. Analiza Kaplan- Meier krivulja preživljenja za 4 podtipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

POPIS SLIKA

Slika 1. Epiteloidni tip DMPM-a (H&E, objektiv x 4)

Slika 2. Sarkomatoidni tip DMPM- a (H&E, objektiv x 4)

Slika 3. Bifazični tip DMPM- a (H&E, objektiv x 4)

Slika 4. Plakofilin 3 u citoplazmi epiteloidnog tipa, solidni podtip DMPM-a, intenzitet 4 (plakofilin 3, IH, objektiv x40)

Slika 5. Plakofilin 3 u citoplazmi sarkomatoidnog tipa DMPM-a, intenzitet bojenja 2 (plakofilin 3, IH, objektiv x40)

Slika 6. Plakofilin 3 imunopozitivnost u membranama tumorskih stanica, intenzitet 3 i žarišna citoplazmatska imunopozitivnost, intenzitet 1, u bifazičnom tipu DMPM-a (plakofilin 3, IH, objektiv x40)

Slika 7. Kaplan- Meier krivulja preživljenja za sve uzorke difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Slika 8. Kaplan- Meier krivulje preživljenja za 4 podtipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1 Dišni sustav

Respiratorni sustav se anatomske dijeli na strukture gornjeg (nos, nazofarinks, grkljan) i donjeg (dušnik, bronhi, pluća) respiratornog trakta, dok ga funkcionalno čine provodni dio sustava koji služi provođenju zraka do i iz pluća, a čine ga nosne šupljine, nazofarinks, grkljan, dušnik, bronhi, bronhioli i terminalni bronhioli kao i respiratorni dio u kojem se odvija izmjena plinova, a sastoji se od respiratornih bronhiola, alveolarnih duktusa i alveola (1,2). U mehanizmu ventilacije sudjeluju prsni koš, međurebreni mišići, ošit te kolagena i elastična vlakna u plućima kako bi se omogućilo strujanje zraka kroz provodni i respiracijski dio sustava. Provodni dio je bitan jer predstavlja put kojim zrak ulazi u pluća i prilagođuje udahnuti zrak uvjetima novog okoliša, odnosno pročišćuje ga, vlaži i zagrijava (3).

1.1.1 Gornji dišni put

Nos

Sastoji se od nosnica, nazalnih šupljina i vestibula (predvorje) odvojenih koštanom i hrskavičnom pregradom (1,2). Nosna sluznica sadrži olfaktorni i respiratorni dio koji je obložen pseudostratificiranim trepetljivim cilindričnim epitelom i vrčastim stanicama koje luče sluz (2). S lateralnog zida nosnih šupljina prema unutrašnjosti izbočuju se tri koštana izdanka, odnosno nosne školjke. Donja i srednja obložene su respiratornim epitelom dok gornju oblaže olfaktorni (njušni) epitel (3). Kroz male otvore paranazalni sinusi (bilateralne šupljine u frontalnoj, maksilarnim, etmoidnim i sfenoidnim kostima obložene respiratornim epitelom) komuniciraju s nosnim šupljinama (1).

Nazofarinks

Nazofarinks je prvi dio ždrijela, odnosno nosni dio ždrijela (1,3). Proteže se od nosne šupljine do uvule, a povezan je s orofarinksom (prostor od uvule do hioidne kosti) (2). Obložen je respiratornim epitelom, sadrži faringealne tonzile (nakupine limfoidnog tkiva) u svojoj stijenci, kao i bilateralne otvore Eustahijevih cijevi (1,2).

Grkljan

Grkljan je organ smješten između ždrijela i dušnika (1). Dijelimo ga na epiglotis, glotis i infraglotis (2) Građen je od hijaline hrskavice (tiroidna, krikoidna, donji dio aritenoidne hrskavice) i elastične hrskavice (epiglotis, kuneiformna, kornikulata, vrhovi aritenoidne hrskavice) (1,3). Hrskavice imaju potpornu ulogu, sprečavaju ulazak hrane i tekućine u dušnik, sudjeluju u stvaranju govora. Stijenka je obložena mnogoslojnim pločastim epitelom u području epiglotisa, ariepiglotičnih nabora i glasnica, dok je ostali dio obložen respiratornim epitelom (2). Ispod epiglotisa nalaze se dva para nabora sluznice koji strše u lumen grkljana. Gornji par su lažne, a donji par prave glasnice. U vokalnim naborima nalaze se usporedni snopovi elastičnih vlakana (vokalni ligament) dok usporedno sa svezama teku snopovi skeletnih vokalnih mišića koji omogućuju stvaranje zvukova različite frekvencije prilikom protiskivanja zraka između nabora (3).

1.1.2 Donji dišni put

Dušnik

Dušnik je organ dužine 12- 14 cm građen od prstenova hijaline hrskavice oblika slova C čiji su otvoreni dijelovi na stražnjoj površini premošteni snopom glatkog mišića i fibroelastičnim tkivom pričvršćenim na perihondrij. Proteže se od baze grkljana do mjesta račvanja na dva primarna bronha. Hrskavice služe održavanju lumena dušnika otvorenim, fibroelastično tkivo sprečava pretjerano širenje lumena, a mišić omogućava njegovo suženje (3). Dušnik je obložen respiratornim epitelom (1).

Bronhi, bronhioli, alveole

Na dušnik se nastavljaju 2 primarna bronha koji ulaze u pluća u području hilusa gdje ulaze arterije, a izlaze vene i limfne žile te se u lijevom pluću dijele na 2, a u desnom na 3 sekundarna (lobarna bronha) (1,3). Navedeni bronhi se zatim dijele na tercijarne (segmentalne bronhe), tercijarni se zatim granaju na sve manje bronhe čiji se terminalni ogranci nazivaju bronhioli. Svaki tercijarni bronh opskrbljuje dio pluća nazvan bronhopulmonalni segment (segment pluća sa svojom krvnom opskrbom i vezivnom kapsulom). Svaki bronhiol ulazi u plućni režnjić te se grana u terminalne bronhiole (1). Svakim grananjem promjer bronha se smanjuje, a prstenovi hijaline hrskavice se postupno zamjenjuju izoliranim područjima hijaline hrskavice (1). Epitel je cilindričan, pseudostratificiran i čine ga vrčaste, bazalne, neuroendokrine i cilindrične trepetljikave

stanice (2). Bronhioli su obloženi višerednim trepetljivim cilindričnim epitelom bez vrčastih stanica, dok je u manjim ograncima epitel jednoslojan cilindričan s trepetljivima, a u terminalnim bronhiolima kubičan te sadržava Clarine stanice koje luče glikozaminoglikane i štite epitel bronhiola. Bronhioli također ne sadrže hrskavicu ni submukozne žlijezde (2,3). Terminalni bronhioli se granaju na dva ili više respiratorna bronhiola te je njihova sluznica strukturno identična sluznici terminalnih bronhiola samo što su njihove stijenke isprekidane otvorima prema alveolama gdje se odvija izmjena plinova (1,3). Prema kraju respiratornih bronhiola broj alveola koje se u njih otvaraju se povećava pa razmaci između njih nestaju te se takva cijev naziva alveolarni hodnik. Alveolarni hodnici otvaraju se u atrijske, a atrijske u alveolarne vrećice. Alveolarni hodnici i alveole su obloženi stanjenim pločastim alveolarnim stanicama, a brojna elastična i kolagena vlakna daju potporu hodnicima i njihovim alveolama. Alveole su vrećaste izbočine respiracijskih bronhiola koje plućima daju spužvastu strukturu, a odgovorne su za izmjenu plinova između krvi i udahnuta zraka (1,2,3). Stijenka alveola građena je tako da olakša difuziju između vanjske i unutrašnje sredine. Svaka stijenka odjeljuje 2 susjedne alveole pa se naziva interalveolarna pregrada, a građena je od dva tanka sloja pločastog epitela između kojih se nalaze kapilare, fibroblasti, makrofagi, elastična i kolagena vlakna (3). Stanice u građi interalveolarne pregrade su: endotelne stanice kapilara, pneumociti tipa I (prekrivaju respiratornu površinu alveola, a glavna uloga im je stvaranje najtanje moguće barijere koja dopušta laku izmjenu plinova), pneumociti tipa II (luče surfaktant koji smanjuje površinsku napetost alveola i vezivne sastojke bazalne membrane), intersticijske stanice uključujući fibroblaste i mastocite te alveolarni makrofagi (3).

Pluća

Sastoje se od 2 krila, desno krilo ima 3 režnja: gornji, srednji, donji, a lijevo gornji i donji te lingulu (2).

Respiracija

U proces respiracije uključeno je više sustava: živčani (centralni, periferni i vegetativni dio), muskuloskeletni (rebra, ošit, međurebreni mišići), dišni (gornji i donji dio dišnog sustava), kardiovaskularni i hematopoetski (crvene krvne stanice). Prsni koš ima aktivnu ulogu u procesu ventilacije, dok pluća pasivno povećavaju svoj volumen prateći antero-posteriorno i kranio-kaudalno širenje prsnog koša (4). Tijekom udisaja dolazi do širenja pluća s obzirom da dolazi do kontrakcije međurebrenih mišića i podizanja rebra te kontrakcije ošita pa se spušta dno prsne šupljine i povećava njezin obujam,

bronhi i bronhioli se proširuju i izduljuju, alveolarni hodnici i alveole se prošire, dok kod izdisaja dolazi do pasivnog opuštanja pluća zbog opuštanja elastičnih vlakana plućnog parenhima. U alveolama dolazi do prolaska kisika iz zraka u alveolama u krv kapilara, a CO₂ difundira u suprotnom smjeru (3).

1.2 Pleura (poplućnica)

Pleura je serozna membrana koja obavija pluća i unutarnji zid prsne šupljine (1). Dio koji oblaže tkivo pluća naziva se visceralna, a dio koji obavija unutrašnju površinu prsnog koša, medijastinuma i ošita parijetalna pleura (1,2,5). Parijetalna pleura može se podijeliti na kostalnu, dijafragmalnu, medijastinalnu i cervikalnu pleuru (6). Međusobno se visceralna i parijetalna pleura spajaju u području hilusa (1,2). Histološki su građene od sloja stanica jednoslojnog pločastog epitela (mezotel) s bazalnom membranom i tankim slojem veziva koji priliježe na sloj građen od mreže elastičnih i kolagenih vlakana. Ispod ovog sloja u parijetalnoj pleuri nalazi se endotorakalna fascija (sloj rahlog veziva koji sadrži živce, krvne i limfne žile), dok visceralna pleura ne sadrži ovu fasciju već se njezina elastična vlakna nadovezuju na vlakna plućnog intersticija gdje su smještene krvne i limfne žile. Parijetalnu pleuru opskrbljuje torakalna aorta (interkostalne, perikardiofrenične, frenične, muskulofrenične arterije), dok se venska krv drenira putem vene azygos, hemiazygos i mamarnih vena. Limfa se drenira kroz limfne otvore između mezotelnih stanica i limfne kapilare u području kostalne, medijastinalne i dijafragmalne pleure. Visceralnu pleuru opskrbljuju plućna arterija i grane bronhijalnih arterija. Venska krv se drenira plućnim venama. S obzirom da visceralna pleura nema limfnih otvora, limfu koju visceralna pleura resorbira dreniraju subpleuralne limfne kapilare (4).

Prostor između parijetalne i visceralne pleure naziva se pleuralna šupljina. Širine je oko 10- 20 μm (5), a ispunjena je s oko 15 ml serozne, svijetle, relativno acelularne tekućine s niskom koncentracijom bjelančevina (2). Tekućina se filtrira na parijetalnoj pleuri, a reapsorbira na visceralnoj pleuri. Stupanj filtracije i reapsorpcije ovise o hidrostatskom i koloidno- osmotskom tlaku u kapilarama parijetalne i visceralne pleure i intrapleuralnom tlaku. Voda i manje čestice odstranjuju se na ovaj način, dok se veće čestice kao što su proteini iz pleuralnog prostora odstranjuju putem limfnih otvora na parijetalnoj pleuri. Kada zbog patoloških procesa dolazi do zatajenja ovih mehanizama dolazi do patološkog nakupljanja pleuralne tekućine unutar pleuralnog prostora (4). U fiziološkim uvjetima negativni tlak unutar pleuralne šupljine omogućuje ekspanziju

pluća, a tekućina vlaži površinu pleure i omogućuje pomicanje pluća tijekom respiracije (2).

Prostor je okružen mezotelnim stanicama koje proizvode tanak film serozne tekućine koja predstavlja lubrikant i olakšava pokrete slojeva pleure jednog preko drugog tijekom respiracije (1). Stanice mezotela porijeklom su iz mezoderma i imaju ulogu u kontroli ozljede i popravka u pleuri i drugim seroznim tkivima. Karakteriziraju ih brojne specijalizirane funkcije kao što su: otpuštanje proupalnih, protuupalnih i drugih imunomodulatornih medijatora, sekrecija faktora koji potiču odlaganje i odstranjivanje fibrina, sinteza faktora rasta i proteina izvanstaničnog matriksa koji sudjeluju u popravku seroznih tkiva (5).

1.3 Tumori pleure

Tumori pleure nisu neuobičajene tvorevine, ovu seroznu ovojnicu mogu zahvatiti benigni i maligni tumori, kao i stanja nalik tumoru. Češće se nalaze maligni od benignih tumora (6).

Razlikujemo nekoliko histoloških tipova pleuralnih neoplazmi: mezotelne, mezenhimalne i limfoproliferativne tumore (7). Neoplazme pleure također možemo podijeliti na primarne i sekundarne (2).

Najčešće se nalaze sekundarne promjene koje potječu od adenokarcinoma pluća (oko 40%), dojke (oko 20%), jajnika i limfoma (oko 10%) kao i tumora gastrointestinalnog trakta te invazivnog timoma (2,6,7,8). Od malignih primarnih pleuralnih neoplazmi najčešće je prisutan maligni pleuralni mezoteliom (90% slučajeva), a opisani su i primarni pleuralni sarkomi i limfomi. Primarni sarkomi su rijetki, a uključuju: sinovijalni sarkom, liposarkom, maligni fibrozni histiocitom, primarni neuroektodermalni tumor/ Ewingov sarkom, angiosarkom, hondrosarkom, osteosarkom i leiomiosarkom (8).

Od primarnih benignih neoplazmi pleure nalaze se pleuralni lipom, solitarni fibrozni tumor (u većini slučajeva benignan, u 20% malignan), kalcificirajući fibrozni pseudotumor, dok su stanja nalik tumoru: pleuralni pseudotumor, zadebljanje pleure, pleuralni plak, hemangioendoteliom (6).

U dijagnostici tumora pleure koriste se slikovne metode, no za postavljanje konačne dijagnoze biopsija je i dalje zlatni standard (6).

1.4 Difuzni maligni pleuralni mezoteliom (DMPM)

Maligni mezoteliom je zloćudan agresivan tumor porijeklom iz mezotelnih stanica (9). Prvi ga je opisao Miller 1908. godine (10). Ova maligna novotvorina primarno nastaje u području seroznih ovojnica, najčešće pleure (80% slučajeva) (9), rjeđe u području peritoneuma, a može se javiti i u području perikarda i tunice vaginalis (11). Smatra se da su oko 3/4 pleuralnih mezotelioma difuznog oblika, dok je 1/4 lokalizirana (9). Češće se javlja u muškaraca nego u žena (3:1), a prosječnom dobi pojavljivanja smatra se dob od oko 60 godina (9). Povećana učestalost ovog tumora prisutna je kod osoba izloženih azbestu, obično nakon dugog razdoblja latencije od 25- 45 godina (2). Minimalni interval latencije između prvog izlaganja azbestu i otkrića malignog mezotelioma iznosi oko 10 godina (12). Smatra se da će se incidencija DMPM-a u zemljama Zapada povećati u sljedećih 10- 15 godina (13). Posljednjih desetljeća primijećen je porast incidencije ovog tumora sa primjerice 0.6/100000 (1975.) na 1.0/100000 (2002.) (14). DMPM je i dalje bolest visoke smrtnosti (15), odnosno preživljenje pacijenata oboljelih od mezotelioma je loše, oko 50% oboljelih preživi 2 godine, a samo 20% 5 godina (11). Cjelokupno preživljenje od postavljanja dijagnoze je oko 12 mjeseci, od 8 mjeseci za pacijente u IV. stadiju do 40 mjeseci za pacijente u I. stadiju bolesti (13). Prosječno preživljenje iznosi oko 9 mjeseci za pacijente tretirane suportivno, oko 12.1 mjeseci za pacijente tretirane kemoterapeutičima te 11.7- 13 mjeseci za pacijente tretirane maksimalnom citoreduktivnom operacijom, kemoterapijom i/ ili zračenjem (16).

Osim DMPM- a, kao poseban rijedak entitet razlikujemo i lokalizirani maligni mezoteliom kojeg karakterizira češća pojava u muškaraca, epiteloidni histološki tip kao najčešće prisutan, dok su sarkomatoidni i bifazični rjeđe prisutni te bolja prognoza u odnosu na DMPM (17). Kod ovog tipa mezotelioma patogeneza nije vezana uz izloženost azbestu te je porijeklom iz mezenhimalnih stanica umjesto iz stanica mezotela (10). Prosječno preživljenje pacijenata s lokaliziranim malignim mezoteliom iznosi 29 mjeseci, dok u slučaju metastatskog lokaliziranog mezotelioma preživljenje iznosi između 6 mjeseci do 3 godine (17).

1.4.1 Patogeneza

Glavni karcinogen vezan uz pojavu malignog mezotelioma je azbest (18), odnosno profesionalna izloženost azbestu je važan faktor rizika vezan uz nastanak DMPM-a s obzirom da je azbest prisutan u građevini i brodogradnji. Neprofesionalno izlaganje azbestu (primjerice, područja s tlom bogatim azbestom) također pridonosi povećanom riziku nastanka DMPM- a (15). Povezanost između malignog pleuralnog mezotelioma i azbesta opisao je Wagner 1960. godine (10). Azbestna vlakna utječu na pleuru i nastanak mezotelioma putem iritacije pleure, zatim putem oštećenja mitotičkog vretena što dovodi do poremećaja mitoze i rezultira oštećenjem kromosoma (kromosomalne aberacije, poremećaji segregacije kromosoma), induciraju nastanak slobodnih kisikovih radikala što vodi do oštećenja DNA (lomovi lanca DNA), induciraju fosforilaciju MAP (mitogen- activated protein) kinaza i ERK 1 i 2 (extracellular signal- regulated kinases) te tako dovode do ekspresije protoonkogeni koji kodiraju članove Fos- Jun i aktivator protein 1 obitelji (18,19). Azbest također stimulira sekreciju TNF α i aktivira NF κ B kaskade kako bi se potaknula proliferacija i diferencijacija te spriječila apoptoza stanica malignog pleuralnog mezotelioma (18,19).

Azbest se povezuje s nastankom DMPM-a, ali i uz nastanak ne- neoplastičnih bolesti pleure (benigni azbest- vezani pleuralni izljev, pleuralni plakovi, difuzno zadebljanje pleure, "rounded" atelektaze). U pacijenata s malignim pleuralnim mezoteliomom u području pleure nalazimo duga i tanka vlakna azbesta i to vlakna amfibola od kojih se krocidolit smatra najkarcinogenijim tipom azbesta (20). Smatra se da su najsnažniji karcinogeni vlakna azbesta najmanjeg promjera (10). Početno mjesto razvoja malignog pleuralnog mezotelioma uzrokovanog azbestom je parijetalna pleura. Dosad nije razjašnjeno zašto je početno mjesto parijetalna, a ne visceralna pleura (20). Smatra se da vlakna do pluća i pleure mogu doći paracelularno, direktno kroz oštećene alveolarne epitelne stanice, limfom, krvlju a mogu biti prenesena sama ili unutar makrofaga. Studije na kulturi stanica pokazuju da vlakna azbesta aktiviraju EGF receptor i unutarstanične signalne puteve te tako dolazi do stanične proliferacije, također fizički utječu na mitotički aparat, mogu se sekundarno promijeniti u plućima ili pleuri što utječe na njihovu toksičnost. U nastanku azbest- inducirano mezotelioma dolazi do niza promjena koje započinju ulaskom vlakana azbesta u pleuralni prostor gdje dolaze u interakciju s mezotelnim stanicama i makrofazima što vodi do aktivacije upalnih i mezotelnih stanica, lučenja slobodnih kisikovih i dušikovih radikala, citokina, kemokina, faktora rasta. Vlakna mogu izravno utjecati na mezotelne stanice indukcijom oštećenja

DNA, ometanjem segregacije kromosoma ili indukcijom nekroze ili apoptoze (5), kao i apsorpcijom proteina i spojeva na svoju površinu što rezultira nakupljanjem karcinogena, ali i nedostatkom važnih staničnih proteina (20). Ovakva ponavljana stimulacija i ozljeda mezotela vodi do razvoja raka. Ključni koraci u razvoju ovog raka uključuju genetske i epigenetske promjene koje vode do ponavljane stanične proliferacije, otpornosti na apoptozu i inaktivaciju tumor supresorskih gena (5).

Stanice mezotelioma pokazuju pojačan ili dereguliran rast. Na njihov rast i razvoj utječu faktori rasta kojima su izložene kao što su PDGF (faktor rasta trombocita), EGF (epidermalni faktor rasta), gubitak tumor- supresorskih gena (p16, p14,NF2), aktivacija antiapoptotskih molekula (Bcl-x_l), ekspresija telomeraze (sprečava se skraćivanje telomera i nastavlja dijeljenje stanica), pojačana angiogeneza, međudnos tumora i okoliša (kronična upala, ekspresija matriks metaloproteinaza te stvaranje kolagena od strane stanica mezotelioma (18).

U razvoju malignog mezotelioma sudjeluju različiti geni kao što su CDKN2A/ARF tumor supresor gen koji kodira za p16^{INK4a} i p14^{ARF} čiji gubitak vodi do poremećaja kontrole staničnog ciklusa te predstavlja najčešće prisutnu inaktivaciju u malignoj transformaciji malignog mezotelioma (20,21), NF2 gen (tumor supresor gen koji kodira protein merlin uključen u Hippo signalni put), BAP 1 gen (tumor supresor koji kodira protein BAP1 važan u ubikvitin- proteasomskom putu u deubikvitinaciji histona, regulaciji progresije staničnog ciklusa, modulaciji kromatina, transkripciji gena i popravku DNA), TP53 (kodira za protein p53 koji je važan u kontroli funkcija stanice), PTEN (gubitak vodi do nekontroliranog staničnog rasta, a ima i nuklearne funkcije važne za kontrolu staničnog ciklusa i genomsku stabilnost) (21,22).

U malignoj transformaciji malignog mezotelioma uključeni su i biokemijski putevi: PI3K/Akt/mTOR (važan je proliferaciji, preživljenju, metabolizmu i rastu stanica, a u malignom mezoteliomu mu je aktivnost pojačana), Ras/MAPK (kontrolira rast, proliferaciju, starenje i apoptozu stanice), Hippo put (kontrolira rast, proliferaciju i smrt stanica), Wnt put (kontrolira proliferaciju stanica, kao i njihovu smrt tijekom embrionalnog razvoja i procesa progresije tumora, njihovu diferencijaciju, morfogenezu aktivacijom ili potiskivanjem ekspresije ciljanih gena) (16,21). Wnt geni uključuju veliku obitelj gena koji kodiraju za signalne molekule uključene u onkogenezu i razvojne procese (16).

Osim navedenih čimbenika u razvoju malignog mezotelioma sudjeluju i obitelj bcl proteina (kontrola apoptoze) (21), aktivacija receptor tirozin kinaza (važne u regulaciji proliferacije i /ili preživljenja stanica) (20), kao i epigenetski mehanizmi, odnosno metilacija DNA te ekspresija mikroRNA (kratke nekodirajuće RNA koje reguliraju ekspresiju gena inhibicijom translacije) (20,21).

Također, rjeđe se kao potencijalni uzroci malignog mezotelioma navode Simian virus 40 (SV40) (10), zračenje (18), izlaganje erionitu (21), u novije vrijeme i ugljikove nanocjevčice koje mogu pokazati patogenost nalik vlaknima azbesta (23), izlaganje radioaktivnom kontrastnom agensu torotrastu, kao i izloženost nuklearnom zračenju (24), izlaganje metalima koji izazivaju kroničnu seroznu upalu (25), a kao faktor rizika navodi se i genetska predispozicija (20), no može se javiti i u osoba mlađe dobi bez rizičnih faktora (25). Od rizičnih faktora u razvoju mezotelioma, osim genetske komponente važnima se smatraju i obiteljska i osobna anamneza sklonosti razvoju karcinoma, dob prilikom prvog izlaganja azbestu te vrijeme latencije (26).

Prema dosadašnjim spoznajama, prisutne su genetske i imunološke razlike između različitih tipova DMPM- a, primjerice inaktivacija BAP-1 češća je kod epiteloidnog tipa, dok je primjerice ekspresija PD- L1 izraženija u sarkomatoidnom tipu, a slabo prisutna kod epiteloidnog (27). Nadalje, kod sarkomatoidnog/ bifazičnog tipa prisutan je veći stupanj nekroze i viši indeks proliferacije stanica, dok je kod epiteloidnog tipa, inače karakteriziranog boljom prognozom, prisutan viši stupanj upale (28).

1.4.2 Klinička slika

Najuobičajeniji simptom prisutstva DMPM-a je dispneja, ali javljaju se i kašalj, nepleuritička bol u prsima, pleuralni izljev, gubitak težine, umor, pojava pneumotoraksa, paraliza frenikusa, kratkoća daha (9,18,29), kao i srčane aritmije, promuklost, disfagija, Hornerov sindrom, sindrom gornje šuplje vene kao posljedice zahvaćanja torakalnih struktura tumorskim procesom (9). Rijetko je asimptomatski. U kliničkom statusu pacijenta može se naći muklina prilikom perkusije prsnog koša, tiši šum disanja, ponekad i "clubbing" prstiju (9), a često je pojava pleuralne ekstraplacije najčešća manifestacija bolesti (30). Kod pacijenata koji se prezentiraju simptomima od strane pluća (dispneja, kašalj), unilateralnim pleuralnim izljevom te poviješću izloženosti azbestu trebalo bi u diferencijalnoj dijagnozi uzeti u obzir prisutnost malignog mezotelioma (15). Maligni pleuralni mezoteliom sklon je širenju po površini pleure na kontralateralnu pleuru, perikard, medijastinum, odnosno lokalnom invadiranju torakalnih struktura, no može zahvatiti i područja izvan toraksa te zahvatiti abdominalne limfne čvorove i organe (9). Metastaze malignog mezotelioma mogu se naći u kostima, mozgu, jetri te rijetko u području glave i vrata (najčešće jezik pa mandibula, sluznica usne šupljine, usne, konjunktiva, štitnjača) (31), kao i u dojci (24). Smatra se da je učestalost metastaza veća u slučaju prisutnosti sarkomatoidnog mezotelioma nego kod bifazičnog i epiteloidnog tipa (32). Također se mogu javiti i paraneoplastičke manifestacije kao što su trombocitoza, hemolitička anemija, diseminirana intravaskularna koagulopatija, hiperkalcemija, migratorni tromboflebitis (9). Većina pacijenata umre zbog respiratorne insuficijencije i komplikacija lokalnog širenja tumora (9).

1.4.3 Prognostički faktori

Faktore koji utječu na prognozu kod pacijenata s malignim pleuralnim mezoteliomom možemo podijeliti na kliničke, genetske i molekularne (33).

U kliničke prognostičke faktore u pacijenata s malignim mezoteliomom ubrajamo dob (mlađa dob nastanka, lošija prognoza), spol (muški spol, lošija prognoza), histološki tip tumora (ne-epitelni tip tumora, lošija prognoza), stadij tumora koji se najčešće izražava TNM klasifikacijom (33,34,35). Također, smatra se da peritonealni i perikardijalni oblici malignog mezotelioma imaju lošiju prognozu u odnosu na maligni mezoteliom pleuralne lokalizacije (36). Iako se smatra da epiteloidni oblici DMPM-a imaju bolju prognozu u odnosu na sarkomatoidni i bifazični oblik, postoje prijedlozi da se pleomorfni podtip epiteloidnog tipa reklasificira u sarkomatoidni ili bifazični tip zbog sličnog preživljenja (37).

Klinički prognostički nepovoljni čimbenici u pacijenata s DMPM-om također uključuju: loše opće stanje, zahvaćenost limfnih čvorova, povišena razina laktat-dehidrogenaze, leukocitoza, snižena razina hemoglobina, trombocitoza, dok se povoljnima smatraju: nizak broj neutrofila, trombocita, limfocitoza, nizak omjer neutrofil/leukociti te nizak omjer trombociti/limfociti (38). "Performance status" pacijenta je klinički vrlo važan faktor, a najčešće se izražava Karnofsky ljestvicom, odnosno procjenjuju se ograničenja pacijentovih aktivnosti s obzirom na simptome i autonomija bolesnika (29).

Kod liječenih pacijenata primijećeno je bolje preživljenje kod onih podvrgnutim multimodalitetnoj terapiji (39), kao i da hiponatremija negativno korelira s preživljenjem pacijenata na kemoterapiji (40). Kod bolje eradikacije makroskopske i mikroskopske bolesti pokazano je dulje preživljenje pacijenata (33,41). Neki od prediktora dužeg preživljenja pacijenata s kirurški tretiranim mezoteliomom su: niži stadij tumora (I- II), epiteloidni tip, ženski spol, tumor lijeve strane, nepušači, neizloženost azbestu (42). Kod pacijenata podvrgnutim ekstrapleuralnoj pneumonektomiji/ dekortikaciji važan prognostički čimbenik je i volumen tumora (veći volumen, kraće preživljenje) (43).

U potrazi za potencijalnom terapijskom molekulom istraživane su prognostičke vrijednosti mnogih različitih faktora kao što su placentarni faktor rasta (jača ekspresija, lošije preživljenje) (44), ciklooksigenaza-2 (pojačana ekspresija, lošije preživljenje) (45), akvaporin 1 (ekspresija u 50% i više tumorskih stanica, duže preživljenje) (46) te je primijećeno da blokada akvaporina 1 inhibira pokretljivost, proliferaciju kao i metastatski potencijal malignih stanica mezotelioma in vitro (12), zatim TIF-2 (visoka

razina ekspresije, bolje preživljenje) (47), serin proteaza HtrA1 (jača ekspresija, bolje preživljenje) (48), p27 (slabija ekspresija, lošija prognoza) (49), mezotelin (povišena razina u serumu, lošije preživljenje) (50), syndecan-1 (povišena razina u pleuralnom izljevu, lošija prognoza) (51), fibulin- 3 (povišena koncentracija u izljevu, lošije preživljenje) (52), ali i njihov utjecaj na ponašanje tumora npr. kod CD 157, odnosno BST-1 (ekspresija je vezana uz veću agresivnost tumora u bifazičnom tipu, kraće preživljenje, pojačanu invaziju, rezistenciju na kemoterapiju) (53), MT1- MMP (jača ekspresija, jače širenje tumora u okolni matriks) (54), MDM2 (prisutnost u bifazičnom i epiteloidnom tipu, lošije preživljenje u odnosu na MDM2 negativne tumore) (55), gradus jezgre (jača atipija jezgre, više atipičnih mitozu, izraženiji nukleoli, lošije preživljenje) (56), PD- L1 (izraženiji je u ne- epiteloidnom tipu DMPM-a, PD- L1 pozitivni pacijenti pokazuju lošiju prognozu) (57), razina aktivnosti enzima DPPIV u serumu pacijenata s malignim pleuralnim mezoteliomom (jača enzimska aktivnost, duže preživljenje) (58), u pacijenata s nižom specifičnom aktivnošću DPPIV/sCD26 (<21.0 nmol/min/mg sCD26) u pleuralnoj tekućini, primijećeno je duže preživljenje (58), izraženost B7-H1 povezano je s lošijom prognozom (59), pacijenti na terapiji cisplatinom bez ekspresije ERCC1 pokazivali su bolje preživljenje (60). Usprkos svim nastojanjima još uvijek nije nađen specifičan prognostički i terapijski marker za DMPM.

Od genetskih faktora koji utječu na prognozu mogu se izdvojiti: kromosomske alteracije (prisutnost homozigotne CDKN2A alteracije, lošije preživljenje), veća frekvencija DNA metilacije povezuje se s lošijim preživljenjem, prisutnost mutacija p14^{ARF} i p16^{INK4a} označava lošu prognozu, mutacije NF2 vezane su uz lošu prognozu (33). Također, promjene vezane uz izraženost mikroRNA u malignom pleuralnom mezoteliomu istraživane su u potrazi za novim dijagnostičkim i prognostičkim markerima, kao i novim terapijskim metama s obzirom da je poznato da pleuralni mezoteliom karakterizira deregulacija ekspresije mikroRNA (61). Primjerice, smanjena izraženost mikroRNA-17 i mikroRNA-30c u sarkomatoidnom i pojačana izraženost mikroRNA-29c u epiteloidnom mezoteliomu označava bolje preživljenje (33). Prema studiji Lamberti M. i dr. pojačana ekspresija miRNA25, 29 i 433 dobivene iz seruma pacijenata s malignim mezoteliomom povezana je s lošijom prognozom kod pacijenata, odnosno s kraćim preživljenjem te sarkomatoidnim ili bifazičnim tipom mezotelioma (62).

Od važnih molekularnih faktora možemo izdvojiti: pojačanu aktivaciju MAPK (mitogen-activated protein kinase), NF-κB (nuclear transcription factor, light chain) koja označava lošije preživljenje, visoka ekspresija matriks metaloproteinaza (MMP-2,

MMP-9) koja je vezana uz lošije preživljenje, povišena razina faktora rasta (EGF, EGFR, VEGF, VEGFR, HGF) označava lošije preživljenje, pojačana ekspresija Wnt signalnog puta označava lošije preživljenje, promjene u funkciji Hippo puta, kao i promjene u regulaciji staničnog ciklusa također utječu na prognozu. Pojačana aktivnost telomeraze u malignom pleuralnom mezoteliomu dovodi do relapsa tumora i kraće vrijeme odsutnosti bolesti. Također i promjene vezane uz apoptozu utječu na prognozu (smanjena razina proapoptotičkog Bax proteina, kao i pojačana ekspresija GLUT-1 apoptotičkog proteina označavaju lošije preživljenje oboljelih) (32). Niža ekspresija Wnt7A u pacijenata s epiteloidnim mezoteliomom označava lošiju prognozu, nadalje, u pacijenata koji nisu primili neoadjuvantnu kemoterapiju, prognoza je bila bolja u onih s višom Wnt7A ekspresijom, dok je kod pacijenata s nižom ekspresijom Wnt7A bolja prognoza bila u onih koji su primili neoadjuvantnu kemoterapiju u odnosu na one koji nisu (16).

Također je pokušana molekularna klasifikacija podtipova malignog pleuralnog mezotelioma, primjerice na bazi ekspresije RNA, kako bi se poboljšala prognostička točnost i uspostavio bolji odabir liječenja pacijenata, no to još nije zaživjelo u kliničkoj praksi (63).

Osim ovih faktora, također se važnim prognostičkim faktorima smatraju i imunološke stanice u tumorskom mikrookolišu, primjerice veća gustoća makrofaga koji infiltriraju tumor povezana je s lošijim preživljenjem kod pacijenata s ne-epiteloidnim tipom mezotelioma nakon operativnog zahvata, CD163/CD68 omjer je potencijalni prognostički marker u pacijenata s epiteloidnim mezoteliomom (viši omjer, kraće preživljenje) (64).

1.4.3.1 TNM klasifikacija

Uz histološki tip mezotelioma, najvažniji prognostički čimbenik je stadij, odnosno proširenost tumora (63). TNM klasifikacija je sistem kojim se određuje proširenost bolesti, a opisuje anatomske proširenosti neoplazme, predstavlja važan prognostički faktor te je u slučaju malignog pleuralnog mezotelioma donesena od strane International Mesothelioma Interest Group (IMIG) i International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), a bazira se na kirurškim i patološkim varijablama te upotrebi slikovnih metoda (63). U ovom sistemu T (tumor) označava tumor, N (nodes) zahvaćenost limfnih čvorova, dok M (metastases) označava udaljene metastaze. Trenutno se primjenjuje osmo izdanje TNM klasifikacije malignog pleuralnog mezotelioma (63) koje sadrži ove komponente:

Tumor

T1 tumor koji zahvaća ipsilateralnu parijetalnu ili samo visceralnu pleuru

T2 tumor koji zahvaća ipsilateralnu pleuru (parijetalna ili visceralna pleura) s invazijom koja obuhvaća najmanje jedno od navedenog:

- ošit
- plućni parenhim

T3 tumor koji zahvaća ipsilateralnu pleuru (parijetalna ili visceralna) s invazijom koja obuhvaća najmanje jedno od navedenog:

- endotorakalnu fasciju
- masno tkivo medijastinuma
- stijenku prsnog koša, sa ili bez destrukcije rebara (solitarno, resektabilno)
- perikard (ne- transmuralna invazija)

T4 tumor koji zahvaća ipsilateralnu pleuru (parijetalna ili visceralna) s invazijom koja obuhvaća najmanje jedno od navedenog:

- stijenku prsnog koša, sa ili bez destrukcije rebara (difuzno ili multifokalno, neresektabilno)
- peritoneum (direktno transdijafragmalno širenje)
- kontralateralna pleura

- medijastinalni organi (jednjak, traheja, srce, velike krvne žile)
- kralježci, spinalni kanal, kralježnična moždina ili brahijalni pleksus)
- perikard (transmuralna invazija s ili bez perikardijalnog izljeva)

Limfni čvorovi

Nx regionalni limfni čvorovi ne mogu biti procijenjeni

N0 bez metastaza u regionalne limfne čvorove

N1 metastaze u ipsilateralne intratorakalne limfne čvorove (uključujući ipsilateralne bronhopulmonalne, hilarne, subkarinalne, paratrahealne, aortopulmonalne, paraezofagealne, peridijafragmatske, perikardijalne, interkostalne i unutarnje mamarne limfne čvorove

N2 metastaze u kontralateralne intratorakalne limfne čvorove, metastaze u kontralateralne supraklavikularne limfne čvorove

Metastaze

M0 bez prisutnosti udaljenih metastaza

M1 prisutne udaljene metastaze

Stadij IA - T1,N0,M0

Stadij IB - T2 ili T3,N0,M0

Stadij II - T1iliT2,N1,M0

Stadij IIIA - T3,N1,M0

Stadij IIIB - T1-T3,N2,M0

- T4, N0-N2, M0

Stadij IV - bilo koji T4, bilo koji N, M1

1.4.4 Dijagnostika

Postavljanje dijagnoze malignog pleuralnog mezotelioma najčešće predstavlja dugotrajan proces s obzirom da su kliničke manifestacije bolesti najčešće nespecifične. Ukoliko se postavi sumnja na maligni mezoteliom potrebno je pacijenta uputiti u iskusni centar plućne medicine. Nakon anamneze i kliničkog pregleda, pristupa se primjeni neinvazivnih metoda kako bi se poduprla dijagnoza i procijenila proširenost bolesti, no konačna dijagnoza postavlja se biopsijom (29).

Od neinvazivnih metoda koriste se: radiološka snimka prsnog koša, transtorakalni ultrazvuk, kompjuterizirana tomografija (CT), magnetna rezonanca (MR), pozitronska emisijska tomografija (PET) (29).

Radiološki nalaz najčešće otkriva nodularno, nepravilno, unilateralno zadebljanje pleure i unilateralni pleuralni izljev, koji ima karakteristike eksudata uz čestu hemoragiju (9). Može se primijetiti i smanjenje volumena istostranog plućnog krila, elevacija ošita, suženje međurebrenih prostora (7). CT omogućuje otkrivanje opsega tumora i detekciju metastaza limfnih čvorova (29). CT omogućuje bolji prikaz pleuralnog zadebljanja, hilarnih, medijastinalnih limfnih čvorova kao i bolju detekciju metastaza u plućima te omogućava bolju evaluaciju invazije interkostalnih mišića, kosti, masti (7). S obzirom da nije najtočniji u otkrivanju rane invazije endotorakalne fascije i međurebrenih mišića koristi se MR (7). MR omogućuje procjenu zahvaćenosti ošita ili zida prsnog koša, PET se koristi za otkrivanje udaljenih metastaza, pomoć u dijagnostici, stagingu, evaluaciju terapijskog ishoda kao i praćenje bolesti nakon terapije (7,29), dok transtorakalni ultrazvuk omogućava prikaz pleure uz prisutnost pleuralnog izljeva te olakšava izvođenje pleuralne punkcije (29).

U invazivne metode dijagnostike ubrajamo: pleuralnu punkciju, perkutanu biopsiju iglom, "image-guided" perkutana pleuralnu biopsiju, torakoskopiju i torakotomiju (29).

Uzorak dobiven pleuralnom punkcijom analizira se citološki. Osjetljivost citološke dijagnostike je ograničena (29) te su citološki testovi pleuralne tekućine često negativni (9). Vjerojatnost postavljanja točne dijagnoze ovim putem iznosi oko 26% te se češće susreću negativni nalazi u slučaju sarkomatoidnog nego kod epiteloidnog tipa (32). Negativan nalaz citologije ne isključuje dijagnozu difuznog malignog pleuralnog mezotelioma (29).

Bioptički uzorak dobiva se perkutanom biopsijom iglom, "image- guided" perkutanom pleuralnom biopsijom, torakoskopijom, torakotomijom te se patohistološki analizira. Vjerojatnost postavljanja dijagnoze kod perkutane biopsije iglom iznosi oko 31 %, dok kod CT- vođene pleuralne biopsije iznosi 80% (32). Kod 30- 40 % slučajeva je otežano postavljanje dijagnoze čak i torakoskopijom (32).

Patohistološka dijagnostika malignog mezotelioma je zahtjevna zbog heterogenosti tumora (63), histološke sličnosti s drugim tumorima te potrebe za dijagnostičkim razlikovanjem neoplastičke od reaktivne proliferacije mezotelioma (65).

Kako bi se postavila točna dijagnoza i razlikovalo DMPM od benignih upalnih stanja i metastatskih adenokarcinoma uz histološki nalaz potrebna je imunohistokemijska dijagnostika (9).

Dosad nije pronađen visoko specifičan i visoko osjetljiv marker za dijagnozu malignog mezotelioma (65). Citokeratin (CK) ima važnu ulogu u dijagnostici mezotelioma (10). Uz histološki nalaz preporuča se kombinacija pozitivnog nalaza 2 ili više mezotelinih markera kao što su kalretinin i WT-1 uz negativan nalaz 2 ili više epitelnih markera za razlikovanje malignog mezotelioma od metastatskog adenokarcinoma pluća kao što su MOC-31, BG8, CEA, B72.3, Ber-EP4, TTF-1, Napsin A. Od mezotelinih markera korisni su i CK 5/6, D2-40, HBME-1, vimentin (VIN) (10,62).

U razlikovanju neoplastičke i reaktivne proliferacije mezotela važnim faktorima se smatraju: invazija strome, prisutnost nekroze, stanična atipija, kao i imunohistokemijski markeri kao što su primjerice p53, desmin, EMA, transporter glukoze 1 (65).

Stadij malignog pleuralnog mezotelioma određuje se na temelju patohistološkog i nalaza kliničkih pretraga. Metoda izbora u evaluaciji primarnog tumora, lokalne invazije, procjenu intratorakalnih limfnih čvorova i ekstratorakalnog širenja tumora je CT s kontrastom. Kao dodatna metoda može se primijeniti i MR (bolja u detekciji invazije prsnog zida, ošita i medijastinuma) te MR s kontrastom (procjena prokrvljenosti tumora, odnosno praćenje odgovora na terapiju) (63).

Također se provode istraživanja vezana uz skrining malignog pleuralnog mezotelioma s obzirom da dosad nije nađen idealan biomarker za ovu svrhu, a rana detekcija bila bi važna u ranom liječenju tumora te mogućoj boljoj prognozi bolesti.

Trenutno se najkorisnijim biomarkerom smatra mezotelin čije su vrijednosti povišene u oko 15- 40% osoba izloženih azbestu i to prije dijagnoze mezotelioma. Prema studiji Morrea i dr. kao test za rano otkrivanje mezotelioma mogli bi poslužiti serumski ENOX2 proteini karakteristični za maligni mezoteliom s obzirom da se u pojedinaca izloženih azbestu mogu detektirati 4- 11 godina prije pojave simptoma maligniteta i postavljanja dijagnoze, no autori su naglasili potrebu za daljnjim istraživanjem na većoj skupini pacijenata (66).

1.4.5 Terapija

Maligni pleuralni mezoteliom kao malignitet još uvijek karakteriziraju: otežano postavljanje dijagnoze u ranom stadiju bolesti, nedostatak učinkovite terapije te loša prognoza (10).

Terapeutske opcije za DMPM uključuju kirurške postupke, kemoterapiju i radioterapiju, odnosno kombinacije ovih postupaka (67). Smatra se da se u liječenju dugoročno postižu bolji rezultati ako se kombinira nekoliko modaliteta, no još uvijek se raspravlja o tome koje postupke primijeniti u kojoj fazi bolesti tako da različite ustanove slijede različite režime terapije (68) s obzirom da nije ustanovljena optimalna terapija za maligni mezoteliom koja bi omogućila što dulje preživljenje pacijenata (13,69).

U kirurškom liječenju DMPM-a primijenjuju se 4 kirurška postupka: ekstrapleuralna pneumonektomija, proširena odnosno radikalna pleurektomija/ dekortikacija, pleurektomija/ dekortikacija, parcijalna pleurektomija (15).

Ukoliko se radi o mezoteliomu u resektabilnom stanju primijenjuje se makroskopska kompletna resekcija koja podrazumijeva ekstrapleuralnu pneumonektomiju ili radikalnu pleurektomiju/ dekortikaciju. Cilj ovih postupaka je odstranjenje tumora vidljivog tijekom operativnog zahvata (makroskopska bolest) (68), no primijenjivo je u oko 5% slučajeva (13).

Ekstrapleuralna pneumonektomija uključuje resekciju ipsilateralnog pluća, visceralne i parijetalne pleure, ipsilateralne hemidijafragme i perikarda, kao i rekonstrukciju zadnje dvije navedene strukture kako bi se spriječila hernijacija srca i organa trbušne šupljine (70).

Pleurektomija/dekortikacija uključuje parijetalnu i visceralnu pleurektomiju kako bi se odstranio vidljivi tumor bez resekcije dijafragme ili perikarda. Može se primijeniti i proširena pleurektomija/ dekortikacija koja uključuje parijetalnu i visceralnu pleurektomiju uz odstranjenje vidljivog tumora te resekciju dijafragme i/ ili perikarda, dok se parcijalna pleurektomija primijenjuje u palijativne ili dijagnostičke svrhe, a uključuje djelomično odstranjenje parijetalne i/ili visceralne pleure bez odstranjenja vidljivog tumora (70).

Pleurektomija/dekortikacija se preporučuje kod pacijenata s oslabljenom funkcijom srca i pluća kao i sa komorbiditetima koji ne bi mogli podnijeti izvođenje ekstrapleuralne pneumonektomije (68). U dosadašnjoj literaturi navodi se da se kod ekstrapleuralne pneumonektomije primijetilo bolje preživljenje, no viši perioperativni mortalitet i morbiditet, dok je pleurektomija/ dekortikacija vezana uz manji perioperativni rizik, ali i uz manji dugoročni uspjeh u kontroli širenja ili ponovne pojave malignog pleuralnog mezotelioma (70).

Odluka o primijeni citoreduktivnih postupaka donosi se na temelju proširenosti bolesti, iskustvu ustanove i kirurga, ali i na temelju općeg stanja i želje pacijenta.

Prilikom postavljanja dijagnoze, manji broj pacijenata može biti tretiran samo operativnim zahvatom, već im je potreban multimodalni pristup, odnosno primjena i drugih modaliteta liječenja u kombinaciji s operativnim zahvatom (15).

Kirurško liječenje dopunjuje se kemoterapijom i/ ili radioterapijom u neo- adjuvantnom ili adjuvantnom obliku (68). Kod pacijenata s uznapredovalom bolešću već u fazi postavljanja dijagnoze u liječenju se ne primjenjuje se multimodalni pristup zbog stanja pacijenata te se u sistemskom liječenju primjenjuje kemoterapija (71).

U slučaju malignog mezotelioma najčešće se koristi kombinacija kemoterapeutika s obzirom da se to pokazalo boljim s obzirom na preživljenje u odnosu na primjenu samo jednog kemoterapeutika (67). Lijekovi se primijenjuju s ciljem produljenja preživljenja i poboljšanja kvalitete života (10). Trenutno se najboljom opcijom smatra kombinacija pemetrexeda i cisplatina ili karboplatina (67) kao prva linija terapije za pacijente kod kojih se ne može izvesti operativni zahvat ili kao dio multimodalne terapije (72). Oko 40% pacijenata pokazuje odgovor na ovu terapiju s prosječnim preživljenjem 12.1 mjesec (23), dok u slučaju primjene jednog kemoterapeutika odgovor pokazuje manje od 20% pacijenata bez poboljšanja prosječnog preživljenja, odnosno s preživljenjem 9.3 mjeseca (13). U drugoj liniji kemoterapije primijenjuju se različiti agensi samostalno

ili kao politerapija, no niti jedan nije potvrđen kao uspješan (23). Kemoterapija se primijenjuje kao indukcijska metoda (pacijenti je lakše podnose, može se primijeniti veća doza, nakon završetka primjene može se procijeniti potreba za operativnim zahvatom) ili kao adjuvantna kemoterapija (nakon operacije određuje se stadij tumora te se procijenjuje potreba za ovim tipom liječenja, ne odgađa se operacija zbog postupka kemoterapije, no pacijenti je teže podnose i lošijeg su općeg stanja zbog prethodnog operativnog zahvata, češće se primijenjuju niže doze), iako nema značajnije razlike u preživljenju između ovih postupaka (68). Kemoterapija u većine pacijenata produljuje preživljenje otprilike 2- 3 mjeseca (64).

Učinak radioterapije u slučaju mezotelioma je nezadovoljavajući s obzirom na činjenicu da je mezoteliom neosjetljiv na ovaj tip liječenja, a postupak otežava i način širenja tumora na okolne vitalne organe te je otežano omogućiti odgovarajuću dozu i područje zračenja kako bi postupak bio učinkovit (10). Radioterapija se primijenjuje kao profilaktička ili adjuvantna (68). Profilaktička kemoterapija se primjenjuje na mjestu punkcije ili biopsije tkiva kako bi se smanjila mogućnost rasapa tumorskih stanica (10). Kod adjuvantne radioterapije primijenjuje se zračenje prednje i stražnje strane hemitoraksa, a okolina je zaštićena štitovima. Na taj način su okolni organi zaštićeni, no ne postiže se odgovarajuća razina zračenja prsišta na rubovima štitova. Kako bi se promostili ovakvi problemi primijenjuju se nove tehnike zračenja kao što su: „intensity-modulated“ terapija zračenja gdje su normalni organi zaštićeni od zračenja, a prsište može primiti više doze zračenja. Također se istražuju nove rotacijske tehnike zračenja kako bi se postiglo zračenje tumora s više kuteva. Najuočajan komplikacija zračenja je pneumonitis, odnosno reaktivna upala pluća (70).

Primjena trimodalne terapije, odnosno kombinacija neo-adjuvantne kemoterapije, radikalne operacije i adjuvantne radioterapije pokazala je bolje rezultate preživljenja kod pacijenata s epiteloidnim tipom mezotelioma, R0- resekcijom i odsutnošću metastaza u ekstrapleuralnim limfnim čvorovima (73).

Osim ovih modaliteta liječenja primijenjuju se i: intrakavitarna fotodinamska terapija (svjetlost određene valne duljine vodi do proizvodnje reaktivnog kisika što dovodi do uništenja tumorskih stanica, ometanje tumorske prokrvljenosti i aktivacije imunog odgovora), zatim intrakavitarna kemoterapija (primjena kemoterapeutika lokalno u područje pleure nakon izvršenog operativnog zahvata čime se postiže veća doza na željenom mjestu uz manje sistemskih neželjenih nuspojava) (68). Fotodinamska terapija predstavlja neionizirajuću radijacijsku terapiju kod koje se prilikom djelovanja

svjetlosti specifične valne duljine na određenu tvar (fotosenziter) koja se akumulira u tumorskim stanicama proizvodi reaktivni kisik te tako dolazi do apoptoze, nekroze ili autofagije tumorskih stanica. Također, ovaj tip terapije može potaknuti upalnu reakciju kod domaćina usmjerenu prema tumorskim stanicama. Sve se više upotrebljava u liječenju malignih bolesti prsišta, primjerice, karcinoma pluća i maligni pleuralni mezoteliom. Fotodinamska terapija ima prednosti kao što su: ne izaziva sekundarne karcinome zbog nedjelovanja na tumorsku DNA za razliku od ionizirajućeg zračenja, kemorezistencija kao i radiorezistencija ne utječu na njezinu učinkovitost, ne ometa primjenu drugih modaliteta liječenja, može se višestruko primijeniti na istom mjestu bez smanjenja učinka. Nedostatak ove terapije leži u činjenici da svjetlost prodire oko 5- 10 mm debljine tkiva tako da se primjenjuje za terapiju maligniteta koji zahvaćaju površinu organa i tjelesnih šupljina. U terapiji malignog pleuralnog mezotelioma fotodinamska terapija primjenjuje se kao dio multimodalitetne terapije te se prije njezine primjene treba obaviti makroskopska potpuna resekcija tumora zbog njezine ograničene dubine prodiranja. Smatra se obećavajućim načinom liječenja u lokalnoj kontroli bolesti i poboljšanju preživljenja kod pacijenata podvrgnutim makroskopskoj potpunoj resekciji (74).

S obzirom da je maligni mezoteliom vezan uz složen proces karcinogeneze koji uključuje genetske i epigenetske promjene njegovo liječenje se oslanja i na genomsku medicinu, odnosno pronalazak ciljnih molekula na koje se može djelovati terapijski. Potreba za ciljanom terapijom javila se kako bi se zaustavilo napredovanje bolesti ili u idealnim okolnostima izliječila bolest prilikom primjene ovih agensa uz kemoterapeutike (poboljšanje učinka terapije, smanjenje kemorezistencije i toksičnosti) ili kao monoterapija kod pacijenata lošeg općeg stanja koji ne mogu biti podvrgnuti agresivnijem tretmanu (25). Neki od ciljanih agensa su primjerice erlotinib, gefitinib (EGFR TKIs -receptor epidermalni faktor rasta inhibitori tirozin kinaze), imatinib (PDGFR β / C- Kit inhibitor), bevacizumab (anti- VEGF protutijelo), inhibitori histon deacetilaze, MET inhibitori, GDC-0980 (inhibitor PI3K/ mTOR inhibitor) (15, 70).

Trenutno se pronalaze novi ciljani agensi, novi biomarkeri, novi antitumorski mehanizmi te se novi agensi testiraju u kliničkoj praksi (15). Iako neki od testiranih ciljanih agensa obećavaju, još uvijek se ne primjenjuju u rutinskoj kliničkoj praksi (71). S obzirom na patogenezu, maligni pleuralni mezoteliom smatra se heterogenim malignitetom te se upravo ta heterogenost smatra teškoćom u primjeni ciljane terapije kao i uzrokom slabog djelovanja konvencionalne kemoterapije. Također se u terapiji malignog

mezotelioma važnim smatra i proces translacije koji ujedinjuje različite onkogene puteve te se djelovanje na komponente translacije, primjerice na faktor inicijacije translacije eIF6 smatra jednim od potencijalnih rješenja u ciljanoj terapiji (75).

S obzirom na važnost imunološkog sustava u razvoju tumora, kao i dosadašnjih spoznaja da u slučaju malignog mezotelioma postoji humoralni odgovor usmjeren na tumorske antigene i korelacija prisutnosti limfocitnog infiltrata i bolje prognoze, provode se istraživanja vezana uz imunološku terapiju koja uključuje primjenu rekombinantnih virusnih proteina, cjepiva i terapiju temeljenu na protutijelima i dendritičkim stanicama. Smatra se atraktivnim pristupom jer je visoko specifična i omogućuje djelovanje na bolest s minimalnim utjecajem na zdrava tkiva. Primijenjuje se kao pasivna imunoterapija koja podrazumijeva upotrebu citokina, monoklonalnih protutijela, aktiviranih T limfocita ili makrofaga koji se injiciraju i omogućuju trenutnu zaštitu od antigena, kao i apliciranje virusnih vektora u tumorske stanice (30) (u slučaju malignog mezotelioma primjerice antitumorska viroterapija primjenom onkolitičkih virusa kao što su atenuirani sojevi virusa ospica) (76) kako bi se potaknula proizvodnja citokina na mjestu razvoja tumora (30). Virusi se primijenjuju kako bi se iskoristila njihova onkolitička aktivnost (viroterapija) ili da bi se u tumorsku stanicu ubacio gen koji kodira za protein s antineoplastičkom aktivnošću (viralna genska terapija) (77). Aktivna imunoterapija podrazumijeva cijepljenje, odnosno poticanje imunološkog odgovora usmjerenog na tumorske stanice kao i imunoterapiju stanicama (aktivirani T- limfociti, dendritičke stanice). Dosad pasivna imunoterapija nije pokazala bolji učinak u odnosu na ostale terapijske metode tako da se teži njezinom usmjeravanju na specifičnije i učinkovitije efektorske populacije. U slučaju primjene aktivne imunoterapije rezultati su zadovoljavajući, ali još uvijek nedovoljni kako bi ih se ovakve strategije mogle upotrijebiti kao prva linija terapije. Prema dosadašnjim studijama, smatra se da su potrebna daljnja istraživanja primjene imunoterapeutskih metoda kao dio multimodalne terapije malignog pleuralnog mezotelioma (30). Neki od istraživanih agensa uključuju tremelimumab (ljudsko IgG2 monoklonalno protutijelo na CTLA4, odnosno citotoksični T- limfocit-vezan protein 4), adenoviralni vektor koji kodira humani interferon- α , fresolimumab (ljudsko monoklonalno protutijelo koje neutralizira transformirajući faktor rasta β), WT1 cjepivo, amatuximab (monoklonalno protutijelo na mezotelin) (15).

Već spomenute mikroRNA imaju ulogu u kemorezistenciji, odnosno mogu povećati osjetljivost stanica malignog mezotelioma na kemoterapeutike, primjerice miR-16 povećava osjetljivost malignim stanica pleuralnog mezotelioma na gemcitabin i

pemetrexed, a ispituje se i njihova terapijska vrijednost s obzirom da je prisutna smanjena izraženost mikroRNA kao što su miR-192 i miR-193a-3p te se prilikom obnavljanja njihovih razina na normalnu vrijednost javlja inhibicija rasta u staničnim linijama MPM- a in vitro i ksenograft tumora in vivo, tako da se smatra da se ciljanom upotrebom "mimic" tumor supresorske microRNA može postići liječenje raka. Trenutno se klinički testira miR-15/16-derived-mimic (61).

Daljnja istraživanja vezana uz ove nove pristupe u terapiji malignog pleuralnog mezotelioma i dalje su potrebna kako bi se poboljšala prognoze ovog maligniteta (69).

Iako je preživljenje pacijenata oboljelih od mezotelioma loše, njegova duljina ovisi o stadiju tumora, odnosno njegovoj proširenosti u vrijeme dijagnoze, o tipu mezotelioma kao i o odgovoru na terapiju. Liječenje može biti kurativno s ciljem da se odstrani cijeli tumor ili palijativno koji predstavlja olakšanje simptoma (78). Većina pacijenata prezentira se inoperabilnim stadijem bolesti ili je prisutna nemogućnost izvođenja operativnog zahvata zbog dobi ili komorbiditeta pacijenta te se pacijenta tretira sistemskom terapijom s ciljem olakšanja simptoma i produženja života (15).

Palijativno liječenje primijenjuje se u situacijama koje uključuju loše opće stanje pacijenta, pacijent s bifazičnim ili sarkomatoidnim mezoteliomom neovisno o stadiju, stadij 3 ili 4 epiteloidnog mezotelioma, N2 i/ ili M1 stadij tumora, a uključuje pleurodezu (primjenu talka u području pleuralne šupljine što dovodi do pojave upale, nastanak granulacija, adhezija pleure i fibroze pleure odnosno fiksacije listova pleure) kako bi se smanjila bol i kontroliralo nakupljanje pleuralnog izljeva te palijativnu kemoterapiju u pacijenata s brзом progresijom bolesti, kao i radioterapiju za olakšanje boli kod pacijenata s boli u prsima i infiltracijom prsne stijenke (29,79).

1.4.6 Patologija

Maligni mezoteliom je najčešće izgleda debelog sivkastobijelog ili žućkastog plašta. Najčešće je smješten u području desnog pluća (2). U području parijetalne pleure i pleuralne površine ošita mogu se naći dobro ograničeni pleuralni plakovi gustog veziva, a u plućima bolesnika azbestna tjelešca (2).

Razlikujemo 3 histološka tipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma: epiteloidni, sarkomatoidni i bifazični tip (2,11,80,81).

Prisutna je velika raznolikost u histologiji ova tri tipa, a neki oblici pokazuju i višestruke histološke uzorke. Razlikovanje ovih različitih oblika važno je radi razlikovanja DMPM-a od drugih neoplazmi i eventualne prognoze (80,81).

Epiteloidni tip građen je od kubičnih stanica koje oblažu tubularne i mikrocistične prostore u koje se izbočuju resičaste (papilarne) strukture (2).

Sarkomatoidni tip sastoji se od vretenastih i katkad fibroblastima sličnim stanicama u storiformnom uzorku koji formira vijuge i snopove (2,11). Ovaj tip karakterističan je po većoj količini mitozna, nekroze te stanične atipije u odnosu na epiteloidni tip. Može sadržavati i područja osteosarkomatozne i hondrosarkomatozne metaplazije, a može se javiti kao limfohistiocitoidnom obliku (diskohezivne, atipične histiocitoidne maligne mezotelne stanice unutar jakog infiltrata limfocita i plazma stanica) te u dezmodoplastičnom obliku (gusti kolagen u storiformnom uzorku koji čini više od 50% tumora) (80), a rijetko je prisutna i lejomioidna i rabdomioblastična diferencijacija (82).

Bifazični tip građen je od sarkomatoidnih i epiteloidnih područja (2,11,81). Kako bi se postavila dijagnoza bifazičnog tipa potrebna je prisutnost najmanje 10% svakog od navedena 2 histološka tipa u neoplazmi (81).

Epiteloidni tip je najčešće prisutan oblik DMPM- a, a dolazi u obliku različitih histoloških uzoraka. Najučestaliji uzorci uključuju: tubulopapilarni, adenomatoidni (mikroglandularni), solidni, acinarni (glandularni), dok se rjeđe nalaze: varijanta svijetlih stanica, deciduoidni, adenoidni cistični, uzorak stanica prstena pečatnjaka i uzorak malih stanica (81).

U našem istraživanju dijagnosticirani su ovi podtipovi epitelnog difuznog malignog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni, mikrocistični, mikropapilarni, mikroglandularni, pleomorfni, acinarni.

Solidni podtip je jedan od najčešćih oblika difuznog malignog pleuralnog mezotelioma, a građen je od gnijezda, nakupina ili tračaka okruglih stanica obilne citoplazme i okrugle, vezikularne jezgre s izraženim nukleolima u dobro diferenciranom obliku, dok se kod slabo diferenciranog nalaze tračci diskohezivnih okruglih ili poligonalnih stanica uniformnih jezgara (81).

Trabekularni oblik je sastavljen od malih, uniformnih stanica koje čine tanke tračke (80).

Tubulopapilarni oblik je jedan od najčešćih oblika epiteloidnog difuznog malignog mezotelioma, a građen je od malih tubula i papilarnih struktura s fibrovaskularnom srži, često s pukotinama i trabekulama okruženim uniformnim plosnatim, kuboidnim ili poligonalnim stanicama (81).

Tubularni oblik karakteriziraju spljoštene do kuboidalne stanice koje okružuju prazne prostore (82).

Mikrocistični oblik sastavljen je od prostora nalik cistama koji okružuju atenuirane stanice i nakupine bazofilnog izvanstaničnog materijala (82).

Mikropapilarni oblik je građen od papilarnih struktura oblika resica bez središnje fibrovaskularne srži (80).

Mikroglandularni (adenomatoidni) oblik sastavljen je od plosnatih do kuboidnih stanica koje obrubljaju male strukture nalik žljezdama (81).

Acinarni (glandularni) oblik čine izduljene ili razgranate strukture nalik žljezdama obrubljene relativno uniformnim kuboidalnim stanicama (81).

Pleomorfni tip je sastavljen od izraženih tumorskih divovskih stanica ili anaplastičnih stanica (80,81). Ubraja se epiteloidni tip, no s obzirom da je vezan uz lošu prognozu, brzu pojavu recidiva te uz izraženu limfatičnu i vaskularnu invaziju postoje studije koje predlažu svrstavanje ovog podtipa u sarkomatoidni ili bifazični tip difuznog malignog pleuralnog mezotelioma (37, 80).

1.5 Plakofilini

Plakofilini su proteini identificirani u kompleksima stanične adhezije (83). Pripadaju u podobitelj "armadillo repeat" proteina na temelju njihovih primarnih sekvenci. "Arm-repeat" proteini se dijele u 2 glavne skupine, a to su: alfa- katenin/ β -katenin/plakoglobin grupa i p120-vezani proteini. Ova zadnja se dijeli na podobitelji: p120^{ctn} i plakofiline (84). U plakofiline ubrajamo plakofilin 1, 2, 3, dok u podobitelj p120^{ctn} ubrajamo protein p120, delta- katenin (NPRAP), ARVCF, p0071 (85). Članovi armadillo obitelji pokazuju važne strukturne i regulatorne uloge kroz svoje interakcije s proteinima u dezmosomima i adherentnim spojevima (86). Plakofilini su građeni od N terminalne glavne domene koju slijedi niz od 10 ponavljanja sastavljen od 42 aminokiseline ("arm repeats") te od kratkog C terminalnog repa (86). Amino- terminalni dijelovi (glavna domena) su različiti i ne pokazuju homologiju s drugim proteinima i plakofilinima međusobno, osim male sekvence blizu amino kraja koja se naziva homologna domena 2 (HR) koja pokazuje određenu homologiju između plakofilina. Plakofilin 3 pokazuje 51% sličnosti u Arm ponavljanjima te 44.3% cjelokupne homologije s plakofilinom 1, a 51.9% sličnosti u Arm ponavljanjima i 44.9% ukupne homologije s plakofilinom 2 (87). Tkiva i stanice mogu izražavati jedan, ali i više tipova plakofilina. Pokazuju funkcije u adheziji stanica, ali i stanične funkcije neovisne o adheziji (83). Osim strukturne uloge, smatra se da su važni u staničnom signaliziranju (84,88,89,90), diferencijaciji stanica (91), normalnom razvoju i za stabilnost tkiva (92) u procesu translacije (93,94,95), transkripcije (96), kao posttranskripcijski regulatori genske ekspresije (97,98) i u epitelno- mezenhimalnoj tranziciji (83,99). Pokazuju tkivno specifične i diferencijacija specifične uzorke ekspresije (100,101). U različitim tipovima tumora također se mogu primijetiti različiti uzorci izraženosti plakofilina (91). Spoznaje o regulaciji njihove ekspresije još uvijek su manjkave (102). Prema dosadašnjim saznanjima uloga plakofilina u dezmosomima je bolje istražena u odnosu na onu u jezgri i citoplazmi (96). Različite lokalizacije i pretpostavljene funkcije plakofilina sugeriraju njihovo sudjelovanje u komunikaciji između plazma membrane, citoplazme i/ ili jezgre (103). Svaki od njih ima specifičan uzorak tkivne ekspresije, mnogostruke varijante lokalizirane u različitim staničnim odjeljcima i mnogostruke specifične vezne partnere (87). Knockout studije na miševima pokazuju da ablacija plakofilina 2 dovodi do smrti embrija, dok nedostatak plakofilina 1 i 3 u embrionalnom razvoju ne dovodi do većih posljedica, odnosno smrtnog ishoda embrija (104).

1.5.1 Plakofilin 1 (PKP 1) je najmanji od svih plakofilina molekularne težine oko 75 kDa. Prisutan je u dezmosomima stratificiranog, složenog i prijelaznog epitela, a odsutan u jednostavnom epitelu. U stratificiranom epitelu prisutan je u svim slojevima, osim u stratum corneum stratificiranog pločastog epitela te se smatra markerom diferencijacije keratinocita. Nalazimo ga i u jezgri i citoplazmi stanica. Mogu se naći dvije izoforme plakofilina 1: PKP1a koji je prisutan i u jezgri i u dezmosomima i PKP1b koji je prisutan samo u jezgri. I jezgri i dezmosomalni PKP1 razgrađuju kaspaze tijekom apoptoze. Karboksil-terminalni dio bitan je za dolazak PKP1 do plazma membrane dok su armadillo domene vezane uz reorganizaciju citoskeleta. PKP 1 ima ulogu u kontaktu stanica, ali je i citoplazmatska i nuklearna signalna molekula koja utječe na gensku ekspresiju (105). Citoplazmatski PKP 1 djeluje kao posttranskripcijski regulator genske ekspresije (97,98) te potiče translaciju što rezultira proliferacijom stanica (93,95,106), a korelira i s smanjenom međustaničnom adhezijom, povećanom translacijom te migracijom stanica (106). Nuklearni PKP 1 promiče rast stanica (89). Otkriveno je da proces fosforilacije PKP 1 utječe na njegovu akumulaciju u citoplazmi, dok je nefosforiliran PKP 1 stabilan u dezmosomima i potiče međustaničnu adheziju. PKP 1 se povezuje s jednolančanom DNA te se smatra da bi mogao biti uključen u odgovor na oštećenje DNA (107). Ispitivana je izraženost PKP 1 u različitim tipovima tumora, primjerice, u adenokarcinomu jednjaka primijećen je gubitak PKP 1, smanjena ekspresija ovog proteina u karcinomu prostate vezana je uz veću proširenost tumora (povećan Gleason score), u invazivnim tumorima kože, glave i vrata njegova ekspresija inverzno korelira s gradusom i metastaziranjem (105). Smatra se da bi preko stimulacije translacije PKP 1 mogao poticati karcinogenezu ili biti tumor supresor preko pojačanja međustanične adhezije (106). Mutacije PKP1 gena vode do nastanka poremećaja primjerice: autosomno recesivne genodermatoze: ektodermalna displazija/sindrom fragilnosti kože, dok primjerice keratinociti bez PKP1 pokazuju veću migraciju stanica što je važno u biologiji tumora (83).

1.5.2 Plakofilin 2 (PKP 2) je protein molekularne težine oko 100 kDa, najveći je od svih plakofilina, a prisutan je u bazalnim stanicama određenog stratificiranog epitela dok su bolje diferencirani keratinociti negativni na dezmosomalni PKP 2 (108). Široko je rasprostranjen u dezmosomima svih proliferirajućih epitelih stanica normalnih tkiva, kao i u tumorima i staničnim kulturama porijeklom iz tih stanica te je prisutan i u nedezmosomalnim adherentnim spojevima stanica mezenhima (109). Veže se uz citoplazmatske dezmosomalne kadherine, odnosno za dezmolakin koji je povezan s intermedijarnim filamentima i bitan je za staničnu adheziju i signalizaciju (110). Također dolazi u direktan kontakt s plakoglobinom, dezmogleinom 1 i 2 te dezmolakinom 1a i 2a. Glavna domena je zaslužna za većinu ovih interakcija te je potrebna za usmjeravanje plakofilina 2 prema staničnoj granici (86). Gubitak PKP 2 vodi do poremećaja akumulacije dezmolakina u dezmosome epitelih stanica i do strukturnih poremećaja aktinskog citoskeleta (111). Regulira dinamiku fokalne adhezije i staničnu migraciju (deplecija PKP 2, jača adhezija stanica i slabija migracija) (107). Dolazi u dvije izoforme. Može se naći i u jezgri stanica koje sadrže dezmosome, ali i kod stanica neepitelih tkiva koje ne sadrže dezmosome. Uključen je u regulaciju gena, citoplazmatsku signalizaciju, u sastavljanje dezmosomalnih komponenti u dezmosome, uključen je u organizaciju različitih tipova staničnih spojeva kao što su "gap junctions" i "composite junctions" stanica srčanog mišića (108). Prema *in vivo* ksenotransplantacijskoj studiji utjecaja plakofilina 2 na razvoj karcinoma dojke Arimota i dr., plakofilin 2 promovira dimerizaciju i autofosforilaciju EGFR što dovodi do aktivacije EGFR vezanih signalnih puteva te na taj način utječe na proliferaciju, migraciju tumorskih stanica i razvoj tumora (knockdown plakofilina 2, smanjena proliferacija i migracija stanica) te se smatra da bi plakofilin 2 mogao biti potencijalna meta liječenja karcinoma (112,113). Uključen je u proces transkripcije i translacije kao komponenta polimeraza III holoenzima, a djeluje i kao signalna molekula koja funkcionalno vezuje RhoA i protein kinaza C- ovisne puteve kojima utječe na okupljanje dezmosoma i reorganizaciju aktina (107). Također je prisutan u adherentnim spojevima stanica srčanog miksoma (benigni tumor kojeg karakteriziraju stelatne stanice raznoliko dugačkih staničnih nastavaka uklopljene u želatinozni mukozni izvanstanični matriks), dok ga se ne može naći u miksomima nekardijalne etiologije (108). Prema dosadašnjim istraživanjima plakofilin 2 je bitan za normalan razvoj i funkciju srca (113). Haplo-insuficijencija PKP 2 u ljudi prisutna je nasljednoj bolesti srca nazvanoj autosomno-dominantna aritmogena kardiomiopatija desnog ventrikula (ARVC) (83). Plakofilin 2 je u miokardu bitan kao sastavni dio dezmosoma miokarda koji osiguravaju mehaničku

snagu i omogućuju prijenos sila između stanica kroz svoju povezanost s intermedijarnim filamentima što je važno za stabilno provođenje električnih impulsa u miokardu. Također, promjene u ekspresiji plakofilina 2 utječu na transkripciju gena, diferencijaciju stanica, apoptozu stanica putem regulacije specifičnih signalnih puteva (114). Mutacije koje dovode do nastanka ove kardiomiopatije prisutne su u 5 komponenti srčanih dezmosoma i to u plakoglobinu (PG), PKP 2 (PKP2), dezmozoplakinu (DSP), dezmozogleinu-2 (DSG2), dezmozokolinu-2 (DSC2) (114,115,116), no mogu se naći i mutacije ne-dezmosomalnih gena: transmembranski protein 43 (TMEM43), fosfolamban (PLN), dezmin (DES), lamin A/C (LMNA), transformirajući beta 3 faktor rasta (TGFB3) i titin (TTN) (114,116). ARVC je karakterizirana povećanjem i disfunkcijom desnog ventrikla, ali i lijevostranom ili biventrikularnom kardiomiopatijom vezanom uz progresivnu zamjenu tkiva miokarda vezivnim i masnim tkivom (117,118). Ovakav poremećaj u arhitekturi srčanog mišića rezultira teškom disfunkcijom desnog ventrikla, kao i životno opasnim srčanim aritmijama i iznenadnom srčanom smrću. Smatra se da mutacije PKP2 vjerojatno nisu specifične za ARVC, no postoji veza između defekata dezmosomalnih proteina i životno ugrožavajućih aritmija (117). Smatra se nedostatak plakofilina 2 dovodi do poremećaja u funkciji natrijevih kanala što je potencijalan supstrat za pojavu aritmija, te da je u ljudi manji broj mutacija plakofilina 2 vezanih uz kardiomiopatiju tipa missense mutacija, dok je 90% njih vezano uz pojavu prematurnog stop kodona što ukazuje na haploinsuficijenciju kao na predominantni genetski mehanizam. Na haploinsuficijenciju ukazuju i smanjena razina RNA i smanjena ekspresija proteina plakofilina 2 u ovih pacijenata (118). U studiji Rasmussena i dr. pokazano je da razina ekspresije dezmosomalnih proteina u pacijenata s aritmogenom kardiomiopatijom pokazuje sličnosti s njihovom ekspresijom u keratinocitima što bi se moglo koristiti kako bi se procijenile dezmosomalne mutacije u pacijenata s ovom kardiomiopatijom (114). Ekspresija plakofilina 2 je povišena u mnogim tumorima kao što su tumor dojke, prostate, orofarinksa, mokraćnog mjehura, gušterače, kolorektalni karcinom (113).

1.5.3 Plakofilin 4 (PKP 4, p0071) je "armadillo repeat" protein prisutan u međustaničnim spojevima te je blisko vezan u plakofiline 1-3 i p120^{ctn}. Otkriven je od strane Hatzfelda i Nachtsheima 1996. godine (119). Smatra se da ima dualnu lokalizaciju, odnosno da je prisutan i u dezmosomima i adherentnim spojevima ovisno o tipu stanica te se smatra da ima moguću ulogu u regulaciji komunikacije između dezmosoma i adherentnih spojeva (120). U radu Hatzfelda et al. iz 2002. pokazano je da je N terminalna head domena povezana s dezmosomima, odnosno s dezmozoplakinom, plakoglobulinom i dezmozokolinom 3a, dok "armadillo repeats" dolaze u interakciju s nekim ne- dezmosomalnim kadherinima (120). Regulira ravnotežu između sastavljanja dezmosoma i adherentnih spojeva, bitan je za motilitet epitelnih stanica. Potiče sastavljanje i stabilnost adherentnih spojeva te simultani gubitak dezmosoma, smanjuje migraciju stanica najvjerojatnije kroz pojačanje stabilnosti adherentnih spojeva. Zbog dualne lokalizacije p0071 smatra se da ima ulogu u staničnoj adheziji, ali i staničnoj signalizaciji (121). Osim ovih, primijećeno je da p0071 ima i druge funkcije, primjerice u tumorigenezi, odnosno primijećeno je da je gubitak p0071 povezan s povećanom veličinom tumora u primarnim orofaringealnim karcinomima što sugerira da bi promjene u izraženosti ovog proteina mogle biti važne u progresiji tumora, ali i u drugim funkcijama epitelnih stanica ovisnima o dinamičkim promjenama u staničnoj adheziji i motilitetu (122,123). Ima ulogu u Rho signalizaciji tijekom citokineze. Tijekom interfaze smješten je u centrosomima i staničnim spojevima, dok je tijekom mitoze sve do anafaze prisutan na polovima vretena, dok je u zadnjoj fazi mitoze koncentriran u središtu stanice. I pojačana ekspresija i gubitak p0071 rezultiraju u defektu citokineze što je česta pojava u ljudskim malignim tumorima (124). Bitan je za organizaciju dezmosoma, specifičnu epitelnu arhitekturu i homeostazu (121). p0071 dolazi u interakciju s Rab11a (GTP-aza) te na taj način utječe na proces recikliranja 'carga' proteina, dok Rab11a kontrolira međustaničnu adheziju preko kontrole recikliranja p0071 i E- kadherina (deplecija Rab11a utječe na pojačano recikliranje p0071 što korelira s pojačanom međustaničnom adhezijom) (125). Vođene su brojne rasprave o točnoj lokalizaciji p0071. U studiji provedenoj od strane Hofmann I. et al. pokazano je da p0071 nije prisutan u dezmosomima, ali da je prisutan u adherentnim spojevima različitih tipova epitela i vaskularnog endotela, u kompozitnim spojevima, spojevima kardiomiocita, u različitim tipovima staničnih kultura te da je rijetko prisutan ili odsutan tkivima kao što su skeletni i glatki mišići, stanica mezenhima, kao i u specifičnim stanicama bogatim dezmosomima poput gornjih slojeva epidermisa, drugih stratificiranih epitela i Hassallovim tjelešcima timusa te je predložen kao specifični

marker tipa stanica (121). Još uvijek postoje kontroverze oko prisutnosti p0071 u dezmosomima (126), no zasigurno je ovaj protein prisutan u adherentnim spojevima i citoplazmi (119,126,127).

1.5.4 Plakofilin 3 (PKP 3) je protein molekularne mase 87 kDa, a prisutan je u dezmosomima svih slojeva stratificiranog epitela i u skoro svim jednostavnim epitelima (128). Član je p120^{ctn}/ plakofilin podobitelji β - katenina (CTNNB1) i armadillo (ARM) proteina (103). Kodira ga 2.8 kb mRNA te je građen od 10 "armadillo- like" ponavljanja, amino- terminalne regije od 293 ostataka aminokiselina i kratke karboksi- terminalne regije od 27 ostataka aminokiselina (90). Prisutan je u citoplazmi (stres granule, RNA čestice), membrani (dezmosomalni plak dezmosoma), no njegova prisutnost u jezgri je također opažena (128). Izostaje u stanicama sarkoma, fibroblasta, kardiomiocita i hepatocita (90). U odnosu na ostale plakofiline, ima najveću mogućnost vezanja na ostale komponente dezmosoma. Veže se na dezmosteine, dezmostolin, plakoglobin, dezmostalin i keratin 18 (102), na neke RNA vežuće proteine (PABPC1, FXR1, G3BP) i proteine vezane uz 'trafficking' vezikula kao što je dynamin 1- like protein (103). Važan je u staničnoj adheziji, ima ulogu u stres granulama (predstavljaju zastojne translacijske komplekse, a razvijaju se kao odgovor na stresne uvjete okoliša), moguće je da ima i ulogu u apoptozi stanica. Smatra se s obzirom na dosadašnje spoznaje da PKP 3 može unaprijediti ali i suprimirati tumorigenezu te da je uključen u epitelno-mezenhimalnu tranziciju (proces koji karakterizira skup složenih i usklađenih molekularnih promjena koje dovode do promjene ponašanja stanica, odnosno razvoj mezenhimalnog fenotipa što omogućuje stanicama da invadiraju i cirkuliraju u krvi do mjesta razvoja metastaza) što je važno u metastaziranju tumora (83,102,129). Osim ovih uloga, smatra se i da ima ulogu u signalnim putevima između plazma membrane i jezgre (90). Plakofilin 3 je ključan za strukturu i funkciju dezmosoma tako da njegova smanjena ekspresija dovodi do smanjenja veličine dezmosoma, smanjenja adhezije i povećane sposobnosti migracije stanica (130). Utječe na angažiranje i prijenos dezmosomalnih proteina do stanične membrane i započinjanja formiranja dezmosoma (131). U transkripciji i translaciji, plakofilin 3 se veže uz ribonukleoproteinske čestice koje sadrže zastojne inicijacijske translacijske komplekse (107). U vodozemaca je plakofilin 3 bitan za njihov razvoj, odnosno za adekvatan razvoj ektoderma i neurološkog sustava (103). Prema dosadašnjim istraživanjima, plakofilin 3 u normalnim tkivima i tkivima tumora pokazuje različite uzorke ekspresije. Većina se dosadašnjih

studija dosad fokusirala se na ekspresiju plakofilina 3, ali i ostalih tipova plakofilina, u tumorima i na korelaciju ekspresije i prognoze tumora (83), s obzirom da se traga za potencijalnom ciljnom molekulom koja bi pridonijela uspješnijem liječenju malignih tumora. Vezano uz izraženost plakofilina 3 u malignim novotvorinama, dosad je primijećeno da je u slučaju adenokarcinoma želuca smanjena imunoreaktivnost vezana uz veći broj metastatski pozitivnih limfnih čvorova i višim stadijem tumora (91), u karcinomu mokraćnog mjehura smanjena ekspresija plakofilina 3 smatra se vezanom uz veću invazivnost tumora (99), kod primarnih orofaringealnih tumora, smanjena imunoreaktivnost plakofilina 3 povezana s lošijim preživljenjem pacijenata (123), u adenokarcinomu prostate povećana ekspresija upućuje na tumor agresivnijih karakteristika (127), kod pacijenata s karcinomom pluća ne- malih stanica povećana ekspresija plakofilina 3 upućuje na agresivniji tumor (130). Kod adenokarcinoma dojke povećana imunoreaktivnost plakofilina 3 povezana je s višim tumorskim gradusom i većim brojem metastatski pozitivnih limfnih čvorova (132). U slučaju pacijenata s malignim tumorima gastrointestinalnog sustava detektirane su povišene razine plakofilin 3 mRNA u krvi te su korelirale s uznapređovalim stadijima bolesti, pT3-4, metastatskom bolesti i rezidualnom bolešću te je prisutnost plakofilin 3 mRNA u krvi vezana uz rizik od progresije tumora i smrti (102). Posljedično činjenici da je plakofilin 3 posljednji otkriveni član obitelji plakofilina još uvijek se malo zna o njegovim funkcijama kao i o njegovim funkcionalnim staničnim i molekularnim interakcijama (87).

1.6 Međustanični spojevi

Za održanje arhitekture tkiva ključni su međustanični spojevi koji uključuju dezmosome (međustanični adhezivni spojevi) (133), adherentni spojevi (transmembranske strukture koje se povezuju s aktinskim citoskeletom) (133), "tight junctions" (područja bliskih kontakata između plazma membrana) (134) i "gap junctions" (spojevi formirani od 2 hemikanala koji omogućuju komunikaciju između susjednih stanica (133,134,135). Svaki od međustaničnih spojeva je građen od složenih mreža proteina (133). Uloge ovih spojeva su raznolike i mnogostruke (133). Jedna od tih uloga je i regulacija adhezije između epitelnih stanica koja je bitna za funkciju i građu normalnog tkiva te gubitak te adhezije ili poremećaj njezine regulacije dovodi do brojnih patoloških poremećaja tkiva i organizma (122,133). S obzirom da međustanični spojevi omogućuju epitelu da funkcionira kao usklađeno tkivo, podliježu dinamičkoj regulaciji i remodeliranju tijekom rasta i razvoja, kao odgovor na ozljedu, ali

i tijekom normalne homeostaze tkiva. Adherentni spojevi povezuju susjedne epitelne stanice s aktinskim citoskeletom, a dezmosomi ih vežu na intermedijarne filamente. Povezanost proteina citoskeleta na strukture važne za staničnu adheziju i kontakt tih struktura za drugu stanicu bitan je za stabilnost stanica i tkiva (131). Osim strukturne uloge, stanični spojevi sudjeluju i u staničnoj signalizaciji te se njihova uloga u patogenezi malignih tumora sve više prepoznaje (126). Također, važni su i u procesima stanične migracije, proliferacije, kao i samom razvoju i diferencijaciji stanica i tkiva (133).

1.6.1 Dezmosomi

Dezmosomi (*maculae adhaerentes*) su epitelni adherentni spojevi bitni u adheziji stanica, kao i u provođenju signala (90). Prvi puta su vizualizirani od talijanskog patologa Bizzozera 1864. godine (135). Dezmosomalni spojevi imaju važnu ulogu u staničnoj i tkivnoj arhitekturi, razvoju, diferencijaciji i stabilnosti tkiva. Predstavljaju dinamične strukture te podliježu kontinuiranom obnavljanju koji uključuje brzu sintezu i degradaciju što je bitno za homeostazu epidermisa (136). Ključni su tijekom embriogeneze za razvrstavanje stanica, odnosno za formiranje tkiva i organa (137). Njihovo sastavljanje ovisi o promjenama signalizacije koje se javljaju tijekom diferencijacije tkiva, cijeljenja rana i patogeneze bolesti (87). Dezmosomi su prisutni u svim epitelnim tkivima kao i u tumorima epitelnog porijekla, ali i u neepitelnim tkivima kao što su stanice srčanog mišića. Smješteni su simetrično te su oblika diska. S obzirom na ultrastrukturnu građu, sastoje se od 2 glavne domene: a) "extracellular core domain" (desmoglea) koju karakterizira širina od oko 30 nm, a sastavljena je od izvanstaničnih domena dezmokolina, dezmogleina (transmembranski glikoproteini kadherin super-obitelji međustaničnih adhezijskih molekula), b) simetričnih citoplazmatskih plakova paralelno smještenih s plazma membranom. Svaki plak se sastoji od vanjskog gustog plaka te od unutarnjeg gustog plaka u kojeg se umeću intermedijarni filamenti. Citoplazmatski gusti plakovi građeni su od citoplazmatskih repova glikoproteina uključujući dezmoplakine I i II, plakoglobin i plakofilin (138). Putem proteina dezmosomalnog plaka vežu se intermedijarni filamenti na dezmosomalne kadherine i to na citoplazmatskoj strani plazma membrane (131,139). Dezmosomalni kadherini (dezmogleini, dezmokolini) smješteni na priležećim stanicama su medijatori međustaničnih veza putem interakcija njihovih izvanstaničnih domena (83). Dezmoplakin se veže uz plakoglobin preko N terminalne domene, dok se putem

C terminalne domene veže uz intermedijarne filamente te na taj način povezuje dezmosome uz citoskelet (120). Intermedijarni filamenti tvore mrežu filamenata koja vezana uz dezmosome povećava mehaničku stabilnost stanice (138). Intermedijarni filamenti su važna komponenta citoskeleta koja daje oblik i rigidnost stanicama te su građeni od tipa 1 (K9- K28) i tipa 2 (K1- K8, K71- K74) keratina. Vrsta keratina je tkivno specifična i ovisna o diferencijaciji, primjerice jednostavni epitel izražava K8 i K18, dok stratificirani epitel ima K5 i K14 u bazalnom sloju (139). Važnu ulogu u građi dezmosoma imaju i plakofilini. Stabiliziraju dezmosomalne kadherine te utječu na mobiliziranje dezmozoplakina kao veznog proteina intermedijarnih filamenata što poboljšava interakciju dezmosoma s citoskeletom (93). Dok je plakofilin 3 široko

izražen u svim dezmosomima, plakofilin 1 i 2 se najčešće nalaze u jednostavnom i stratificiranom epitelu (120). Iako je građa dezmosoma dobro poznata i istraжена, mehanizmi njihovog formiranja još uvijek su slabo razjašnjeni (140). U formiranju dezmosoma važnu ulogu imaju plakofilin 2 i 3. Započinju prijenos dezmozoplakina prema mjestima staničnih kontakata, zatim plakofilin 3 putem aktivacije Rap1 GTP-aze utječe na sastavljanje citoplazmatskih prekursora dezmosoma, a plakofilin 2 preko utjecaja na aktivnost PKC i RhoA omogućuje njihov prijenos do membrane, odnosno mjesta međustaničnih kontakata (87). Smatra se da je plakofilin 1 važan u određivanju veličine i organizaciji dezmosoma s obzirom da utječe na mobiliziranje dezmosomalnih proteina do plazma membrane (120,141). Mutirani plakofilini ne podliježu postranslacijskoj lipidnoj modifikaciji palmitoilacije što onemogućava adekvatan položaj komponenata dezmosoma te time smanjuje adheziju dezmosoma (140). Uz smanjenu adheziju stanica javlja se i neučinkovita međustanična komunikacija i regulacija kao i neodgovarajući razvoj tkiva što u konačnici rezultira poremećajima tkiva, posebice onih koji su izloženi mehaničkom stresu, kao što su srce i koža, odnosno pojavom nasljednih, autoimunih te infektivnih poremećaja (87,135). Gubitak plakoglobina u miševa rezultira smrću embrija zbog smanjene međustanične adhezije kardiomiocita. U Naxos bolesti (ARVC, palmoplantarna keratoderma, kosa poput vune) opisan je poremećaj plakoglobina koji dovodi do neodgovarajuće međustanične adhezije. Miševi bez ekspresije dezmozoplakina u koži pokazuju defekte u formiranju epitela. U osoba s palmoplantarnom keratodermom kao i generaliziranom keratodermom opažena je mutacija dezmozoplakina koja je dovela do slabljenja međustaničnih veza, pojave rudimentarnih dezmosoma i disrupcije interakcija dezmosoma i keratina (120). Uloga dezmosoma u slučaju malignih tumora još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, no ustanovljene su promjene ekspresije komponenata dezmosoma u različitim tipovima

malignih novotvorina, kao što je promjena ekspresije plakofilina u primjerice karcinomu pluća, prostate, zatim smanjena razina dezmozolina 2 i 3 u kolorektalnom i karcinomu dojke te smanjena ekspresija dezmozolina u orofaringealnim tumorima, dok kod nekih malignih tumora prisutnost promjena razine ekspresije dezmosomalnih proteina nije primijećena (135). Iako se provode istraživanja vezana uz strukturu i funkciju dezmosoma, još uvijek su smatrani entitetom koji zahtijevaju daljnje proučavanje njihovih interakcija i funkcije (137).

1.6.2 SVRHA RADA

Kao svrha ovog rada određeno je ispitivanje izraženosti proteina plakofilina 3 u membrani i citoplazmi uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma u 3 glavna tipa (epiteloidni, sarkomatoidni, bifazični) i u podtipovima epiteloidnog mezotelioma nakon podjele uzoraka u navedene kategorije prema dijagnozi s obzirom na prevladavajuću histološku komponentu, zatim ispitivanje povezanosti te izraženosti s histološki procijenjenom invazivnošću mezotelioma, kao i ispitivanje prognostičke vrijednosti plakofilina 3 u slučaju difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.

2. HIPOTEZA

Ekspresija plakofilina 3 je pojačana u uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma u odnosu na zdravi mezotel te postoji povezanost te ekspresije s histološki verificiranom invazijom tumora u vezivno tkivo u odnosu na invaziju u masno tkivo, miškulaturu ili plućevinu te kraćim preživljenjem bolesnika.

3. CILJEVI RADA

S obzirom na dosadašnja istraživanja u različitim tipovima tumora koja pokazuju da je promjena ekspresije plakofilina 3 vezana uz biološke karakteristike tumora i preživljenje pacijenata te da je u različitim vrstama tumora ekspresija plakofilina 3 nepredvidiva, odnosno pojačana ili smanjena ekspresija može biti vezana uz agresivnije ponašanje tumora i imati negativan utjecaj na preživljenje, u ovom radu će se ispitati ekspresija i prognostička vrijednost plakofilina 3 u uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.

Kao ciljevi ovog rada određeni su:

- a. klasificirati uzorke difuznog malignog pleuralnog mezotelioma u 3 glavna tipa te u podtipove epiteloidnog mezotelioma prema prevladavajućoj histološkoj komponenti
- b. ustanoviti odnos imunohistokemijski identificirane ekspresije plakofilina 3 prema histološkom tipu
- c. prikazati izražaj plakofilina 3 s obzirom na histološki procijenjeno širenje u vezivo, odnosno mast, skeletni mišić i/ ili plućevinu
- d. odrediti postoji li prognostička vrijednost izražaja plakofilina 3 u pregledanim uzorcima DMPM-a

4. BOLESNICI I METODE

4.1 Uzorci

U ovom istraživanju upotrijebljen je arhivski materijal iz Zavoda za patologiju, Šalata 10, Zagreb, odnosno uzorci tkiva fiksirani u formalinu te uklopljeni u parafin. Korišteni su biopsati ili operativni uzorci tkiva 100 bolesnika s utvrđenom dijagnozom difuznog malignog pleuralnog mezotelioma u razdoblju od 1999. do 2009. godine. Kao kontrolna skupina upotrijebljeno je 5 uzoraka tkiva zdrave pleure dobivenih prilikom obdukcije pacijenata bez poznate plućne ili pleuralne patologije. Uzorci zdrave pleure dobiveni su iz arhive Zavoda za patologiju, Šalata 10, Zagreb. Podaci o bolesnicima prikupljeni su iz arhive navedenog Zavoda, dok su podaci o datumu smrti prikupljeni iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Rockefellerova 7, Zagreb. U istraživanju nisu korišteni osobni podaci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost pacijenata.

4.2 Metode

U svrhu klasifikacije tumora u 3 glavna tipa (epiteloidni, sarkomatoidni, bifazični) malignog mezotelioma i podtipove epiteloidnog, kao i procjenu invazije tumora pregledani su histološki rezovi prikupljenih uzoraka obojenih hemalaun - eozinom. Nakon toga obavljena je priprema tkiva za imunohistokemijsko bojenje.

4.2.1 Imunohistokemija

U ovom radu iz parafinskih blokova učinjeni su rezovi od 3- 4 μm , zatim su uslijedile deparafinizacija i predigestija u termo kupelji (DAKO, Danska) uz primjenu EnVision target retrieval solution (DAKO, Danska). Imunohistokemijsko bojenje učinjeno je koristeći automatizirani imunohistokemijski sistem (DAKO autostainer, DAKO, Danska).

U svrhu imunohistokemijskog bojenja korišteno je Anti-Plakophilin 3 protutijelo (zečje monoklono, IgG1, EPR5560, ab 109441, Abcam, Cambridge, Velika Britanija) u razrijeđenju 1: 100. Za detekciju izražaja imunohistokemijskog bojenja korištena je indirektna Avidin biotin kompleks tehnika (EnVision detection kit , DAKO, Danska). Zatim je uslijedilo provlačenje kroz uzlazni niz alkohola (od 70% do 100%), ksilol i

pokrivanje stakala. Kao pozitivna kontrola upotrijebljeno je tkivo ljudske dojke uklopljeno u parafin (arhiva Zavoda za patologiju, Šalata 10, Zagreb). Za obojenje jezgara korištena je otopina hematoksilina (Thermo Scientific Shandon hematoxylin, USA).

Na pripremljenim preparatima procjenjivao se intenzitet imunohistokemijskog bojenja citoplazme i membrane na cijelim histološkim rezovima od strane 2 patologa i autora rada. Rezultati procjene stupnjevani su kao 0 (nema obojenja), 1 (slabo), 2 (srednje jako), 3 (jako obojenje), 4 (izrazito jako). Stupnjevanje intenziteta obojenja odabrano je prema rezultatima našeg preliminarnog istraživanja ekspresije plakofilina 3 u uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.

Intenzitet imunohistokemijskog bojenja procjenjivali smo koristeći mikroskop Olympus BX50. Procjena se temeljila na pregledu čitavog preparata objektivom povećanja 40x.

4.2.2 Statistička analiza podataka

U statističkoj analizi podataka koristili smo program SPSS 20.0. Analiza preživljenja učinjena je pomoću Kaplan- Meier krivulja. Kako bi se utvrdile razlike u preživljenju između krivulja učinjeni su Log Rank, Breslow i Tarone- Ware test. Kruskal- Wallis test korišten je za usporedbu intenziteta citoplazmatske i membranske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma, analizu duljine preživljenja s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima, analizu preživljenja između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma, usporedbu intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog i membranskog bojenja s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima, analizu odnosa c/m omjera i dana preživljenja u svim uzorcima i podtipovima mezotelioma. Spearmanov test korišten je kako bi se istražila korelacija između intenziteta citoplazmatskog i membranskog bojenja u svim uzorcima i preživljenje. Mann- Whitney test upotrijebljen je za usporedbu duljine preživljenja između spolova u svim uzorcima, analizu između izloženosti azbestu i duljine preživljenja u svim uzorcima, odnos izloženosti azbestu i dobi u vrijeme otkrivanja bolesti, odnos intenziteta citoplazmatske te membranske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima, odnos histološki procijenjenog širenja u vezivo te mast, skeletni mišić i/ili plućevinu i duljine preživljenja u svim uzorcima, citoplazmatske i membranske plakofilin 3 izraženosti i širenja u vezivo te mast, skeletni mišić i/ili plućevinu u svim uzorcima i podtipovima mezotelioma. Hi kvadrat korišten je za utvrđivanje odnosa između izloženosti azbestu te povezanosti c/m omjera i širenja tumora u vezivo te mast, skeletni mišić i/ili plućevinu u svim uzorcima i podtipovima mezotelioma. Statistički značajnima su smatrani rezultati ukoliko je vrijednost p iznosila $<0,05$.

5. REZULTATI

5.1 BOLESNICI

U tablici 1 prikazane su kliničke i patohistološke osobitosti uzoraka dobivenih od 97 bolesnika s difuznim maligim pleuralnim mezoteliomom.

Tablica 1. Kliničke i patohistološke osobitosti uzoraka

	dob	spol	dijagnoza	klinički stadij	preživljenje (dani)	izloženost azbestu	histološki procijenjeno širenje	PKP3 citoplazma	PKP3 membrana
1.	47	m	solidni	IV	15	DA	M/S	4	4
2.	48	m	trabekularni	IV	161	NE	V	1	1
3.	62	m	mikroglandularni	nema podatka	743	nema podatka	V	2	1
4.	53	m	nije određen podtip	III	366	nema podatka	M/S	4	3
5.	58	m	tubularni	II	560	nema podatka	M/S	4	3
6.	72	m	tubulopapilarni	IV	1122	DA	M/S	3	3
7.	60	m	mikrocistični	nema podatka	345	nema podatka	V	2	2
8.	46	m	sarkomatoidni	IV	169	NE	V	2	2
9.	51	m	tubularni	IV	857	DA	V	2	0
10.	47	m	solidni	IV	402	nema podatka	M/S	4	4
11.	72	m	mikrocistični	nema podatka	756	nema podatka	V	2	2
12.	80	m	tubulopapilarni	IV	845	nema podatka	V	2	2
13.	72	m	tubulopapilarni	III	170	DA	M/S	3	4
14.	44	m	tubulopapilarni	II	236	nema podatka	M/S	2	2
15.	76	m	tubulopapilarni	IV	85	nema podatka	M/S	2	3
16.	67	m	trabekularni	nema podatka	3010	nema podatka	M/S	2	4
17.	61	m	solidni	IV	171	nema podatka	M/S	2	2
18.	71	m	sarkomatoidni	IV	107	nema podatka	M/S	3	0
19.	63	m	solidni	IV	287	NE	M/S	2	3
20.	59	m	solidni	II	519	NE	V	2	0
21.	71	m	nije određen podtip	IV	86	DA	M/S	2	4
22.	63	m	trabekularni	nema podatka	262	nema podatka	V	2	3
23.	39	m	tubulopapilarni	III	175	DA	V	4	2
24.	62	m	pleomorfni	IV	11	DA	M/S	2	2
25.	62	m	trabekularni	III	178	NE	M/S	4	2
26.	61	m	solidni	IV	721	DA	M/S	4	4
27.	53	m	tubulopapilarni	IV	892	NE	V	2	0
28.	73	ž	tubulopapilarni	III	1195	nema podatka	V	2	3
29.	50	m	trabekularni	IV	350	nema podatka	V	2	2

30.	66	m	mikropapilarni	IV	789	nema podatka	M/S	2	2
31.	37	m	tubulopapilarni	III	223	nema podatka	V	1	2
32.	64	m	trabekularni	nema podatka	967	nema podatka	V	2	2
33.	46	m	tubulopapilarni	IV	691	DA	V	2	1
34.	65	m	tubulopapilarni	nema podatka	731	nema podatka	M/S	2	2
35.	76	m	trabekularni	IV	429	nema podatka	V	1	0
36.	62	m	tubulopapilarni	nema podatka	351	nema podatka	V	2	2
37.	76	m	tubulopapilarni	IV	232	nema podatka	M/S	3	4
38.	49	ž	solidni	IV	1741	NE	M/S	2	2
39.	45	ž	solidni	nema podatka	399	nema podatka	V	1	2
40.	63	m	tubularni	nema podatka	živ	nema podatka	M/S	3	1
41.	49	m	trabekularni	nema podatka	živ	nema podatka	M/S	4	4
42.	51	m	tubulopapilarni	IV	140	DA	V	2	2
43.	65	m	tubularni	IV	258	nema podatka	M/S	2	4
44.	51	ž	tubularni	IV	329	DA	V	2	4
45.	48	m	tubularni	III	851	DA	V	2	2
46.	70	ž	solidni	nema podatka	508	nema podatka	M/S	2	4
47.	50	m	tubularni	nema podatka	696	nema podatka	V	2	3
48.	59	m	solidni	nema podatka	614	nema podatka	M/S	4	1
49.	62	m	solidni	IV	296	NE	V	2	2
50.	63	m	tubulopapilarni	IV	1002	nema podatka	M/S	2	2
51.	80	m	tubularni	III	1103	nema podatka	M/S	4	2
52.	64	m	sarkomatoidni	II	227	DA	M/S	2	0
53.	62	m	acinarni	nema podatka	1017	nema podatka	V	1	2
54.	51	m	mikroglandularni	IV	548	nema podatka	V	2	2
55.	67	m	nije određen podtip	III	865	nema podatka	M/S	2	3
56.	79	ž	tubularni	III	366	DA	M/S	4	4
57.	72	m	solidni	III	835	nema podatka	V	3	4
58.	67	m	nije određen podtip	IV	1710	DA	M/S	3	4
59.	71	m	trabekularni	IV	275	DA	M/S	3	2
60.	58	m	solidni	nema podatka	353	nema podatka	V	3	4
61.	49	m	tubulopapilarni	IV	81	nema podatka	V	4	4
62.	27	m	tubulopapilarni	IV	501	nema podatka	M/S	3	4
63.	59	m	tubulopapilarni	IV	453	DA	M/S	4	2
64.	68	ž	trabekularni	III	246	nema podatka	M/S	2	2
65.	55	m	tubulopapilarni	IV	273	nema podatka	V	2	2
66.	68	m	solidni	IV	213	DA	V	2	2
67.	73	m	sarkomatoidni	nema podatka	575	nema podatka	V	2	2

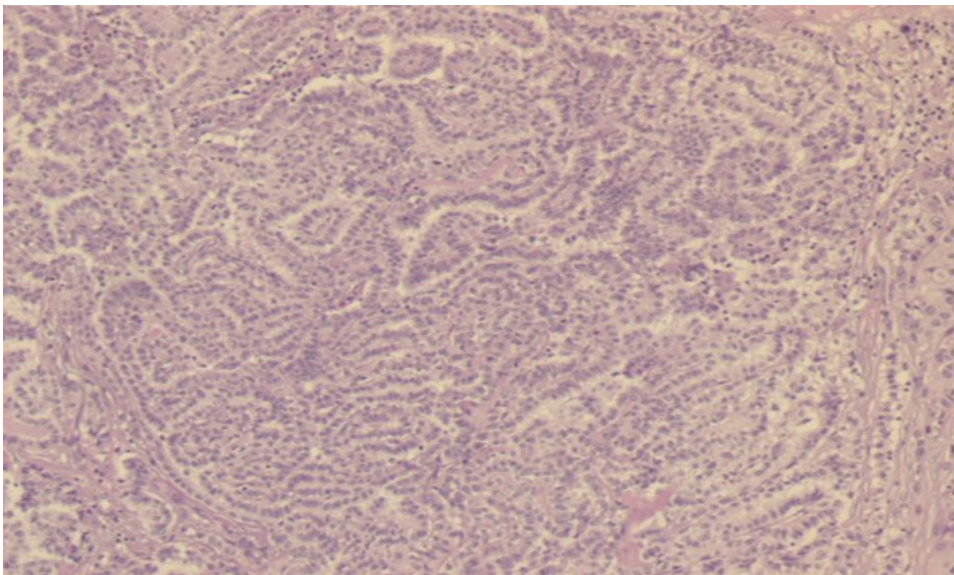
68.	58	m	trabekularni	IV	592	NE	M/S	2	2
69.	57	m	trabekularni	III	581	nema podatka	V	2	2
70.	70	m	solidni	IV	82	nema podatka	V	2	3
71.	63	m	solidni	III	733	nema podatka	V	1	1
72.	71	m	trabekularni	IV	74	nema podataka	V	1	2
73.	63	m	mikropapilarni	IV	živ	NE	V	1	2
74.	69	m	trabekularni	III	535	nema podatka	M/S	2	2
75.	51	ž	solidni	IV	148	nema podatka	V	3	3
76.	59	m	sarkomatoidni	IV	360	DA	V	0	0
77.	52	m	trabekularni	IV	živ	nema podatka	M/S	3	2
78.	68	m	tubulopapilarni	III	428	DA	M/S	3	3
79.	72	m	tubulopapilarni	IV	1044	nema podatka	V	3	3
80.	62	m	bifazični	III	313	nema podatka	V	1	3
81.	40	ž	solidni	IV	45	nema podatka	V	2	2
82.	42	m	solidni	IV	živ	DA	V	1	1
83.	56	m	trabekularni	III	399	DA	V	2	2
84.	68	m	tubulopapilarni	IV	živ	NE	V	2	2
85.	72	m	tubularni	nema podatka	172	nema podatka	V	2	2
86.	78	m	solidni	IV	185	nema podataka	V	1	0
87.	55	m	tubulopapilarni	IV	437	nema podatka	V	2	2
88.	45	ž	solidni	IV	103	NE	M/S	2	2
89.	61	m	trabekularni	nema podatka	123	nema podatka	M/S	4	4
90.	53	ž	solidni	IV	živa	DA	V	4	4
91.	60	m	trabekularni	nema podatka	13	nema podatka	V	2	2
92.	65	m	trabekularni	nema podatka	živ	nema podatka	M/S	4	4
93.	77	m	trabekularni	nema podatka	90	nema podatka	M/S	2	1
94.	69	m	solidni	IV	216	DA	V	2	2
95.	57	ž	trabekularni	nema podatka	živa	nema podatka	M/S	3	4
96.	78	ž	solidni	IV	343	NE	M/S	2	4
97.	68	ž	trabekularni	III	živa	nema podatka	V	1	2

m- muški spol, ž- ženski spol, V- vezivno tkivo, M/S- mast i/ili skeletni mišić

U istraživanju je upotrijebljeno 100 uzoraka tkiva pacijenata s dijagnozom difuznog malignog pleuralnog mezotelioma (zbog tehničke neadekvatnosti nakon imunohistokemijske obrade 3 uzorka su isključena iz analize te je obrađeno 97 uzoraka). 83 pacijenta bila su muškog spola, 14 ženskog. Raspon dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze kretao se između 27 i 80 godina. Ukupno je 87 pacijenata umrlo, dok ih je 10 živo. Preživljenje pacijenata od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti kretalo se od 11- 3010 dana. Korišteno je 91 uzoraka epiteloidnog mezotelioma, 5 uzoraka sarkomatoidnog i 1 uzorak bifazičnog tipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Histološki procijenjeno širenje u vezivno tkivo pokazivala su 52 uzorka tumora, dok je kod 45 primijećeno širenje u masno tkivo i/ ili skeletni mišić. Od podtipova epiteloidnog mezotelioma solidnom podtipu pripadala su 24 uzorka, tubulopapilarnom 23, trabekularnom 22, tubularnom 10, mikroglandularnom 2, mikrocističnom 2, mikropapilarnom 2, acinarnom (glandularnom) 1, pleomorfnom 1, dok kod 4 uzorka podtip nije određen.

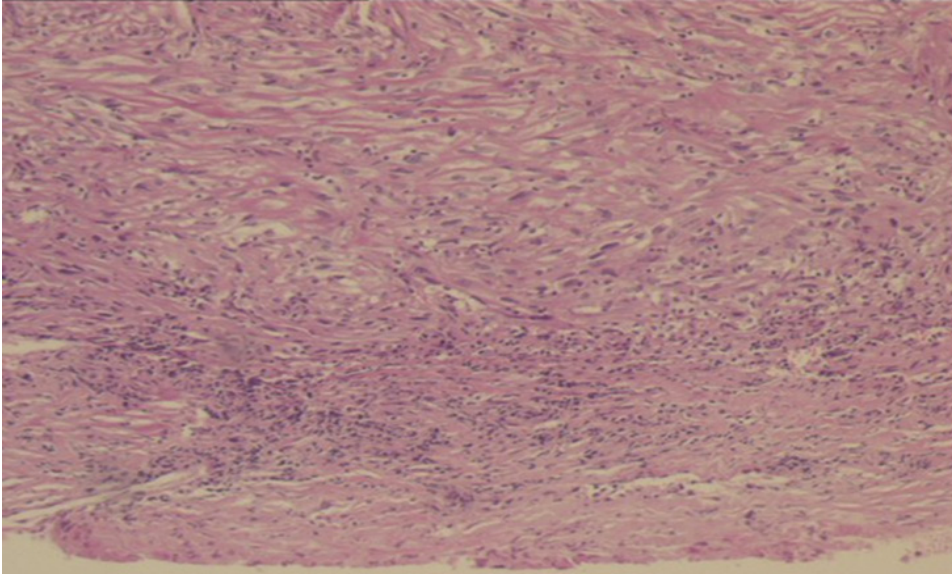
5.2 HISTOLOŠKI IZGLED 3 GLAVNA TIPA DIFUZNOG MALIGNOG PLEURALNOG MEZOTELIOMA

Slika 1 prikazuje epiteloidni tip difuznog malignog pleuralnog mezotelioma koji je histološki građen od kubičnih stanica koje oblažu tubularne prostore u koje se izbočuju resičaste strukture (2).



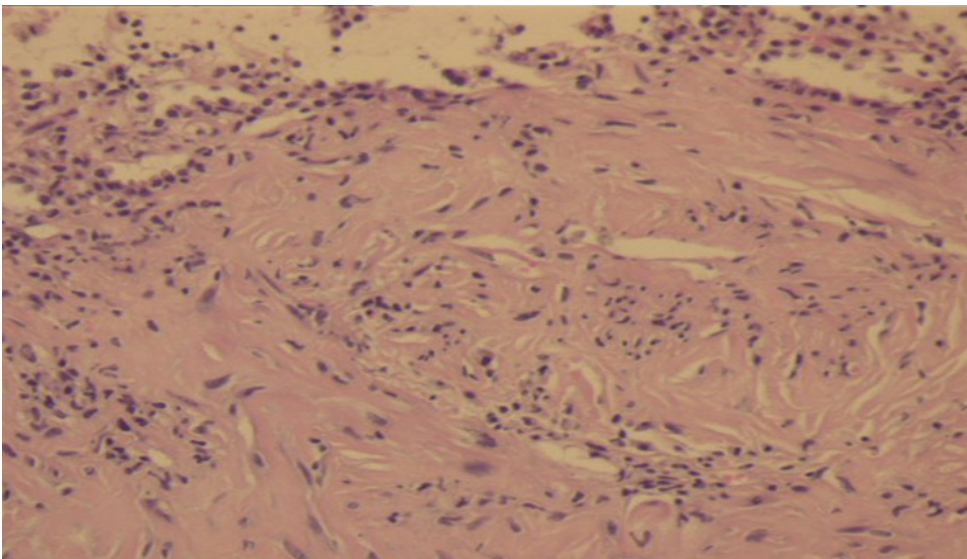
Slika 1. Epiteloidni tip DMPM-a (H&E, objektiv x 4)

Slika 2 prikazuje sarkomatoidni tip difuznog malignog pleuralnog mezotelioma histološki građenog od vretenastih stanica u storiformnom uzorku koji formira vijuge i snopove (2,11).



Slika 2. Sarkomatoidni tip DMPM-a (H&E, objektiv x 4)

Slika 3 prikazuje bifazični tip difuznog malignog pleuralnog mezotelioma histološki građenog od epiteloidnih i sarkomatoidnih područja (2,11,81).



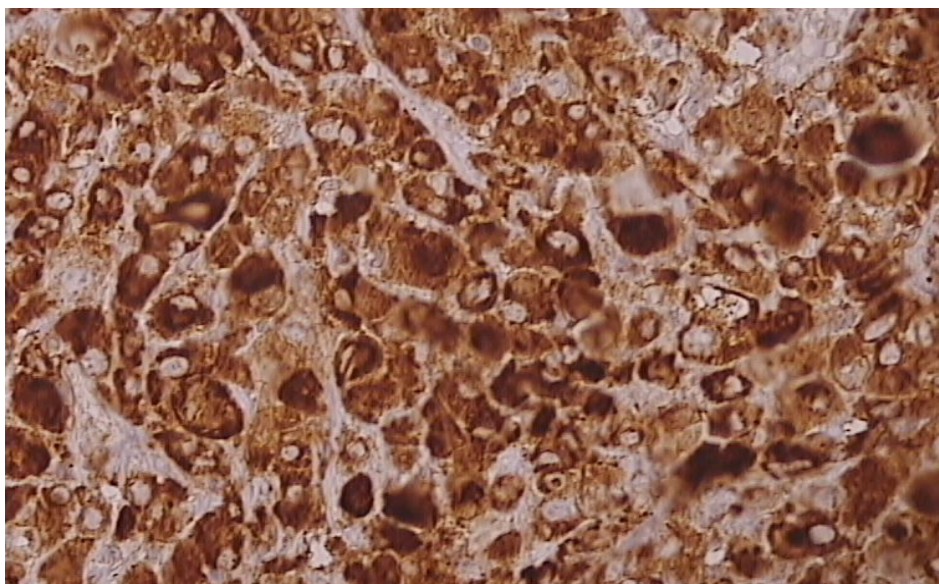
Slika 3. Bifazični tip DMPM-a (H&E, objektiv x 4)

5.3 IZRAŽENOST PLAKOFILINA 3 U DIFUZNOM MALIGNOM PLEURALNOM MEZOTELIOMU

Imunohistokemijsko bojenje procjenjivano je prema intenzitetu citoplazmatske i membranske reakcije na cijelom preparatu te izraženo semikvantitativno.

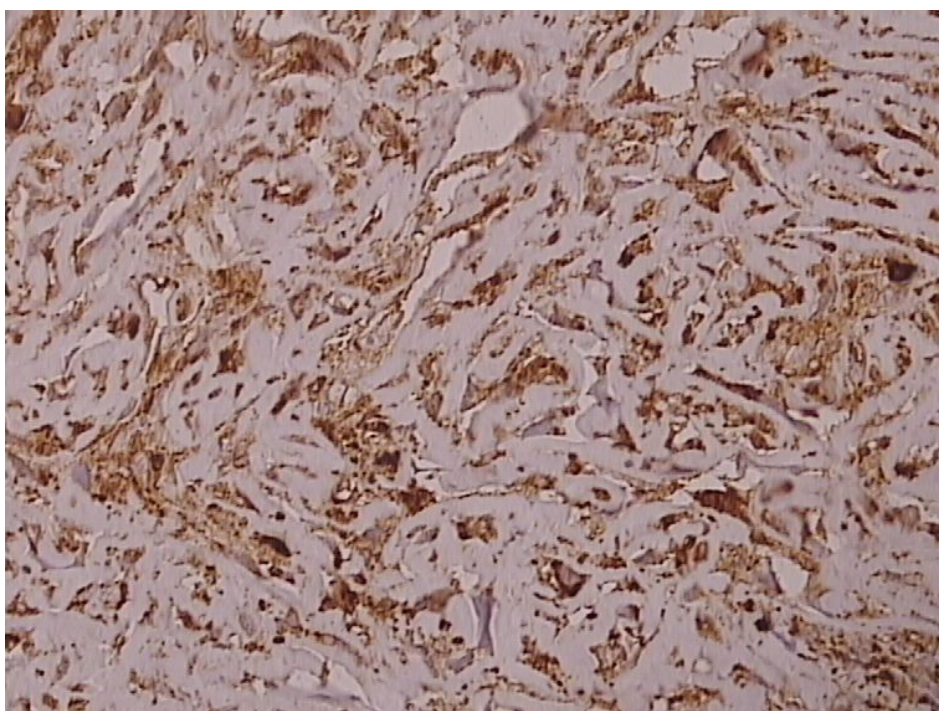
5.3.1 Izraženost plakofilina 3 u glavnim tipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Uzorke smo podijelili u 3 glavna tipa tumora: epiteloidni, sarkomatoidni, bifazični. U epiteloidnom tipu difuznog malignog pleuralnog mezotelioma 11 uzoraka pokazivalo je citoplazmatsko bojenje intenziteta 1, 48 intenziteta 2, 13 intenziteta 3, a 15 intenziteta 4. Citoplazmatsko bojenje je bilo prisutno u svim uzorcima epiteloidnog mezotelioma. Također je procjenjivano i membransko bojenje te je 20 uzoraka epiteloidnog mezotelioma pokazivalo reakciju intenziteta 4, 11 intenzitet 3, 43 intenzitet 2 te 8 uzoraka intenzitet bojenja 1. Membransko bojenje nije bilo prisutno u 5 uzoraka. Na slici 4 prikazana je citoplazmatska reakcija intenziteta 4 u tumorskim stanicama epiteloidnog tipa, solidni podtip difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.



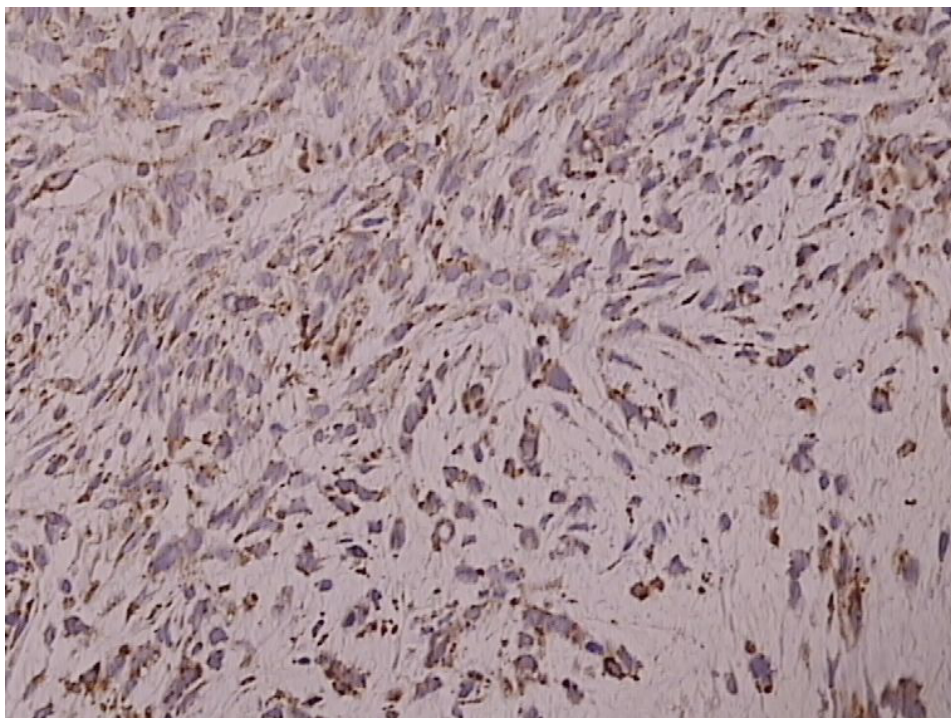
Slika 4. Plakofilin 3 u citoplazmi epiteloidnog tipa, solidni podtip DMPM-a, intenzitet 4 (plakofilin 3, IH, objektiv x40)

U sarkomatoidnom tipu difuznog malignog pleuralnog mezotelioma 3 uzorka pokazivala su citoplazmatsko bojenje na plakofilin 3 intenziteta 2, dok je u 1 uzorku intenzitet bojenja iznosio 3. Citoplazmatsko bojenje je izostalo u 1 uzorku. Također je procjenjivano i membransko bojenje te je u 2 uzorka intenzitet bojenja iznosio 2. Membransko bojenje nije bilo prisutno u 3 uzorka. Na slici 5 prikazana je citoplazmatska reakcija intenziteta 2 u tumorskim stanicama sarkomatoidnog tipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.



Slika 5. Plakofilin 3 u citoplazmi sarkomatoidnog tipa DMPM-a, intenzitet bojenja 2 (plakofilin 3, IH, objektiv x40)

U 1 uzorku bifazičnog tipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma pokazano je žarišno citoplazmatsko bojenje na plakofilin 3 intenziteta 1, te membransko bojenje intenziteta 3. Na slici 6 prikazana je žarišna citoplazmatska i membranska reakcija u tumorskim stanicama bifazičnog tipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.



Slika 6. Plakofilin 3 imunopozitivnost u membranama tumorskih stanica i žarišna citoplazmatska imunopozitivnost u bifazičnom tipu DMPM-a (plakofilin 3, IH, objektiv x40).

Tablica 2 prikazuje usporedbu intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma. Skupina 4 (tubularni) pokazuje najveću prosječnu vrijednost intenziteta citoplazmatskog bojenja 2,70 dok skupina 2 (trabekularni) pokazuje najmanju vrijednost 2,32. Statističkom analizom dobivena je vrijednost $p=0,683$, odnosno nije nađena statistička značajnost te nema razlike u citoplazmatskoj izraženosti plakofilina 3 između analiziranih podtipova.

Tablica 2. Usporedba intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni

Statistika grupa								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
1,00	24	2,3750	1,01350	,20688	1,9470	2,8030	1,00	4,00
2,00	22	2,3182	,99457	,21204	1,8772	2,7592	1,00	4,00
3,00	23	2,4783	,79026	,16478	2,1365	2,8200	1,00	4,00
4,00	10	2,7000	,94868	,30000	2,0214	3,3786	2,00	4,00
ukupno	79	2,4304	,92934	,10456	2,2222	2,6385	1,00	4,00

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a (medijan)	75-a
Citoplazma	79	2,4304	,92934	1,00	4,00	2,0000	2,0000	3,0000
Dijagnoza	79	2,2405	1,02801	1,00	4,00	1,0000	2,0000	3,0000

1- solidni, 2- trabekularni, 3- tubulopapilarni, 4- tubularni

	Citoplazma
Hi- kvadrat	1,495
Df	3
p vrijednost	,683

Kruskal- Wallis test, $p= 0,683$

Tablica 3 prikazuje usporedbu intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epitelioidnog mezotelioma. Skupine 1 (solidni) i 4 (tubularni) imaju najveću prosječnu razinu intenziteta membranskog obojenja 2,50 a skupina 2 (trabekularni) najmanju 2,32. Statističkom analizom dobivena je vrijednost $p=0,905$, odnosno nije nađena statistička značajnost te nema razlike u membranskoj izraženosti plakofilina 3 između analiziranih podtipova.

Tablica 3. Usporedba intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 između 4 podtipa epitelioidnog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni

Statistika grupa								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
1,00	24	2,5000	1,31876	,26919	1,9431	3,0569	,00	4,00
2,00	22	2,3182	1,08612	,23156	1,8366	2,7997	,00	4,00
3,00	23	2,4348	,99206	,20686	2,0058	2,8638	,00	4,00
4,00	10	2,5000	1,35401	,42817	1,5314	3,4686	,00	4,00
ukupno	79	2,4304	1,15118	,12952	2,1725	2,6882	,00	4,00

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
Membrana	79	2,4304	1,15118	,00	4,00	2,0000	2,0000	4,0000
Dijagnoza	79	2,2405	1,02801	1,00	4,00	1,0000	2,0000	3,0000

1- solidni, 2- trabekularni, 3- tubulopapilarni, 4- tubularni

	Membrana
Hi- kvadrat	,561
Df	3
p vrijednost	,905

Kruskal -Wallis test, $p= 0,905$

5.4 ANALIZA PREŽIVLJENJA U GLAVNIM TIPOVIMA DIFUZNOG MALIGNOG PLEURALNOG MEZOTELIOMA I PODTIPOVIMA EPITELOIDNOG MEZOTELIOMA

Tablica 4 prikazuje usporedbu duljine preživljenja u danima između spolova u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Prosječni broj dana preživljavanja muškaraca je iznosio 490,49 uz standardnu devijaciju 444,05, dok je prosječni broj dana preživljavanja žena je iznosio 493,00 uz standardnu devijaciju 515,53. Statističkom obradom ovih podataka nije nađena statistički značajna p vrijednost.

Tablica 4. Usporedba duljine preživljenja u danima između spolova u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa					
	spol	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
Preživljenje (dani)	1	76	490,4868	444,05235	50,93630
	2	11	493,0000	515,53196	155,43873

1- muški spol, 2- ženski spol

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
Preživljenje (dani)	87	490,8046	450,40653	11,00	3010,00	178,0000	360,0000	721,0000
Spol	87	1,13	,334	1	2	1,00	1,00	1,00

	Preživljenje (dani)
Mann-Whitney U	389,000
Wilcoxon W	455,000
Z	-,370
p vrijednost	,711

Mann-Whitney test, p= 0,711

Tablica 5 prikazuje usporedbu broja dana preživljenja s obzirom na klinički stadij bolesti u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Nije bilo pacijenata u stadiju 1 bolesti. Statistička značajnost nije nađena.

Tablica 5. Usporedba broja dana preživljenja s obzirom na klinički stadij bolesti u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna devijacija	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
					2	4		
3	18	531,2222	325,89543	76,81429	369,1582	693,2862	170,00	1195,00
4	46	431,9783	407,14570	60,03036	311,0709	552,8856	11,00	1741,00
ukupno	68	455,5147	376,73145	45,68540	364,3263	546,7031	11,00	1741,00

2-stadij 2, 3- stadij 3, 4- stadij 4

Deskriptivna statistika

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
						Preživljenje (dani)	68	455,5147
Stadij	74	3,64	,587	2	4	3,00	4,00	4,00

	Preživljenje (dani)
Hi- kvadrat	,581
df	2
p vrijednost	,748

Kruskal- Wallis test, p= 0,748

Tablica 6 prikazuje odnos između izloženosti azbestu i duljini preživljenja u danima u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Prosječni broj dana preživljavanja nakon otkrivanja bolesti kod osoba izloženih azbestu bio je 446,14 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 407,41 dana, dok je prosječni broj dana preživljavanja nakon otkrivanja bolesti kod osoba koje nisu bile izložene azbestu bio je 480,09 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 479,13 dana. Nije nađena statistička značajnost.

Tablica 6. Odnos između izloženosti azbestu i duljini preživljenja u danima u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa

	azbest	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
Preživljenje (dani)	1	22	446,1364	407,40553	86,85915
	2	11	480,0909	479,12617	144,46198

1-izloženi, 2- neizloženi

Deskriptivna statistika

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50- a	75-a
Preživljenje (dani)	33	457,4545	425,35420	11,00	1741,00	172,5000	329,0000	641,5000
Azbest	33	1,33	,479	1	2	1,00	1,00	2,00

	preživljenje (dani)
Mann-Whitney U	120,000
Wilcoxon W	373,000
Z	-,038
Asymp. Sig.	,970
p vrijednost	,985

Mann-Whitney test, p= 0,985

Tablica 7 prikazuje odnos intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog obojenja kod svih uzoraka i broja dana preživljenja. Određen je Spearmanov koeficijent korelacije te iznosi -0,033, uz $p=0,751 > 0,05$, dakle možemo zaključiti da ne postoji značajna korelacija između intenziteta citoplazmatskog bojenja i broja dana preživljavanja.

Tablica 7. Odnos intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog obojenja kod svih uzoraka i broja dana preživljenja

Korelacije			Preživljenje (dani)	Citoplazma
Spearman	Preživljenje (dani)	koeficijent korelacije	1,000	-,033
		p vrijednost	.	,751
		broj uzoraka	97	97
	Citoplazma	koeficijent korelacije	-,033	1,000
		p vrijednost	,751	.
		broj uzoraka	97	97

Tablica 8 prikazuje odnos intenziteta plakofilin 3 membranskog obojenja kod svih uzoraka i broja dana preživljenja. Određen je Spearmanov koeficijent korelacije te iznosi -0,049 ($p=0,632 > 0,05$), dakle možemo zaključiti da ne postoji značajna korelacija između intenziteta membranskog bojenja i broja dana preživljavanja.

Tablica 8. Odnos intenziteta plakofilin 3 membranskog obojenja kod svih uzoraka i broja dana preživljenja

Korelacije

			Preživljenje (dani)	Membrana
Spearman	Preživljenje (dani)	koeficijent korelacije	1,000	-,049
		p vrijednost	.	,632
		broj uzoraka	97	97
	Membrana	koeficijent korelacije	-,049	1,000
		p vrijednost	,632	.
		broj uzoraka	97	97

Tablica 9 prikazuje odnos dana preživljenja između 4 analizirana podtipa epiteloidnog mezotelioma. U test nisu uključeni živi pacijenti. Skupina 1 (solidni) su u prosjeku nakon dijagnosticiranja preživjeli 405,86 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka u iznosu 377,71 dan. Skupina 2 (trabekularni) su u prosjeku nakon dijagnosticiranja preživjeli 487,35 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka u iznosu 693,21 dan. Skupina 3 (tubulopapilarni) su u prosjeku nakon dijagnosticiranja preživjeli 513,95 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka u iznosu 363,28 dan. Skupina 4 (tubularni) su u prosjeku nakon dijagnosticiranja preživjeli 576,89 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka u iznosu 319,46 dan. Statističkom analizom dobivena je vrijednost $p=0,282$, odnosno nije nađena statistička značajnost.

Tablica 9. Usporedba broja dana preživljenja između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma: solidni, trabekularni, tubulopapilarni, tubularni

Statistika grupa								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
1	22	405,8636	377,70779	80,52757	238,3974	573,3299	15,00	1741,00
2	17	487,3529	693,21380	168,12904	130,9353	843,7706	13,00	3010,00
3	22	513,9545	363,27537	77,45057	352,8873	675,0218	81,00	1195,00
4	9	576,8889	319,45518	106,48506	331,3339	822,4439	172,00	1103,00
ukupno	70	481,6143	458,47761	54,79856	372,2942	590,9344	13,00	3010,00

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
Preživljenje (dani)	70	481,6143	458,47761	13,00	3010,00	177,2500	352,0000	692,2500
Dijagnoza	70	2,2571	1,04515	1,00	4,00	1,0000	2,0000	3,0000

1- solidni, 2- trabekularni, 3- tubulopapilarni, 4- tubularni

	Preživljenje (dani)
Hi- kvadrat	3,816
Df	3
p vrijednost	,282

Kruskal-Wallis test, p= 0,282

5.5 IZLOŽENOST AZBESTU

Tablica 10 prikazuje odnos između izloženosti azbestu i dobi pacijenata u vrijeme otkrivanja bolesti. Prosječna dob osoba izloženih azbestu u trenutku otkrivanja bolesti bila je 59,42 godine uz prosječno odstupanje od prosjeka 10,93 godine. Prosječna dob osoba koje nisu bile izložene azbestu u trenutku otkrivanja bolesti bila je 58,00 godina uz prosječno odstupanje od prosjeka 9,58 godina. Ukupno su postojali podaci za 37 pacijenata te su 24 pacijenta bila izložena azbestu, dok je 13 bilo neizloženo. Razina signifikantnosti $p=0,577$ veća je od 0,05, odnosno nema statistički značajne razlike u dobi otkrivanja bolesti kod osoba izloženih i onih neizloženih azbestu.

Tablica 10. Odnos između izloženosti azbestu i dobi pacijenata u vrijeme postavljanja dijagnoze

Statistika grupa

	azbest	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
dob	1,00	24	59,4167	10,92630	2,23032
	2,00	13	58,0000	9,58297	2,65784

1- izloženi, 2- neizloženi

Deskriptivna statistika

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
Dob	37	58,9189	10,36119	39,00	79,00	50,0000	59,0000	68,0000
Azbest	37	1,35	,484	1	2	1,00	1,00	2,00

	Dob
Mann-Whitney U	138,500
Wilcoxon W	229,500
Z	-,557
p vrijednost	,577

Mann-Whitney test, $p=0,577$

Tablica 11 prikazuje odnos intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Prosječni intenzitet citoplazmatskog bojenja osoba izloženih azbestu bio je 2,58 uz prosječno odstupanje od prosjeka 1,06, dok je prosječni intenzitet citoplazmatskog obojenja osoba koje nisu izložene azbestu bio je 2,00 uz prosječno odstupanje od prosjeka 0,71. Nađena je statistička značajnost, odnosno intenzitet citoplazmatskog obojenja kod osoba izloženih azbestu bio je veći od onog kod osoba koje nisu bile izložene azbestu.

Tablica 11. Odnos intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa					
	azbest	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
citoplazma	1	24	2,5833	1,05981	,21633
	2	13	2,0000	,70711	,19612

1-izloženi, 2- neizloženi

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
Citoplazma	37	2,3784	,98182	,00	4,00	2,0000	2,0000	3,0000
Azbest	37	1,35	,484	1	2	1,00	1,00	2,00

	Citoplazma
Mann-Whitney U	99,000
Wilcoxon W	190,000
Z	-2,017
p vrijednost	,072

Mann-Whitney test, p= 0.072

Tablica 12 prikazuje odnos intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Prosječni intenzitet membranskog obojenja osoba izloženih azbestu bio je 2,42 uz prosječno odstupanje od prosjeka 1,38, dok je prosječni intenzitet membranskog obojenja osoba koje nisu bile izložene azbestu bio 1,58 uz prosječno odstupanje od prosjeka 1,07. Nije nađena statistička značajnost.

Tablica 12. Odnos intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 i izloženosti azbestu u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa					
	azbest	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
membrana	1	24	2,4167	1,38051	,28179
	2	13	1,8462	1,06819	,29626

1-izloženi, 2- neizloženi

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50- a	75- a
Membrana	37	2,2162	1,29390	,00	4,00	2,0000	2,0000	3,5000
Azbest	37	1,35	,484	1	2	1,00	1,00	2,00

	Membrana
Mann-Whitney U	118,000
Wilcoxon W	209,000
Z	-1,285
p vrijednost	,236

Mann- Whitney test, p= 0,236

5.6 KLINIČKI STADIJ

Tablica 13 prikazuje usporedbu intenziteta citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Nije bilo pacijenata u stadiju 1 bolesti. Prosječna vrijednost intenziteta citoplazmatskog bojenja najveća je kod ispitanika u 2. stadiju i iznosi 2,50 uz standardnu devijaciju 1,00 a najmanja kod ispitanika u 4. stadiju bolesti i iznosi 2,25 uz standardnu devijaciju 0,89. Nije nađena statistička značajnost.

Tablica 13. Usporedba intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog bojenja s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
2	4	2,5000	1,00000	,50000	,9088	4,0912	2,00	4,00
3	19	2,4737	1,12390	,25784	1,9320	3,0154	1,00	4,00
4	51	2,2549	,89091	,12475	2,0043	2,5055	,00	4,00
ukupno	74	2,3243	,95240	,11071	2,1037	2,5450	,00	4,00

2-stadij 2, 3- stadij 3, 4- stadij 4

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25- a	50- a	75- a
Citoplazma	74	2,3243	,95240	,00	4,00	2,0000	2,0000	3,0000
Stadij	74	3,64	,587	2	4	3,00	4,00	4,00

	Citoplazma
Hi- kvadrat	,475
Df	2
p vrijednost	,788

Kruskal- Wallis test, p=0,788

Tablica 14 prikazuje usporedbu intenziteta membranske izraženosti plakofilina 3 s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Nije bilo pacijenata u stadiju 1 bolesti. Prosječna vrijednost intenziteta membranskog bojenja najmanja je kod ispitanika u 2. stadiju i iznosi 1,25 uz standardnu devijaciju 1,50 a najveća kod ispitanika u 3. stadiju bolesti i iznosi 2,52 uz standardnu devijaciju 0,84. Nije nađena statistička značajnost.

Tablica 14. Usporedba intenziteta plakofilin 3 membranskog bojenja s obzirom na klinički stadij u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
2	4	1,2500	1,50000	,75000	-1,1368	3,6368	,00	3,00
3	19	2,5263	,84119	,19298	2,1209	2,9318	1,00	4,00
4	51	2,2941	1,23764	,17330	1,9460	2,6422	,00	4,00
ukupno	74	2,2973	1,17892	,13705	2,0242	2,5704	,00	4,00

2-stadij 2, 3- stadij 3, 4- stadij 4

Deskriptivna statistika

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25- a	50- a	75- a
Membrana	74	2,2973	1,17892	,00	4,00	2,0000	2,0000	3,0000
Stadij	74	3,64	,587	2	4	3,00	4,00	4,00

	Membrana
Hi- kvadrat	2,606
df	2
p vrijednost	,272

Kruskal –Wallis test, p= 0.272

5.7 HISTOLOŠKI PROCIJENJENO ŠIRENJE U VEZIVO, ODNOSNO MAST I /ILI SKELETNI MIŠIĆ

Tablica 15 prikazuje broj uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma uzimajući u obzir sve uzorke kao i 4 najbrojnija podtipa u ovom istraživanju (solidni, tubulopapilarni, trabekularni i tubularni) s obzirom na histološki procijenjeno širenje u vezivno tkivo te masno tkivo i/ili skeletni mišić. Ukupno su 52 uzorka pokazala širenje u vezivno tkivo, a 45 u mast i/ ili skeletni mišić. Kod podtipova epiteloidnog mezotelioma, u slučaju solidnog mezotelioma 14 uzoraka zamijećeno je širenje u vezivno tkivo, a u 10 u mast i/ili skeletni mišić, kod tubulopapilarnog mezotelioma 13 uzoraka svrstano je u grupu "vezivo", a 10 u "mast i/ili skeletni mišić". Kod trabekularnog tipa 10 uzoraka je pokazalo širenje u vezivo, a 12 u mast i/ili skeletni mišić, dok je kod tubularnog od ukupno 10 uzoraka, 5 pokazalo širenje u vezivno tkivo, a 5 u skeletni mišić i/ili masno tkivo.

Tablica 15. Svi uzorci difuznog malignog pleuralnog mezotelioma i podtipovi epiteloidnog mezotelioma i histološki procijenjeno širenje u vezivo te mast i/ili skeletni mišić

histološki procijenjeno širenje u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić (svi uzorci i podtipovi)	broj uzoraka (%)
svi	
vezivo	52 (54)
mast,skeletni mišić	45 (46)
solidni	
vezivo	14 (58)
mast,skeletni mišić	10 (42)
tubulopapilarni	
vezivo	13 (57)
mast, skeletni mišić	10 (43)
trabekularni	
vezivo	10 (45)
mast, skeletni mišić	12 (55)
tubularni	
vezivo	5 (50)
mast, skeletni mišić	5 (50)

Tablica 16 prikazuje odnos histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić i dana preživljenja pacijenata. Prosječni broj dana preživljavanja kod uzoraka "vezivo" bio je 454,00 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 310,28 dana, dok je kod uzoraka "mast i/ili skeletni mišić" bio 534,05 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 574,67 dana. Statistička značajnost nije nađena.

Tablica 16. Odnos histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić i dana preživljenja u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa					
	širenje	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
preživljenje	1	47	454,0000	310,27856	45,25878
	2	40	534,0500	574,66735	90,86289

1-vezivo, 2- mast i/ili skeletni mišić

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25- a	50- a	75- a
Preživljenje (dani)	87	490,8046	450,40653	11,00	3010,00	178,0000	360,0000	721,0000
širenje	87	1,4598	,50127	1,00	2,00	1,0000	1,0000	2,0000

	Preživljenje (dani)
Mann-Whitney U	934,000
Wilcoxon W	1754,000
Z	-,051
p vrijednost	,959

Mann-Whitney test, p= 0,959

Tablica 17 prikazuje odnos između izloženosti azbestu i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima i podtipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma (solidni, tubulopapilarni, trabekularni). Tubularni podtip je isključen iz analize s obzirom da su svi pacijenti bili izloženi azbestu. Analizom nije nađeno statističke značajnosti.

Tablica 17. Odnos između izloženosti azbestu i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima i podtipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma (solidni, tubulopapilarni, trabekularni)

izloženost azbestu

	svi		solidni		tubulopapilarni		trabekularni	
	a	b	a	b	a	b	a	b
vezivo	7	12	2	4	2	3	1	1
masno tkivo i/ili skeletni mišić	6	12	4	2	0	4	2	1

a- izloženi, b- neizloženi

Hi- kvadrat; svi, $p= 0,823$; solidni, $p= 0,567$; tubulopapilarni, $p= 0,444$; trabekularni, $p= 1,000$.

Tablica 18 prikazuje odnos između citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić. Prosječni intenzitet citoplazmatskog bojanja uzoraka "vezivo" bio je 1,92, uz prosječno odstupanje od prosjeka 0,79. Prosječni intenzitet citoplazmatskog bojanja uzoraka "mast i/ili skeletni mišić" bio je 2,82, uz prosječno odstupanje od prosjeka 0,86. S obzirom da je empirijska razina signifikantnosti $p < 0,001$ možemo prihvatiti da postoji statistički značajna razlika u intenzitetu citoplazmatskog bojanja, odnosno uzorci "vezivo" imali su manji intenzitet citoplazmatskog bojanja od osoba "mast i/ili skeletni mišić".

Tablica 18. Odnos citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa

	širenje	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
citoplazma	1,00	52	1,9231	,78830	,10932
	2,00	45	2,8222	,86047	,12827

1-vezivo, 2- mast i/ili skeletni mišić

Deskriptivna statistika

	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25-a	50-a	75-a
Citoplazma	97	2,3402	,93415	,00	4,00	2,0000	2,0000	3,0000
Širenje	97	1,4639	,50129	1,00	2,00	1,0000	1,0000	2,0000

	Citoplazma
Mann-Whitney U	557,500
Wilcoxon W	1935,500
Z	-4,873
p vrijednost	,000

Mann-Whitney test, $p < 0.001$

Tablica 19 prikazuje odnos između membranske izraženosti plakofilina 3 i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić. Prosječni intenzitet membranskog bojenja osoba "vezivo" bio je 2,00, uz prosječno odstupanje od prosjeka 1,05. Prosječni intenzitet membranskog bojenja uzoraka "mast i/ili skeletni mišić" bio je 2,76, uz prosječno odstupanje od prosjeka 1,17. S obzirom da je empirijska razina signifikantnosti $p=0,001$ možemo prihvatiti da postoji statistički značajna razlika u intenzitetu citoplazmatskog bojanja, odnosno uzorci "vezivo" imali su manji intenzitet citoplazmatskog bojanja od osoba "mast i/ili skeletni mišić".

Tablica 19. Odnos membranske izraženosti plakofilina 3 i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa					
	širenje	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška
Membrana	1,00	52	2,0000	1,04787	,14531
	2,00	45	2,7556	1,17077	,17453

1-vezivo, 2- mast i/ili skeletni mišić

Deskriptivna statistika								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25- a	50- a	75- a
Membrana	97	2,3505	1,16406	,00	4,00	2,0000	2,0000	3,0000
Širenje	97	1,4639	,50129	1,00	2,00	1,0000	1,0000	2,0000

	Membrana
Mann-Whitney U	754,500
Wilcoxon W	2132,500
Z	-3,196
p vrijednost	,001

Mann-Whitney test, $p < 0,001$

Tablica 20 prikazuje broj uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma s obzirom na intenzitet citoplazmatskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić. Utvrđena je statistički značajna povezanost u slučaju trabekularnog podtipa ($p=0.001$) i tubularnog podtipa ($p=0.017$), odnosno uzorci sa širenjem u masno tkivo i/ili skeletni mišić pokazali su intenzivniju citoplazmatsku imunoreaktivnost.

Tablica 20. Povezanost intenziteta plakofilin 3 citoplazmatskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u podtipovima epiteloidnog mezotelioma

histološki procijenjeno širenje u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić

intenzitet citoplazmatskog bojenja	solidni		tubulopapilarni		trabekularni		tubularni	
	a	b	a	b	a	b	a	b
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	3	1	-	4	-	-	-
2	6	7	9	4	6	5	5	1
3	-	3	2	4	-	3	-	1
4	4	1	2	1	-	4	-	3

a- vezivno tkivo; b- masno tkivo i/ ili skeletni mišić

Mann-Whitney test; solidni, $p=0,101$; tubulopapilarni, $p=0,136$; **trabekularni, $p=0,001$, tubularni, $p=0,017$**

Tablica 21 prikazuje broj uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma s obzirom na intenzitet membranskog bojenja i histološki procijenjeno širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić. Prema rezultatima statističke obrade, utvrđena je statistički značajna povezanost intenziteta membranskog bojenja u slučaju tubulopapilarnog podtipa ($p=0.046$), odnosno uzorci sa širenjem u masno tkivo i/ili skeletni mišić pokazali su intenzivniju membransku imunoreaktivnost.

Tablica 21. Povezanost između intenziteta plakofilin 3 membranskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u podtipovima epiteloidnog mezotelioma

histološki procijenjeno širenje u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić

Intenzitet membranskog bojenja	solidni		tubulopapilarni		trabekularni		tubularni	
	a	b	a	b	a	b	a	b
0	2	-	1	-	1	-	1	-
1	2	1	1	-	1	1	-	1
2	5	3	8	4	7	6	2	1
3	2	1	3	2	1	-	1	1
4	3	5	1	3	-	5	1	2

a-vezivno tkivo; b- masno tkivo i/ ili skeletni mišić

Mann-Whitney test; solidni, $p= 0,128$; **tubulopapilarni, $p= 0,046$** ; trabekularni, $p= 0,068$, tubularni, $p= 0.519$

5.8 CITOPLAZMATSKO/ MEMBRANSKI (c/m) OMJER

Tablica 22 prikazuje odnos c/ m omjera i dana preživljenja. Prosječni broj dana koji su osobe proživjele nakon što im je bolest otkrivena u h/l skupini iznosio je 470,22 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 299,28 dana, u l/h skupini prosječni broj dana preživljenja iznosio je 576,38 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 655,97 dana., dok je u eq skupini iznosio je 455,52 dana, uz prosječno odstupanje od prosjeka 366,36 dana. S obzirom da je $p=0,843$ možemo prihvatiti da nema statistički značajne razlike broju dana kojeg su preživjeli nakon što im je otkrivena bolest između osoba h/l, l/h i eq.

Tablica 22. Odnos c/m omjera i dana preživljenja u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Statistika grupa								
	broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		minimum	maksimum
					donja granica	gornja granica		
h/l	18	470,2222	299,28258	70,54158	321,3925	619,0520	90,00	1103,00
l/h	24	576,3750	655,97487	133,90031	299,3811	853,3689	74,00	3010,00
eq	44	455,5227	366,36419	55,23148	344,1378	566,9076	11,00	1741,00
ukupno	86	492,3256	452,82344	48,82921	395,2400	589,4111	11,00	3010,00

Deskriptivna statistika								
	Broj uzoraka	srednja vrijednost	standardna devijacija	minimum	maksimum	percentile		
						25- a	50- a	75- a
Preživljenje (dani)	86	492,3256	452,82344	11,00	3010,00	177,2500	359,5000	723,5000
c/m	86	2,3023	,79808	1,00	3,00	2,0000	3,0000	3,0000

	Preživljenje (dani)
Chi-Square	,341
Df	2
p vrijednost	,843

Kruskal- Wallis test, $p=0.843$

Tablica 23 prikazuje broj uzoraka mezotelioma s obzirom na c/m omjer i duljinu preživljenja nakon utvrđivanja dijagnoze. U test je uključeno ukupno 22 uzorka solidnog, 22 tubulopapilarnog mezotelioma, 17 trabekularnog i 9 tubularnog mezotelioma, isključeni živi pacijenti. Nije nađena statistički značajna povezanost u broju dana preživljenja nakon postavljanja dijagnoze između pacijenata s h/l, l/h i eq tipom c/m omjera.

Tablica 23. Povezanost c/m omjera i duljine preživljenja kod podtipova epiteloidnog mezotelioma

	solidni		tubulopapilarni		trabekularni		tubularni	
c/m omjer	n uzoraka	dani preživljenja	n uzoraka	dani preživljenja	n uzoraka	dani preživljenja	n uzoraka	dani preživljenja
h/l	3	439,3333	4	552,7500	4	243,0000	3	840,0000
l/h	7	401,0000	6	401,0000	3	1115,3333	3	427,6667
eq	12	400,3333	12	557,5000	10	396,7000	3	463,0000
ukupno	22	405,8636	22	513,9545	17	487,3529	9	576,8889

Kruskall- Vallis test, solidni, $p=0,550$; tubulopapilarni, $p=0,582$; trabekularni, $p=0,718$; tubularni; $p=0,193$

Tablica 24 prikazuje odnos c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Budući da je $p=0,385$ možemo zaključiti da ne postoji značajna povezanost.

Tablica 24. Odnos c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

	vrijednost	df	p vrijednost
Hi- kvadrat	1,909	2	,385
Omjer vjerojatnosti	1,913	2	,384
Broj slučajeva	96		

Hi- kvadrat, $p= 0,385$

Tablica 25 prikazuje odnos c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić. Analizirana su 24 uzorka solidnog podtipa, 22 uzorka trabekularnog, 23 tubulopapilarnog i 10 tubularnog podtipa. U svim analizama vrijednost p veća je od 0,05 te nije dokazana statistička značajnost, odnosno nema značajne povezanosti između c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić kod analiziranih podtipova difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.

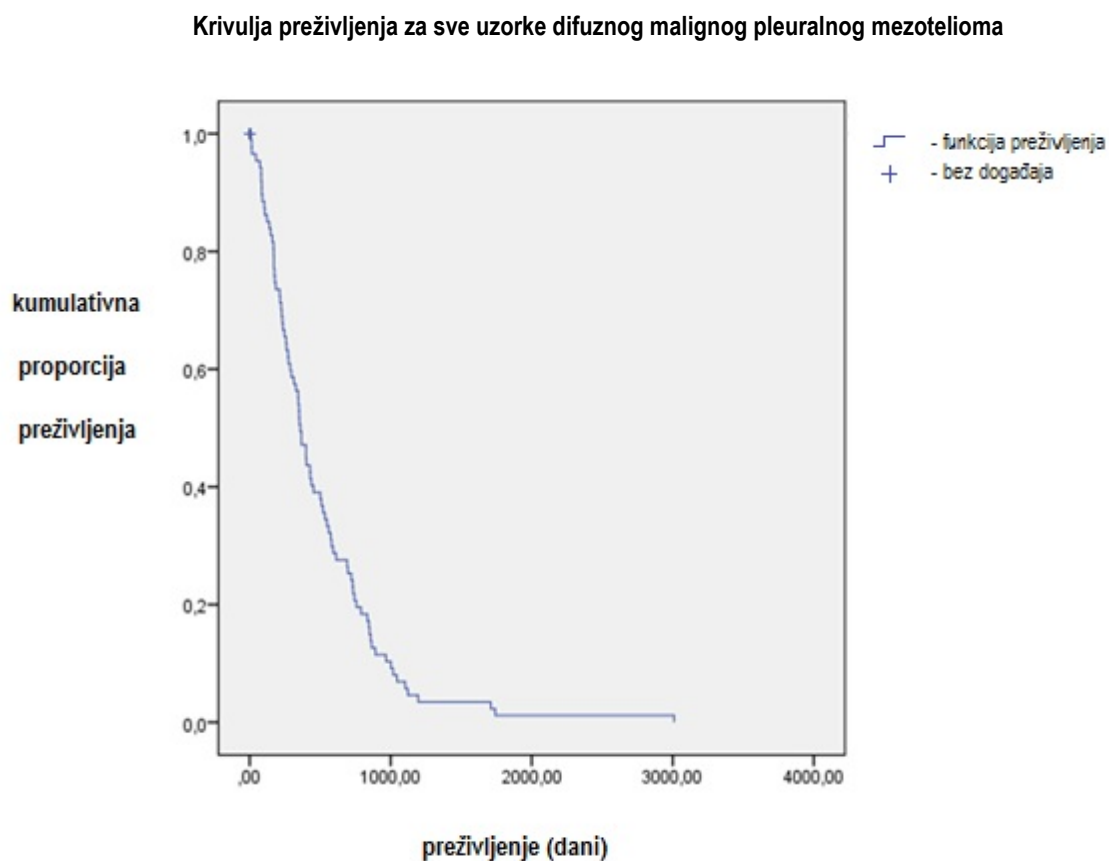
Tablica 25. Odnos c/m omjera i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u podtipovima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

	Hi- kvadrat	df	p vrijednost
solidni	,098	2	0,952
trabekularni	1,833	2	0,400
tubulopapilarni	1,104	2	0,576
tubularni	1,667	2	0,435

Hi- kvadrat

5.9 KAPLAN- MEIER KRIVULJE PREŽIVLJENJA

Slika 7 prikazuje Kaplan- Meier krivulju preživljenja za sve uzorke difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.



Slika 7. Kaplan- Meier krivulja preživljenja za sve uzorke difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

Tablica 26 prikazuje analizu Kaplan- Meier krivulja preživljenja za 4 podtipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma. Krivulje su analizirane pomoću Log Rank, Breslow i Tarone-Ware testa uz vrijednosti $p = 0,569$, $p=0,307$, $p= 0,355$ pa možemo prihvatiti da nema statistički značajne razlike među krivuljama.

Tablica 26. Analiza Kaplan- Meier krivulja preživljenja za 4 podtipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

DIJAGNOZA	broj uzoraka	broj umrlih	bez događaja	
			broj	postotak
1	24	22	2	8,3%
2	22	17	5	22,7%
3	23	22	1	4,3%
4	10	9	1	10,0%
ukupno	79	70	9	11,4%

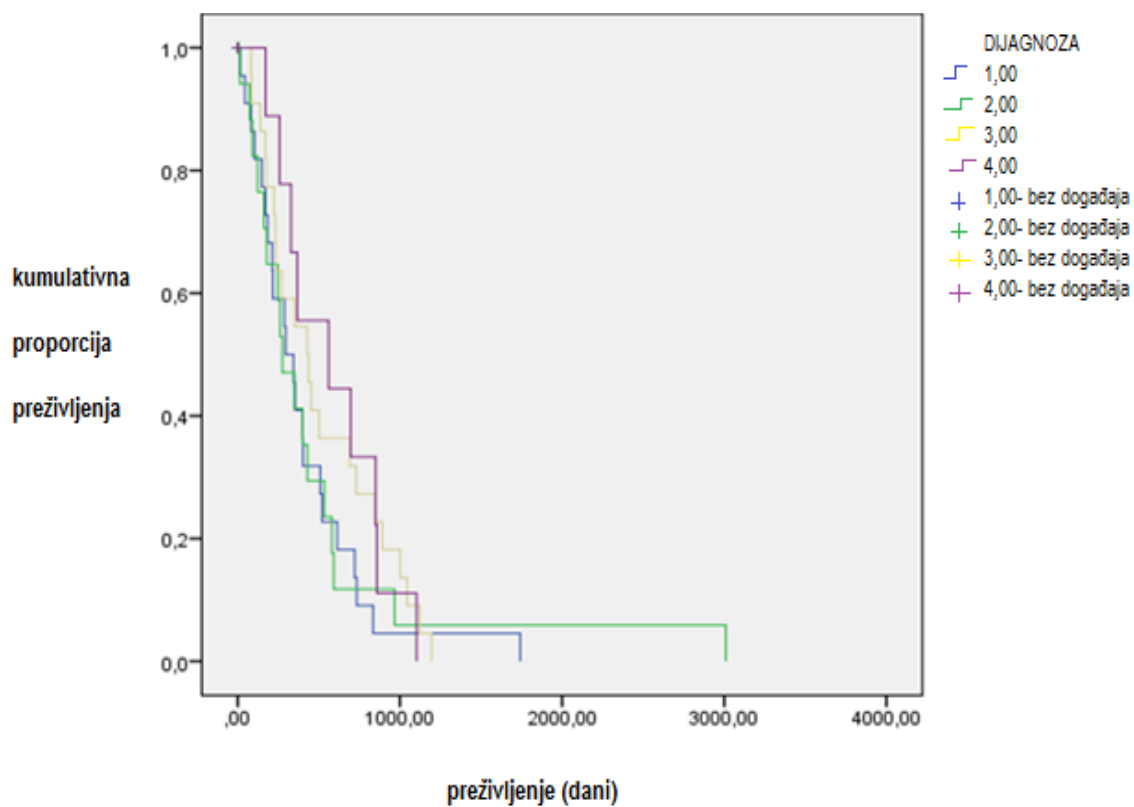
1-solidni, 2- trabekularni, 3- tubulopapilarni, 4- tubularni

Srednje vrijednosti i medijani preživljenja

DIJAGNOZA	srednja vrijednost				medijan			
	procjena	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti		procjena	standardna pogreška	95% interval pouzdanosti	
			donja granica	gornja granica			donja granica	gornja granica
1	405,864	80,528	248,030	563,698	296,000	80,323	138,566	453,434
2	487,353	168,129	157,820	816,886	275,000	71,343	135,167	414,833
3	513,955	77,451	362,151	665,758	428,000	105,534	221,153	634,847
4	576,889	106,485	368,178	785,600	560,000	289,198	,000	1126,828
ukupno	481,614	54,799	374,209	589,019	351,000	53,860	245,434	456,566

	Hi- kvadrat	df	p vrijednost
Log Rank (Mantel-Cox)	2,015	3	,569
Breslow (generalizirani Wilcoxon)	3,608	3	,307
Tarone-Ware	3,249	3	,355

Slika 8 prikazuje Kaplan- Meier krivulje preživljenja za 4 podtipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.



1,00- solidni, 2,00- trabekularni, 3,00- tubulopapilarni, 4,00- tubularni

Slika 8. Kaplan- Meier krivulje preživljenja za 4 podtipa difuznog malignog pleuralnog mezotelioma

6. RASPRAVA

DMPM je maligna neoplazma mezotelnih stanica koje oblažu pleuralnu ovojnici, najčešće se javlja u muškaraca, a smatra se povezanom s izloženosti azbestu (2,9). Simptomi bolesti se obično pojavljuju nakon dužeg vremena latencije koje može iznositi i do 45 godina (2). Problemi povezani s DMPM-om zahvaćaju sve aspekte vezane uz ovaj tumor, odnosno samu simptomatologiju i prepoznavanje bolesti, dijagnostiku, terapiju i konačnu prognozu (10,29). Simptomatologija koja prati pojavu ovog tumora nije specifična te se stoga otežano postavlja i sumnja na maligni mezoteliom kao moguću dijagnozu što dovodi do zakašnjenja u određivanju odgovarajuće dijagnoze i liječenja bolesti (29). Mezoteliom stoga predstavlja važan problem s obzirom da se u vrijeme otkrivanja bolesti i postavljanja dijagnoze većina pacijenata nalazi u uznapredovalom stadiju bolesti s lošim prognostičkim ishodom (15). Osim samog stadija bolesti i sam histološki tip mezotelioma utječe na konačnu prognozu, tako da pacijenti s epiteloidnim tipom malignog pleuralnog mezotelioma imaju povoljniju prognozu u odnosu na pacijente sa sarkomatoidnim tipom koji se smatra nepovoljnijom varijantom u odnosu na epiteloidni (37). Epiteloidni tip pokazuje veliku histološku heterogenost te se razlikuje veći broj podtipova među kojima se ističe pleomorfni podtip za koji se vezuje loš prognostički ishod nalik na onaj kod pacijenata sa sarkomatoidnim tipom mezotelioma (37). Nadalje, terapijske mogućnosti koje se primjenjuju možemo smatrati oskudnima s obzirom da najčešće uključuju operativni zahvat u vidu ekstrapleuralne pneumonektomije ili pleurektomije koji se mogu primijeniti u manjem broju pacijenata koji se nalaze u nižem stadiju bolesti te pokazuju bolje opće stanje organizma, no produžuju život pacijenta nekoliko mjeseci, a često su praćeni ozbiljnim morbiditetom i mogućim smrtnim ishodom (13,70). Većina pacijenata ipak bude podvrgnuta liječenju kemoterapeutičima koji također produžuju život kraće vrijeme, a njihova primjena je također prećena nuspojavama (71). Trenutno se provode istraživanja koja se bave pronalaženjem potencijalnih prognostičkih markera kao i terapijskih meta i mogućnostima terapijskih djelovanja kako bi se poboljšao konačan ishod liječenja. Također se provode i istraživanja iz područja molekularne patologije, također s ciljem da se poboljša mogućnost liječenja pacijenata s ovom bolešću s obzirom da je prognoza loša usprkos primijenjenim modalitetima liječenja (15,61,70,75). S obzirom da se očekuje porast broja slučajeva pacijenata koji boluju od ovog maligniteta u sljedećim desetljećima (13), istraživanja prognostičkih faktora,

molekularnih mehanizama, biomarkera za praćenje pacijenata te potencijalnih terapijskih molekula koji bi se mogli primijeniti u praksi i time poboljšali preživljenje i terapijski ishod više nego potrebna.

Patogeneza DMPM-a je složena te je uz nastanak ovog maligniteta vezano više čimbenika. Kao važni faktori spominju se: genetska predispozicija, izloženost zračenju, Simian virusu 40, izloženost kontrastnim sredstvima i metalima koji izazivaju kroničnu upalu pleure te svi navedeni dovode do promjene u mehanizmima što u konačnici rezultira nastankom malignog mezotelioma (10,18,20,24,25). Neki od dosad poznatih mehanizama uključenih u nastanak ovog tumora su: epigenetski mehanizmi, deregulacija mikroRNA, deregulacija signalnih molekula, faktori rasta, promjene, odnosno gubitak tumor supresorskih gena (18,20,21,22). No najvažniji čimbenik vezan uz nastanak malignog mezotelioma je svakako azbest, odnosno vlakna azbesta koja utječu na razvoj malignog mezotelioma fizičkim putem s obzirom da izazivaju iritaciju mezotela i pleure te ovakva ponavljana ozljeda mezotela dovodi do pojave maligne transformacije stanica mezotela (18,19). Također se smatra da je utjecaj azbesta vidljiv i u direktnom djelovanju na molekulu DNA, na kromosome te apsorbiranjem spojeva na površinu vlakana, odnosno nakupljanjem karcinogena (18,19,20). Dosad je pokazano da pacijenti s anamnezom izloženosti azbestu pokazuju kraće preživljenje nakon operativnog zahvata (42), stoga sam u ovom radu analizirala povezanost između izloženosti azbestu i duljinom preživljenja u svim tipovima mezotelioma, zatim povezanost izloženosti azbestu kod svih pacijenata s DMPM-om i dobi pacijenata u vrijeme otkrivanja bolesti, kao i povezanost te izloženosti s histološki procijenjenim širenjem u vezivo, odnosno masno tkivo i/ili skeletni mišić, no statistička značajnost nije pokazana ni u jednom od ovih slučajeva te možemo zaključiti da stupanj izloženosti azbestu ne utječe na agresivnost malignog mezotelioma i samo preživljenje pacijenata. Zanimljivo je u ovom radu da je odnos između citoplazmatske izraženosti plakofilina 3 u glavnim tipovima mezotelioma i izloženosti azbestu pokazan kao statistički značajan, odnosno da je kod pacijenata koji su bili izloženi azbestu, citoplazmatsko obojenje bilo jače, u odnosu na pacijente koji nisu bili izloženi azbestu. Nasuprot tome, odnos membranske ekspresije plakofilina 3 i izloženosti azbestu nisu pokazani kao statistički značajni. S obzirom da je azbest povezan s nastankom malignog mezotelioma i preko utjecaja na signalne puteve (18,19), a sam plakofilin 3 djeluje u procesima stanične signalizacije (90), postoji mogućnost da azbest utječe i na izraženost i djelovanje plakofilina 3, no ovu pretpostavku svakako bi trebalo detaljnije istražiti i svakako uključiti veći broj pacijenata s malignim mezoteliomom.

Plakofilini su skupina proteina koja su isprva opisani kao komponente adhezivnih spojeva s prvenstveno strukturnom ulogom u građi dezmosoma (83). Smatraju se članovima "armadillo" obitelji proteina koji osim strukturne uloge pokazuju i regulatorne funkcije koje ispoljavaju kroz svoje interakcije s drugim molekulama kao što su ostali proteini u građi dezmosoma (84,86). Daljnja istraživanja funkcije plakofilina pokazala su da određeno tkivo može sadržavati više različitih plakofilina (83), da njihov značaj nije samo u održavanju strukture stanica, nego i u procesu diferencijacije stanica, razvoja tkiva, u procesima transkripcije i translacije, regulaciji ekspresije gena kao i u epitelno- mezenhimalnoj tranziciji koja je nužna za razvoj i širenje tumora (83,84,88-99). Dosad su otkrivena 4 člana plakofilina: plakofilin 1, koji je prisutan u jezgri, dezmosomima i citoplazmi stanica, a ima strukturnu kao i ulogu u procesu stanične signalizacije te je razina njegove ekspresije vezana uz ponašanje tumora, u smislu invazije i metastaziranja (105,106). Plakofilin 2 je član plakofilina koji je važan za normalan razvoj miokarda te je uključen u procese transkripcije, translacije i staničnog signaliziranja (113,114). Plakofilin 4 je također član obitelji plakofilina te je njegova uloga izražena je u staničnoj adheziji, ali i u staničnoj signalizaciji (121).

Plakofilin 3 je član plakofilina koji je prisutan u jezgri, membrani i citoplazmi stanica te se smatra da je važan u adheziji stanica, transkripciji, translaciji, da utječe na gensku ekspresiju, a i da je važan sudionik procesa epitelno- mezenhimalne tranzicije (83,90,102,122,129).

Ekspresija i prognostička vrijednost plakofilina 3 je dosad istraživana u različitim tumorima te je ovaj protein pokazao raznolikost u svojoj ekspresiji u raznim tipovima tumora, kao i prognostičku vrijednost u nekima od njih (83). Primjerice, u slučaju primarnih orofaringealnih tumora, smanjena imunoreaktivnost plakofilina 3 povezana je s lošijim preživljenjem pacijenata (123), u slučaju adenokarcinoma želuca smanjena imunoreaktivnost je vezana uz veći broj metastatski pozitivnih limfnih čvorova i višim tumorskim stadijem (91). Kod adenokarcinoma dojke povećana imunoreaktivnost plakofilina 3 povezana je s višim tumorskim gradusom i većim brojem metastatski pozitivnih limfnih čvorova (132), u adenokarcinomu prostate povećana ekspresija upućuje na tumor agresivnijih karakteristika (127) kao i u slučaju karcinoma pluća nemalih stanica (130). Smanjena ekspresija plakofilina 3 u karcinomu mokraćnog mjehura smatra se vezanom uz veću invazivnost tumora (99).

S obzirom da plakofilini imaju strukturne uloge, ali i moguće funkcije u staničnoj signalizaciji (83,86), zanimljive su molekule u istraživanju biologije tumora. Do sada,

osim njihove biološke važnosti, istraživanja ekspresije i kliničke važnosti plakofilina provedena su na različitim tipovima tumora. Plakofilini su prvo identificirani kao proteini dezmosomalnog plaka, no sljedeće su studije otkrile njihovu citoplazmatsku i nuklearnu lokalizaciju i njihovu translokaciju do dezmosoma tijekom određenih stadija diferencijacije (91). Još uvijek je malo poznato o regulaciji njihove lokalizacije i njihovom premještanju između subcelularnih odjeljaka i njihovoj funkciji u jezgri (89).

Na temelju dosad navedenog, postavila sam si pitanje da li je plakofilin 3 izražen u glavnim tipovima i podtipovima epiteloidnog malignog mezotelioma te ukoliko je izražen, da li je razina njegove imunoreaktivnosti povezana s duljinom preživljenja pacijenata s DMPM-om. Stoga sam na uzorku od 100 difuznih malignih pleuralnih mezotelioma imunohistokemijski analizirala izraženost plakofilina 3 u membrani i citoplazmi stanica.

Prema dosadašnjim saznanjima, studije ekspresije plakofilina 3 u slučaju DMPM- a dosad nisu rađene, kao ni studije vezane uz njegovu prognostičku vrijednost u ovom malignitetu.

Naše istraživanje pokazalo je imunoreaktivnost plakofilina 3 u membranama u svim uzorcima, osim u 5 uzoraka epiteloidnog i 3 uzorka sarkomatoidnog kao i pozitivnu citoplazmatsku reakciju na plakofilin 3, osim u 1 uzorku sarkomatoidnog tipa.

Plakofilini se prenose od jezgre do dezmosoma u različitim stadijima diferencijacije i ispunjavaju različite uloge kao što su adhezija stanica, prijenos signala od jezgre do plazma membrane i druge uloge (83,90). Zamijetili smo citoplazmatsko i membransko bojenje u normalnom tkivu pleure i tumorskim stanicama DMPM- a što upućuje na prisutnost plakofilina 3 u dezmosomalnom plaku i citoplazmatskim granulama. Nije primijećeno imunohistokemijsko bojenje jezgre što bi se moglo objasniti stadijem diferencijacije stanica i prijenosom plakofilina 3 u citoplazmu i dezmosome.

S obzirom da je većina uzoraka epiteloidnog DMPM-a pokazala pozitivno citoplazmatsko i membransko obojenje, odsutnost bojenja u spomenutim uzorcima možemo objasniti tehničkim razlozima. Kako bi se izvukli valjani zaključci vezani uz imunoreaktivnost plakofilina 3 u sarkomatoidnom tipu mezotelioma, potrebno je provesti studije s većim brojem pacijenata s obzirom da je ova studija uključila samo 5 uzoraka sarkomatoidnom mezotelioma. Također je u ovom istraživanju samo 1 uzorak odgovarao bifazičnom tipu mezotelioma, tako da je i u slučaju tog tipa potrebno uključiti više uzoraka kako bi analiza bila vjerodostojna. Prema rezultatima ovog istraživanja na

dostupnim uzorcima, signifikantna prognostička vrijednost plakofilina 3 u DMPM- u nije dokazana.

U slučaju povećane citoplazmatske imunoreaktivnosti u trabekularnom i tubularnom kao i membranske imunoreaktivnosti u tubulopapilarnom podtipu, smatramo da je potrebno istraživanje s više uzoraka ovih podtipova kako bi se odredila važnost plakofilina 3 u ovim podtipovima tumora.

Pošto važnost plakofilina 3 u slučaju DMPM-a dosad nije poznata, a i na temelju rezultata preliminarnog istraživanja na manjem broju uzoraka DMPM- a u kojem sam primijetila veći intenzitet imunohistokemijske izraženosti kod uzoraka kod kojih je tumorsko tkivo pokazivalo širenje u masno tkivo i/ili skeletni mišić, odlučila sam proučiti i povezanost njegove izraženosti s histološki procijenjenim širenjem tumora u vezivno tkivo, kao i u masno tkivo i/ili skeletni mišić.

Ispitana je razina ekspresije plakofilina 3 u DMPM- u obrađujući pažnju na povezanost izraženosti ovog proteina i širenja tumora. Rezultati ove analize su pokazali veći intenzitet imunohistokemijske ekspresije ovog proteina u uzorcima DMPM- a sa širenjem u mast i/ili skeletni mišić, zatim da je pojačano citoplazmatsko bojenje u trabekularnom i tubularnom podtipu kao i pojačana membranska imunoreaktivnost u tubulopapilarnom podtipu povezana s širenjem tumora u mast i/ili skeletni mišić.

Točna uloga plakofilina u razvoju i napredovanju tumora još uvijek nije razjašnjena. Smatra se da djeluju kao onkogeni ili tumor supresorski geni ovisno o tipu stanica (83). Njihova uloga u procesu transkripcije i translacije se također smatra važnom u procesu tumorigeneze i progresije tumora. Smatra se da plakofilini djeluju kao tumor supresori kroz njihovu strukturalnu ulogu u dezmosomima, a kao onkogeni kroz stimulaciju procesa translacije (93). Citoplazmatski plakofilin 3 je uključen u proces RNA metabolizma i translacije (94). Plakofilin 3 utječe na karcinogenezu preko stimulacije proliferacije tumorskih stanica kroz povećanje eIF4F(faktor inicijacije translacije) ovisne translacije (93). Također utječe na transkripciju preko vezanja na ETV1 (mjesto-specifičan DNA vezajući transkripcijski faktor bitan za regulaciju matriks metaloproteinaza u tumorigenezi) što dovodi do promocije transkripcije (96). Prema radu Doi i al. povećana ekspresija MT1- MMP (matriks metaloproteinaza) u tumorskim stanicama DMPM- a je povezana s invazivnom aktivnošću tumora kroz degradaciju izvanstaničnog matriksa (54). Smatramo da je moguće da bi utjecaj plakofilina 3 na transkripciju i metaloproteinaze mogao biti važan uza invazivnost DMPM- a, tako da s

obzirom da je u našem slučaju plakofilin 3 izraženiji u uzorcima tumora koji pokazuju širenje u mast i/ili skeletni mišić u odnosu na invaziju tumora u vezivo, smatramo da je njegova pojačana ekspresija potiče transkripciju, translaciju i proliferaciju stanica i time pridonosi karcinogenezi te širenju tumora.

Transkripcijski faktor ZEB1 pokazuje važan utjecaj na progresiju raka. Dok je pojačano aktivan, dovodi do smanjene izraženosti plakofilina 3 i posljedičnog gubitka međustanične adhezije (gubitak plakofilina 3 u membrani) i epitelno- mezenhimalne tranzicije, dok se u slučaju ZEB1 knockdown-a plakofilin 3 djelomično premješta do plazma membrane, što dovodi do pojačanja međustanične adhezije (143).

Dosad je u slučajevima tumora s pojačanom ekspresijom plakofilina 3 i agresivnijim karakteristikama tumora kao i u ovom slučaju DMPM-a, agresivnost tih tumora objašnjena preko stimulacije procesa translacije i proliferacije stanica usprkos jačoj adheziji tumorskih stanica (93). Primjerice, kod karcinoma pluća ne-malih stanica smatra se da je pojačano izražen plakofilin 3 vezan uz napredovanje tumora, povećan motilitet stanica i proces invazije tumora putem aktivacije određenih signalnih puteva ili preko utjecaja na staničnu adheziju (84).

Promjene u arhitekturi citoskeleta i međustaničnoj adheziji su često prisutne u stanicama koje prolaze neoplastičnu transformaciju (139). Prema dosadašnjim spoznajama iz literature, plakofilin 3 je najvjerojatnije uključen u proces invazivnog tumorskog rasta i kroz utjecaj na staničnu adheziju. Plakofilini predstavljaju strukturalne komponente dezmosoma stanične membrane te stabiliziraju i jačaju adheziju stanica kroz povezanost dezmosomalnih kadherina (dezmokolin, dezmoglein) s intermedijarnim filamentima preko proteinskog kompleksa sastavljenog od plakoglobina, plakofilina i dezmoplakina (88,144). Plakofilin dolazi u interakciju s ovim komponentama: dezmogleinom, dezmokolinom, plakoglobinom, citokeratinom 18 i dezmoplakinom (145) i smatra se vrlo važnom komponentom za održavanje strukture i funkcije dezmosoma (130). Gubitak plakofilina 3 vodi do promjena u staničnoj adheziji, odnosno smanjenja iste, pridonosi povećanoj staničnoj sposobnosti migracije što omogućuje širenje i metastaziranje tumora (130) u nekim tipovima tumora, dok pojačano izražen plakofilin 3 kao slučaju DMPM-a najvjerojatnije pridonosi invazivnijem rastu DMPM-a kroz utjecaj na transkripciju i translaciju. Ustanovljeno je i da plakofilin 3 ima frakciju koja je stabilna u dezmosomalnom plaku dok se ostatak plakofilina 3 dinamički izmjenjuje s onim u citoplazmi što također utječe na staničnu adheziju. Pojačana izmjena plakofilina 3 u dezmosomu vodi do smanjenja jačine adhezije

dezmosoma te do većeg stupnja migracije stanica (95). Ovaj proces bi mogao biti važan u metastaziranju tumora i možda bitan u našem slučaju širenja DMPM- a. Gubitak plakofilina 3 vodi do povišenja razina PRL3 kroz regulaciju procesa translacije PRL3 ili preko utjecaja na dezmosomalnu signalizaciju što rezultira napredovanjem tumora, odnosno većim stupnjem migracije, transformacije i metastaziranja kao u slučaju karcinoma debelog crijeva i slučaju humanog oralnog pločastog karcinoma. Ovakvo povišenje razine PRL3 najvjerojatnije mijenja posttranslacijske modifikacije intermedijarnih filamenata kao i način na koji ovi filamenti komuniciraju s aktinskim citoskeletom kroz utjecaj na signaliziranje putem integrina. Smatra se da bi posttranslacijske modifikacije keratina mogle biti prediktori metastatske bolesti (139).

Kako bi se ispitalo koja je lokalizacija plakofilina 3, citoplazmatska ili membranska predominantna u uzorcima tumora s histološki procijenjenim širenjem u vezivo te mast i/ili skeletni mišić, ispitan je c/m omjer u DMPM- u s obzirom da su Takahashi i al. pokazali da je plakofilin 3 bio predominantno izražen u citoplazmi i u manjoj mjeri u plazma membrani invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura (99). U ovom istraživanju nije nađena statistička značajnost kada je koreliran c/m omjer s histološki procijenjenim širenjem DMPM-a što bi moglo označavati mogućnost da su i citoplazmatska i membranska lokalizacija plakofilina 3 podjednako bitne za širenje tumora.

Prema dosadašnjim saznanjima iz literature, studije koje bi istraživale prognostičku vrijednost plakofilina 3 u difuznom malignom pleuralnom mezoteliomu dosad nisu rađene te je ovo istraživanje prvo koje se bavi ovom problematikom, no smatramo da je potrebno analizirati veći broj uzoraka uključujući glavne tipove ovog tumora, kao i veći broj uzoraka svih podtipova kako bi se sa većom sigurnošću mogla odrediti prognostička vrijednost plakofilina 3.

U ovom radu je pokazano da DMPM pokazuje citoplazmatsku i membransku ekspresiju plakofilina 3, dobiveni rezultati sugeriraju da pojačana ekspresija ovog proteina možda ima važnu ulogu faktora koji pridonosi širenju DMPM-a u okolna tkiva, no potrebna su daljnja istraživanja koja uključuju veći broj pacijenata kako bi se potvrdile naše pretpostavke, ali i kako bi se odredilo je li plakofilin 3 moguća terapijska molekula u DMPM liječenju s obzirom na činjenicu da su trenutna istraživanja DMPM- a usredotočena na otkrivanje specifičnih tumorskih gena i njihovih produkata s ciljem otkrivanja novih lijekova visoke specifičnosti prema malignim stanicama uz minimalne nuspojave s obzirom na njihove dobro definirane mehanizme djelovanja (84).

7. ZAKLJUČCI

1. Prisutna je statistički značajna povezanost između intenziteta membranskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, u odnosu na širenje u mast i/ili skeletni mišić u slučaju svih uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma, odnosno uzorci sa širenjem u mast i/ ili skeletni mišić pokazali su veći intenzitet membranskog obojenja.
2. Prisutna je statistički značajna povezanost između intenziteta citoplazmatskog bojenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić u slučaju svih uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma, odnosno uzorci sa širenjem u mast i/ili skeletni mišić pokazali su veći intenzitet citoplazmatskog obojenja.
3. Prisutna je statistički značajna povezanost između intenziteta citoplazmatskog bojenja i izloženosti azbestu prilikom analize svih uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma, odnosno kod osoba izloženih azbestu prisutna je veća citoplazmatska imunoreaktivnost, no nije nađena značajna povezanost između membranskog obojenja i izloženosti azbestu.
4. Nije nađena statistički značajna povezanost između histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić i izloženosti azbestu u slučaju svih uzoraka difuznog malignog pleuralnog mezotelioma i 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma.
5. Nije nađena statistički značajna povezanost histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić i c/m omjera te c/m omjera i duljine preživljenja u svim uzorcima mezotelioma i podtipovima epiteloidnog mezotelioma.
6. Nije pokazana statistički značajna razlika u duljini preživljenja između spolova, kao ni s obzirom na klinički stadij bolesti između 4 podtipa epiteloidnog mezotelioma.

7. Nije nađena značajna povezanost intenziteta plakofilin 3 citoplazmatske i membranske imunoreaktivnosti s brojem dana preživljenja u svim uzorcima mezotelioma, također nije pokazana statistički značajna razlika u intenzitetu membranske i citoplazmatske plakofilin 3 imunoreaktivnosti između podtipova epiteloidnog mezotelioma.
8. Nije pronađena statistički značajna povezanost kliničkog stadija i citoplazmatske i membranske imunoreaktivnosti u uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.
9. Nije pokazana statistički značajna povezanost između izloženosti azbestu i dobi otkrivanja bolesti, kao ni između izloženosti azbestu i duljini preživljenja u svim uzorcima difuznog malignog pleuralnog mezotelioma.
10. Nije utvrđena značajna razlika u dobi otkrivanja bolesti, kao ni u duljini preživljenja i histološki procijenjenog širenja u vezivo, odnosno mast i/ili skeletni mišić.

8. SAŽETAK

Difuzni maligni pleuralni mezoteliom (DMPM) je najčešća primarna maligna neoplazma pleure i predstavlja dijagnostički, prognostički i terapijski izazov. Plakofilin 3 je protein te je sastavni dio dezmosoma složenog i jednostavnog epitela zdravih tkiva, ali i malignih stanica različitih tumora te pridonosi procesu tumorigeneze. Cilj ovog istraživanja je istražiti izraženost plakofilina 3 u DMPM- u, njegovu prognostičku vrijednost i povezanost s histološki procijenjenim širenjem tumora. Korišteno je 100 arhivskih uzoraka DMPM-a, klasificirano u 3 glavna tipa DMPM-a (epiteloidni, sarkomatoidni, bifazični) i podtipove epiteloidnog mezotelioma na temelju prevladavajuće histološke komponente. Nakon imunohistokemijskog bojenja, analiziran je intenzitet bojenja plakofilina 3 u membrani i citoplazmi te bodovan od 0 (nema bojenja) do 4 (izrazito jako bojenje). Upotrebom neparametrijskih testova analizirana je prognostička vrijednost i izraženost plakofilina 3 obzirom na histološki procijenjeno širenje tumora. Rezultati pokazuju da je plakofilin 3 bio bolje izražen u uzorcima s histološki procijenjenim širenjem tumora u masno tkivo i/ili skeletni mišić, u odnosu na uzorke sa širenjem u vezivo, dok prognostički značaj nije pokazan. Na temelju ovog istraživanja možemo zaključiti da plakofilin 3 koordinira u procesu širenja DMPM-a.

9. SUMMARY

Title: Expression of plakophilin 3 in diffuse malignant pleural mesothelioma

Silvija Mašić, MD; 2018

Diffuse malignant pleural mesothelioma (DMPM) is the most common primary malignant pleural neoplasm which implies diagnostic, prognostic and therapeutic challenges. Plakophilin 3 is a protein incorporated in desmosomes of stratified and simple epithelia of healthy tissues, but also malignant cells of various tumors where it contributes to process of tumorigenesis. This study aimed to investigate expression of plakophilin 3 in DMPM, its prognostic significance and connection to histological parameters of tumor spread. Used were 100 archival samples of DMPM tissue and classified into three histological types of DMPM (epithelioid, sarcomatoid, biphasic). Additional subclassification of epithelioid mesotheliomas based on the prevalent histological component of the tumor was performed. After immunohistochemical staining, cytoplasmic and membranous tumor cells immunopositivity was assessed by scoring the intensity of staining from 0 (no staining) to 4 (very strong staining). Prognostic value and expression of plakophilin 3 with consideration to histologically estimated tumor spread were statistically analyzed using non- parametric tests. The results demonstrated higher level of plakophilin 3 expression in tumor samples with histologically estimated spread to fatty tissue and/ or skeletal muscle. Prognostic value was not statistically significant. This research suggests plakophilin 3 to be involved in tumor spread of DMPM.

10. POPIS LITERATURE

- 1.Mescher AL. Junqueira's basic histology. 12th ed. Singapore: The McGraw- Hill Company, Inc; 2010.
- 2.Damjanov I, Jukić S. Specijalna patologija. 1st ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
- 3.Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. 7th ed. Zagreb: Školska knjiga; 1999.
- 4.Grbac I, Stančić V, Bačić- Grbac M, Jurman D. Pleural Pathophysiology. Acta Clin Croat. 2002;41(1):57-63.
- 5.Broaddus VC, Everitt JI, Black B, Kane AB. Non- neoplastic and neoplastic pleural endpoints following fiber exposure. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2011;14(1-4):153-78.
- 6.Sureka B, Thukral BB, Mittal BK, Mittal A, Sinha M. Radiological review of pleural tumors. Indian J Radiol Imaging. 2013;23(4):313- 20.
- 7.De Paoli L, Quaia E, Poillucci G, Gennari A, Assunta Cova M. Imaging characteristics of pleural tumors. Insights Imaging. 2015;6(6):729-40.
- 8.Carrillo BJA, Navarrete C, Lopez Arias MA, Pelaez M. Primary pleural liposarcoma, pleomorphic variant. J Thorac Dis. 2014 Sep;6(9):E166-8. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.07.30
- 9.McPhee SJ, Papadakis MA, Rabow MW. Current Medical Diagnosis & Treatment. 15 th ed. USA: McGraw- Hill Companies; 2011.
- 10.Zhang W, Wu X, Wu L, Zhang W, Zhao X. Advances in the diagnosis, treatment and prognosis of malignant pleural mesothelioma. Ann Transl Med. 2015;3(13):182-90.
- 11.Del Gobbo A, Fiori S, Gaudio G, Bonaparte E, Tabano S, Palleschi A i sur. Synchronous pleural and peritoneal malignant mesothelioma: a case report and review of literature. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(5):2484-9.

12. Klebe S, Griggs K, Cheng Y, Driml J, Henderson DW, Reid G. Blockade of aquaporin 1 inhibits proliferation, motility, and metastatic potential of mesothelioma in vitro but not in an in vivo model. *Disease Markers*. 2015;2015:1-9.
13. Rea F, Favaretto A, Marulli G, Spaggiari L, DePas TM, Ceribelli A i sur. Phase II of neoadjuvant Pemetrexed plus Cisplatin followed by surgery and radiation in the treatment of pleural mesothelioma. *BMC Cancer*. 2013;13:22-30.
14. Arrossi AV, Lin E, Rice D, Moran CA. Histologic assessment and prognostic factors of malignant pleural mesothelioma treated with extrapleural pneumonectomy. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(5):754-64.
15. Ai J, Stevenson JP. Current issues in malignant pleural mesothelioma evaluation and management. *The Oncologist*. 2014;19(9):975-84.
16. Hirata T, Zheng Q, Chen Z, Kinoshita H, Okamoto J, Kratz J i sur. Wnt7A is a putative prognostic and chemosensitivity marker in human malignant pleural mesothelioma. *Oncol Rep*. 2015;33(4):2052-60.
17. Zardawi SJ, Li BT, Zauderer MG, Wang JW, Atmore BB, Barnes TA i sur. Localized malignant pleural mesothelioma with renal metastasis. *Oxf Med Case Reports*. 2015; 2015(1):170-2.
18. Robinson BWS, Lake RA. Advances in Malignant Mesothelioma. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1591-603.
19. Tsuchiya A, Kaku Y, Nakano T, Nishizaki T. Diarachidonoylphosphoethanolamine induces apoptosis of malignant pleural mesothelioma cells through a Trx/ASK1/ p38 MAPK pathway. *J Pharmacol Sci*. 2015;129(3):160-8.
20. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1413-9.
21. Vinicius Monteiro de Assis L, Cesar Isoldi M. Overview of the biochemical and genetic processes in malignant mesothelioma. *J Bras Pneumol*. 2014;40(4):429-42.
22. Cho JH, Lee SJ, Oh AY, Yoon MH, Woo TG, Park BJ. NF2 blocks Snail-mediated p53 suppression in mesothelioma. *Oncotarget*. 2015;6(12):10073-85.

23. Pinton G, Manente AG, Daga A, Cilli M, Rinaldi M, Nilsson S i sur. Agonist activation of estrogen receptor beta (ER β) sensitizes malignant pleural mesothelioma cells to cisplatin cytotoxicity. *Mol Cancer*. 2014;13:227-41.
24. Desouki MM, Long DJ. Malignant mesothelioma mimicking invasive mammary carcinoma in a male breast. *Case Rep Oncol*. 2015;2015.
doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2015/298523>
25. Kanbay A, Simsek ZO, Tutar N, Yilmaz I, Buyukoglan H, Canoz O i sur. Non-asbestos-related malignant pleural mesothelioma. *Intern Med*. 2014;53(17):1977-9.
26. Faig J, Howard S, Levine EA, Casselman G, Hesdorffer M, Ohar JA. Changing pattern in malignant mesothelioma survival. *Transl Oncol*. 2015;8(1):35-9.
27. Mansfield AS, Symanowski JT, Peikert T. Systematic review of response rates of sarcomatoid malignant pleural mesotheliomas in clinical trials. *Lung Cancer*. 2014;86(2):133-6.
28. Pasello G, Urso L, Mencoboni M, Grosso F, Ceresoli GL, Lunardi F i sur. MDM2 and HIF1 alpha expression levels in different histologic subtypes of malignant pleural mesothelioma: correlation of pathologic and clinical data. *Oncotarget*. 2015;6(39):42053-66.
29. Neumann V, Löseke S, Nowak D, Herth FJF, Tannapfel A. Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health. *Dtsch Arrztebl Int*. 2013;110(18):319-26.
30. Gregoire M. What's the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments? *Cell Adh Migr*. 2010;4(1):153-61.
31. Ambroggi M, Orlandi E, Foroni RP, Cavanna L. Malignant pleural mesothelioma metastatic to the submandibular salivary gland, simulating glandular hypertrophy, diagnosed by fine-needle aspiration biopsy: a case report and literature review. *World J Surg Oncol*. 2014;12:129-34.

32. Yaguchi D, Ichikawa M, Inoue N, Kobayashi D, Matsuura A, Shizu M i sur. An autopsied case of malignant sarcomatoid pleural mesothelioma in which chest pain developed several months earlier without abnormality on imaging. *Case Rep Oncol.* 2015;8(3):439-46.
33. Mineo TC, Ambrogi V. Malignant pleural mesothelioma: factors influencing the prognosis. *Oncology (Williston Park).* 2012;26(12):1164-75.
34. Neumann V, Löseke S, Nowak D, Herth FJ.F, Tannapfel A. Malignant pleural mesothelioma. *Dtsch Arrztebl Int.* 2013;110(18):319-26.
35. Tischoff I, Neid M, Neumann V, Tannapfel A. Pathohistological diagnosis and differential diagnosis. *Recent Results Canc Res.* 2011;189:57-78.
36. Ahmed I, Tipu SA, Ishtiaq S. Malignant mesothelioma. *Pak J Med Sci.* 2013;29(6):1433-8.
37. Brčić L, Jakopović M, Brčić I, Klarić V, Milošević M, Sepac A i sur. Reproducibility of histological subtyping of malignant pleural mesothelioma. *Virchows Arch.* 2014; 465(6):679-85.
38. Tagawa T, Anraku M, Morodomi Y, Takenaka T, Okamoto T, Takenoyama M i sur. Clinical role of a new prognostic score using platelet-to-lymphocyte ratio in patients with malignant pleural mesothelioma undergoing extrapleural pneumonectomy. *J Thorac Dis.* 2015;7(11):1898-906.
39. Opitz I. Management of pleural mesothelioma- the European experience. *J Thorac Dis.* 2014;6(2):S238- 52.
40. Berardi R, Caramanti M, Fiordoliva I, Morgese F, Savini A, Rinaldi S i sur. Hyponatremia is a predictor of a clinical outcome for malignant pleural mesothelioma. *Support Care Cancer.* 2015;23(3):621-6.
41. Yan TD, Cao CQ, Boyer M, Tin MM, Kennedy C, McLean J i sur. Improving survival results after surgical management of malignant pleural mesothelioma : an Australian institution experience. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;17:243-9.

42. Gelvez- Zapata SM, Gaffney D, Scarci M, Coonar AS. What is the survival after surgery for localized malignant pleural mesothelioma? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;16(4):533-7.
43. Kircheva DY, Husain A, Watso S, Armato S, Kindler H, Vigneswaran WT. Tumor volume is an independent predictor of survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Cardiothorac Surg.* 2015;10(1):A48.
44. Pompeo E, Albonici L, Doldo E, Orlandi A, Manzari V, Modesti A i sur. Placenta Growth Factor expression has prognostic value in malignant pleural mesothelioma. *Ann Thorac Surg.* 2009;88:426-31.
45. Baldi A, Santini D, Vasaturo F, Santini M, Vicidomini G, Pia Di Marino D i sur. Prognostic significance of cyclooxygenase- 2 (COX- 2) and expression of cell cycle inhibitors p21 and p27 in human pleural malignant mesothelioma. *Thorax.* 2004;59(5):428-33.
46. Kao SC, Armstrong N, Condon B, Griggs K, McCaughan B, Maltby S i sur. Aquaporin 1 is independent prognostic factor in pleural malignant mesothelioma. *Cancer.* 2012;118(11):2952-61.
47. Jennings CJ, O' Grady A, Cummins R, Murer B, Al- Alawi M, Madden SF i sur. Sustained expression of steroid receptor coactivator SRC- 2/ TIF- 2 is associated with better prognosis in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2012;7(1):243-8.
48. Baldi A, Mottolese M, Vincenzi B, Campioni M, Mellone P, Di Marino M i sur. The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma. *Pharmacogenomics.* 2008;9(8):1069-77.
49. Ismail HM, Nouh MA, Abulkheir IL, Abd El- Rahman Ael-R, Tawfik HN. Pleural mesothelioma: diagnostic problems and evaluation of prognostic factors. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006;18(4):303-10.
50. Linch M, Gennatas S, Kazikin S, Iqbal J, Gunapala R, Priest K i sur. A serum mesothelin level is a prognostic indicator for patients with malignant mesothelioma in routine clinical practice. *BMC Cancer.* 2014;14:674-80.

51. Mundt F, Heidari- Hamedani G, Nilsonne G, Metintas M, Hjerpe A, Dobra K. Diagnostic and prognostic value of soluble syndecan-1 in pleural malignancies. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/419853>
52. Creaney J, Dick IM, Meniawy TM, Leong SL, Leon JS, Demelker Y i sur. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax.* 2014;69(10):895-902.
53. Ortolan E, Giacomino A, Martinetto F, Morone S, Lo Buono N, Ferrero E i sur. CD 157 enhances malignant pleural mesothelioma aggressiveness and predicts poor outcome. *Oncotarget.* 2014;5(15):6191-205.
54. Doi T, Maniwa Y, Tanaka Y, Tane S, Hashimoto S, Ohno Y i sur. MT1- MMP plays an important role in an invasive activity of malignant pleural mesothelioma cell. *Exp Mol Pathol.* 2011;90(1):91-6.
55. Mairinger FD, Walter RF, Ting S, Vollbrecht C, Kollmeier J, Griff S i sur. Mdm2 protein expression is strongly associated with survival in malignant pleural mesothelioma. *Future Oncol.* 2014;10(6):995-1005.
56. Kadota K, Suzuki K, Colovos C, Sima CS, Rusch VW, Travis WD i sur. A nuclear grading system is a strong predictor of survival in epitheloid diffuse malignant pleural mesothelioma. *Mod Pathol.* 2012;25(2):260-71.
57. Cedres S, Ponce- Aix S, Zugazagoitia J, Sansano I, Enguita A, Navarro-Mendivil A i sur. Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *PLoS ONE.* 2015 March;10(3):e0121071. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121071>
58. Fujimoto N, Ohnuma K, Aoe K, Hosono O, Yamada T, Kishimoto T i sur. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. *PLoS ONE.* 2014 Dec;9(12):e115647. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115647>
59. Mansfield AS, Roden AC, Peikert T, Sheinin YM, Harrington SM, Krco CJ i sur. B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis. *J Thorac Oncol.* 2014;9(7):1036-40.

60. Cihan Benderli Y, Ozturk A, Arslan A, Deniz K, Baran M, Karaca H. ERCC1 as a biological marker guiding management in malignant pleural mesothelioma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(10):4117-23.
61. Williams M, Kirschner MB, Yee Cheng Y, Hanh J, Weiss J, Mugridge N i sur. miR-193a- 3p is a potential tumor suppressor in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget.* 2015;6(27):23480-95.
62. Lamberti M, Capasso R, Lombardi A, DI Domenico M, Fiorelli A, Feola A i sur. Two different serum MiRNA signatures correlate with the clinical outcome and histological subtype in pleural malignant mesothelioma patients. *PLoS ONE.* 2015 Aug;10(8):e0135331. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135331>
63. Bonomi M, De Fillipis C, Lopci E, Gianoncelli L, Rizzardi G, Cerchiaro E i sur. Clinical staging of malignant pleural mesothelioma: current perspectives. *Lung Cancer: Targets and Therapy.* 2017;8:127-39.
64. Cornelissen R, Lieverse LA, Maat AP, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Bogers AJ i sur. Ratio of intratumoral macrophage phenotypes is a prognostic factor in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *PLoS ONE.* 2014 Sep;9(9):e106742. doi:10.1371/journal.pone.0106742
65. Ahn S, Choi IH, Han J, Kim J, Ahn MJ. Pleural mesothelioma: an institutional experience of 66 cases. *Korean J Pathol.* 2014;48(2):91-9.
66. Morr  DJ, Hostetler B, Taggart DJ, Morr  DM, Musk AW, Robinson BW i sur. ENOX2-based early detection (ONCOblot) of asbestos-induced malignant mesothelioma 4-10 years in advance of clinical symptoms. *Clin Proteomics.* 2016;13:2-10.
67. Van Zandwijk N, Clarke C, Henderson D, Musk AW, Fong K, Nowak A i sur. Guidelines for the diagnosis and treatment of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Dis.* 2013;5(6):E254-E307.
68. Weder W, Opitz I. Multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg.* 2012;1(4):502-7.

69. Taioli E, Wolf AS, Camacho-Rivera M, Kaufman A, Lee DS, Nicastri D i sur. Determinants of survival in malignant pleural mesothelioma: a surveillance, epidemiology, and end results (SEER) Study of 14,228 patients. *PLoS One*. 2015 Dec;10(12):e0145039. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145039>
70. Papaspyros S, Papaspyros S. Surgical management of malignant pleural mesothelioma: impact of surgery on survival and quality of life-relation to chemotherapy, radiotherapy and alternative therapies. *ISRN Surg*. 2014;2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/817203>
71. Ak G, Metintas S, Akarsu M, Metintas M. The effectiveness and safety of platinum- based pemetrexed and platinum- based gemcitabine treatment in patients with malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer*. 2015;15:510-6.
72. Nowak AK. Chemotherapy for malignant pleural mesothelioma: a review of current management and a look to the future. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1(4):508-15.
73. Fahrner R, Ochsenbein A, Schmid RA, Carboni GL. Long term survival after trimodal therapy in malignant pleural mesothelioma. *Swiss Med Wkly*. 2012 Oct;142:w13686. doi: 10.4414/smw.2012.13686
74. Simone CB 2nd, Cengel KA. Photodynamic therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma. *Semin Oncol*. 2014;41(6):820-30.
75. Miluzio A, Oliveto S, Pesce E, Mutti L, Murer B, Grosso S i sur. Expression and activity of eIF6 trigger malignant pleural mesothelioma growth in vivo. *Oncotarget*. 2015;6(35):37417-85.
76. Achard C, Boisgerault N, Delaunay T, Roulois D, Nedellec S, Royer PJ i sur. Sensitivity of human pleural mesothelioma to oncolytic measles virus depends on defects of the type I interferon response. *Oncotarget*. 2015; 6(42):44892-904.
77. Viti A, Bertolaccini L, Terzi A. Biologic therapy and gene therapy in the multimodality treatment of malignant pleural mesothelioma. *Ann Transl Med*. 2015;3(17):248-53.

- 78.Cao C. MPM: Malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg.* 2012;1(4):544.
- 79.Chen J, Li Z, Xu N, Zhang X, Wang Y, Lin D. Efficacy of medical thoracoscopic talc pleurodesis in malignant pleural effusion caused by different types of tumors and different pathological classifications of lung cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):18945-53.
- 80.Kadota K, Suzuki K, Sima CS, Rusch VW, Adusumili PS, Travis WD. Pleomorphic epithelioid diffuse malignant pleural mesothelioma. A clinicopathological review and conceptual proposal to reclassify as biphasic or sarcomatoid mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(5):896-904.
- 81.Allen TC. Recognition of histopathologic patterns of diffuse malignant mesothelioma in differential diagnosis of pleural biopsies. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(11):1415-20.
- 82.Butnor KJ. My approach to the diagnosis of the mesothelial lesions. *J Clin Pathol.* 2006;59(6):564-74.
- 83.Neuber S, Mühmer M, Wratten D, Koch PJ, Moll R, Schmidt A. The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010. doi:10.1155/2010/101452
- 84.Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Ito T, Tsuchiya E i sur. Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7102-10.
- 85.Hatzfeld M. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(1):69-77.
- 86.Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10512-22.
- 87.Todorović V, Koetsier JL, Godsel LM, Green KJ. Plakophilin 3 mediates Rap 1-dependent desmosome assembly and adherens junction maturation. *Mol Biol Cell.* 2014;25(23):3749-64.

88. Bass-Zubek AE, Godsel LM, Delmar M, Green KJ. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(5):708-16.
89. Hatzfeld M. A nuclear function for plakophilin- 1 in the DNA damage response? *J Invest Dermatol.* 2010;130(11):2538-40.
90. Bonne S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F. Plakophilin-3, a novel Armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci.* 199;112(14):2265-76.
91. Demirag GG, Sullu Y, Gurgenyatagi D, Okumus NO, Yucel I. Expression of Plakophilins (PKP1, PKP 2 and PKP 3) in gastric cancers. *Diagn Pathol.* 2011;6:1-5.
92. Schwarz J, Ayim A, Schmidt A, Jager S, Koch S, Baumann R i sur. Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation. *Hum Pathol.* 2006;37(5):613-22.
93. Wolf A, Hatzfeld M. A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle.* 2010;9(15):2973-78.
94. Hofmann I, Casella M, Schnolzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW. Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA- binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell.* 2006;17(3):1388-98.
95. Roberts BJ, Reddy R, Wahl JK 3rd. Stratifin (14-3-3 delta) limits plakophilin- 3 exchange with the desmosomal plaque. *PLoS ONE.* 2013 Oct;8(10):e77012. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077012>
96. Munoz WA, Lee M, Miller RK, Ahmed Z, Ji H, Link TM i sur. Plakophilin- 3 catenin associates with the ETV1/ ER81 transcription factor to positively modulate gene activity. *PLoS ONE.* 2014 Jan;9(1):e86784. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086784>
97. Wolf A, Krause- Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck- Lederer A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M. Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol.* 2010;188(4):463-71.

98. Fischer- Kešo R, Breuninger S, Hofmann S, Henn M, Röhrig T, Ströbel P i sur. Plakophilins 1 and 3 bind to FXR 1 and thereby influence the mRNA stability of desmosomal proteins. *Mol Cell Biol.* 2014; 34(23):4244-56.
99. Takahashi H, Nakatsuji H, Takahashi M, Avirmed S, Fukawa T, Takemura M i sur. Up- regulation of plakophilin -2 and down- regulation of plakophilin- 3 are correlated with invasiveness in bladder cancer. *Urology.* 2012;79(1):240.e1-8.
100. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):1-17.
101. Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP i sur. Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell- cell borders. *J Cell Sci.* 2010;114(4):727-38.
102. Valladares- Ayerbes M, Diaz- Prado S, Reboredo M, Medina V, Lorenzo- Patino MJ, Iglesias- Diaz P i sur. Evaluation of plakophilin- 3 mRNA as a biomarker for detection of circulating tumor cells in gastrointestinal cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(6):1432-40.
103. Munoz WA, Kloc M, Cho K, Lee M, Hofmann I, Sater A i sur. Plakophilin-3 is required for late embryonic amphibian development, exhibiting roles in ectodermal and neural tissues. *PLoS ONE* 2012 April;7(4):e 34342. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034342>
104. Carnahan RH, Rokas A, Gaucher EA, Reynolds AB. The molecular evolution of the p120- catenin subfamily and its functional associations. *PLoS ONE.* 2010 Dec;5(12):e15747. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015747>
105. Kaz AM, Luo Y, Dzieciatkowski S, Chak A, Willis JE, Upton MP i sur. Aberrantly methylated PKP1 in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(4):384-93.
106. Wolf A, Rietscher K, Glass M, Huettelmaier S, Schutkowski M, Ihling C i sur. Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *J Cell Sci.* 2013;126(8):1832-44.

107. Koetsier JL, Amargo EV, Todorovic V, Green KJ, Godsel LM. Plakophilin 2 affects cell migration by modulating focal adhesion dynamics and integrin protein expression. *J Invest Dermatol.* 2014;134(1):112-22.
108. Rickelt S, Rizzo S, Doerflinger Y, Zentgraf H, Basso C, Gerosa G i sur. A novel kind of tumor type- characteristic junction: plakophilin -2 as a major protein of adherens junctions in cardiac myxomata. *Mod Pathol.* 2010;23(11):1429-37.
109. Rickelt S. Plakophilin-2: a cell- cell adhesion plaque molecule of selective and fundamental importance in cardiac functions and tumor cell growth. *Cell Tissue Res.* 2012;348(2):281-94.
110. Kirchner F, Schuetz A, Boldt LH, Martens K, Dittmar G, Haverkamp W i sur. Molecular insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 missense mutations. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(4):400-11.
111. Godsel LM, Dubash AD, Bass Zubek AE, Amargo EV, Klessner JL, Hobbs RP i sur. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell.* 2010;21(16):2844-59.
112. Kazlauskas A. Plakophilin- 2 promotes activation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 2014;34(20):3778-9.
113. Arimoto K, Burkart C, Yan M, Ran D, Weng S, Zhang D. Plakophilin- 2 promotes tumor development by enhancing ligand- dependent and – independent epidermal growth factor receptor dimerization and activation. *Mol Cell Biol.* 2014;34(20):3843-54.
114. Rasmussen TB, Nissen PH, Palmfeldt J, Gehmlich K, Dalager S, Jensen UB i sur. Truncating plakophilin-2 mutations in arrhythmogenic cardiomyopathy are associated with protein haploinsufficiency in both myocardium and epidermis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7(3):230-40.
115. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S i sur. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient- specific iPSCs. *Nature.* 2013;494(7435):105-10.

116. Alcalde M, Campuzano O, Berne P, Garcia- Pavia P, Doltra A, Arbelo E i sur. Stop- gain mutations in PKP2 are associated with later age of onset of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. PLoS ONE. 2014 June;9(6):e100560. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100560>
117. Adachi S, Isobe M. Plakophilin-2 gene could be a causative factor in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Circ J. 2012;76(1):51-2.
118. Gerull B. Skin- heart connection. What can epidermis tell us about the myocardium in arrhythmogenic cardiomyopathy?. Circ Cardiovasc Genet. 2014;7(3):225-7.
119. Hofmann I, Schlechter T, Kuhn C, Hergt M, Franke WW. Protein p0071- an armadillo plaque protein that characterizes a specific subtype of adherens junctions. J Cell Sci. 2009;122(1):21-4.
120. Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. J Cell Sci. 2003;116(7):1219-33.
121. Hofmann I, Kuhn C, Franke VW. Protein p0071, a major plaque protein of non-desmosomal adhering junctions, is a selective cell-type marker. Cell Tissue Res. 2008;334(3):381-99.
122. Setzer SV, Calkins CC, Garner J, Summers S, Green KJ, Kowalczyk AP. Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of A431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration. J Invest Dermatol. 2004;123(3):426-33.
123. Papagerakis S, Shabana AH, Depondt J, Gehanno P, Forest N. Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters. Hum Pathol. 2003;34(6):565-72.
124. Nahorski MS, Seabra L, Straatman- Iwanovska A, Wingefeld A, Reimann A, Lu X. Folliculin interacts with p0071(plakophilin-4) and deficiency is associated with disordered RhoA signaling, epithelial polarization and cytokinesis. Hum Mol Genet. 2012;21(24):5268-79.

125. Keil R, Hatzfeld M. The armadillo protein p0071 is involved in Rab11-dependent recycling. *J Cell Sci.* 2014;127(1):60-71.
126. Medvetz DA, Khabibullin D, Hariharan V, Ongusaha PP, Goncharova EA, Schlechter T i sur. Folliculin, the product of the Birt-Hogg-Dube tumor suppressor gene, interacts with the adherens junction protein p0071 to regulate cell-cell adhesion. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e47842. doi: 10.1371/journal.pone.0047842.
127. Breuninger S, Reidenbach S, Sauer CG, Strobel P, Pfitzenmaier J, Trojan L i sur. Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas. Implications for diagnosis and tumor progression. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2509-19.
128. Sklyarova T, Bonn e S, D'Hooge P, Denecker G, Goossens S, De Rycke R i sur. Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 2008;128(6):1375-85.
129. Thompson EW, Newgreen DF. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 2005;65(14):5991-5.
130. Kundu ST, Gosavi P, Khapare N, Patel R, Hosing AS, Maru GB i sur. Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis. *Int J Cancer.* 2008;123(10):2303-14.
131. Schmidt A, J ager S. Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur J Cell Biol.* 2005;84(2-3):189-204.
132. Demirag GG, Sullu Y, Yucel I. Expression of Plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers. *Med Oncol.* 2012;29(3):1518-22.
133. Lai-Cheong JE, Arita K, McGrath JA. Genetic diseases of junctions. *J Invest Dermatol.* 2007;127(12):2713-25.
134. McCrea PD, Gu D, Balda MS. Junctional music that the nucleus hears: cell-cell contact signaling and the modulation of gene activity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a002923. doi: 10.1101/cshperspect.a002923
135. Al-Jassar C, Bikker H, Overduin M, Chidgey M. Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases. *J Mol Biol.* 2013;425(21):4006-22.

136. South AP, Wan H, Stone MG, Dopping-Hepenstal PJ, Purkis PE, Marshall JF. Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci.* 2003;116(16):3303-14.
137. Stokes DL. Desmosomes from a structural perspective. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):565-71.
138. North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B i sur. Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci.* 1999;112(23):4325-36.
139. Khapare N, Kundu ST, Sehgal L, Sawant M, Priya R, Gosavi P i sur. Plakophilin 3 loss leads to an increase in PRL3 levels promoting K8 dephosphorylation, which is required for transformation and metastasis. *PLoS ONE.* 2012 Jun;7(6):e38561. doi: 10.1371/journal.pone.0038561
140. Roberts BJ, Johnson KE, McGuinn KP, Saowapa J, Svoboda RA, Mahoney MG i sur. Palmitoylation of plakophilin is required for desmosome assembly. *J Cell Sci.* 2014;127(17):3782-93.
141. Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol.* 2000;149(1):209-22.
142. Buchwalow IB, Böcker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods.* 1 st ed. Berlin:Springer Verlag; 2010.
143. Aigner K, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Dampier B, Bonne S i sur. The transcription factor ZEB 1 (δ EF1) represses plakophilin 3 during human cancer progression. *FEBS Lett.* 2007;581(8):1617-24.
144. Schmidt A, Koch PJ. Desmosomes- just cell adhesion or is there more? *Cell Adh Migr.* 2007;1(1):28- 32.
145. Bonne S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ, van Roy F. Defining desmosomal plakophilin -3 interactions. *J Cell Biol.* 2003;161(2):403-16.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.04.1984. godine u Varaždinu. Osnovnu školu završila sam u Vidovcu, a opću gimnaziju u Varaždinu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2002. godine, a završila ga 2008. godine.

Pripravnički staž odradila sam u Općoj bolnici Varaždin, a nakon položenog stručnog ispita 2010. godine radila sam u Zavodu za hitnu medicinu grada Varaždina.

Od 2012.- 2017. godine bila sam zaposlena u svojstvu liječnika u Nastavnom zavodu za hitnu medicinu grada Zagreba.

Od veljače 2017. zaposlena sam u Kliničkom bolničkom centru Sestre Milosrdnice kao specijalizant patologije i citologije.

Poslijediplomski znanstveni studij „Biomedicina i zdravstvo“ pohađala sam u razdoblju od 2011.- 2014. godine.

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

Autorica sam i koautorica više znanstvenih članaka koji su objavljeni u indeksiranim časopisima.

Aktivno se služim sa četiri strana jezika: engleskim, njemačkim, španjolskim i slovenskim jezikom.