

# KOMPARATIVNA ANALIZA MOLEKULARNIH BILJEGA TERATOKARCINOMA MIŠA I ČOVJEKA

---

**Buljubašić, Maja**

**Doctoral thesis / Doktorski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:002948>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Maja Buljubašić

**KOMPARATIVNA ANALIZA  
MOLEKULARNIH BILJEGA  
TERATOKARCINOMA U MIŠA I ČOVJEKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTEMENT OF BIOLOGY

Maja Buljubašić

**COMPARATIVE ANALYSIS OF  
MOLECULAR MARKERS IN  
TERATOCARCINOMA OF MICE  
AND MAN**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023

Ovaj je doktorski rad izrađen u Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u okviru Znanstevne grupe za istraživanje epigenetičkih biomarkera (epiMark), pod vodstvom mentora izv. prof. dr. sc. Nina Sinčića i komentorice doc. dr. sc. Monike Ulamec, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovu je disertaciju financirala Europska unija putem Europskog fonda za regionalni razvoj, konkurentnost i koheziju, prema sporazumu o dodjeli bespovratnih sredstava br. KK.01.1.1.01.0008, „Regenerativna i reproduktivna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“.



**Nino Sinčić**, rođen je 16. ožujka 1981. u Puli. Diplomirao je 2005. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je stekao stupanj doktora znanosti 2012. godine. Od 2006. godine zaposlen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Stručno se usavršavao u više navrata, posebice u suradnji s International Agency for Research on Cancer (Francuska). Znanstveno područje istraživanja uključuje primarno biologiju raka, razvojnu biologiju i epigenetiku. Od 2018. godine voditelj je znanstvene Grupe za istraživanje epigenetičkih biomarkera. Voditelj je elementa Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu te je voditelj, suradnik i konzultant na više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih projekata. Zamjenik je voditelja infrastrukturnog projekta Biomedicinskog istraživačkog centra Šalata. Ukupno ima do sada objavljenih 44 znanstvena rada u časopisima s međunarodnom recenzijom, više stručnih radova u stručnim časopisima, preko 100 kongresnih priopćenja i 20 pozvanih predavanja na nacionalnim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima. Član je organizacijskih i znanstvenih odbora mnogih nacionalnih i međunarodnih znanstvenih skupova. Mentor je 5 obranjenih doktorskih disertacija i više diplomskih radova. Nastavnu aktivnost provodi na više fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te povremeno na ostalim Sveučilištima u RH. Voditelj je kolegija ili suradnik na nekoliko kolegija na dodiplomskoj, diplomskoj i poslijediplomskoj razini na hrvatskim i engleskim studijima. Autor je više nastavnih tekstova, poglavlja u knjigama te urednik skripta. Obnaša više dužnosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u Hrvatskom društvu za biokemiju i molekularnu biologiju te u Federation of European Biochemical societies. Aktivan je član u više stručnih i znanstvenih nacionalnih i međunarodnih društava i asocijacija.

**Monika Ulamec**, zaposlena je kao docentica u kumulativnom radnom odnosu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te kao specijalist patologije u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Zagreb. Na spomenutom fakultetu stekla je stupanj doktora znanosti 2012.g., područje biomedicine i zdravstva. Od tada sudjeluje i u dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi. Koautorica je posljednjeg izdanja udžbenika iz patologije, poglavlja „Muški spolni sustav“ i „Endokrini organi“ te udžbenika Endokrinološka onkologija. Sudjelovala je kao prevoditelj i koordinator u prevođenju knjige: „Rosai and Ackermans Surgical Pathology“. Mentorica je i komentorka tri obranjene i pet doktorskih disertacija u izradi, na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Autorica je i koautorica 79 znanstvenih radova (WOS), 31 u posljednjih 5 godina (h-indeks:15) te više od 90 priopćenja i predavanja sa stručnih i znanstvenih skupova. Suradnica je na projekti financiranom sredstvima EU: istraživač u Centru Izvrsnosti za Reproductivnu i Regenerativnu Medicinu –istraživanja novih platformi i potencijala; Podjedinica: Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja; Element projekta 3: Epigenetika tumora zametnih stanica testisa- Šifra projekta: KK.01.1.1.01.0008. Kao suradnica je sudjelovala u realizaciji nedavno završenih znanstveno-istraživačkih projekata: „Epigenetički biomarkeri u krvi i ejakulatu bolesnika sa seminomom testisa“, voditelja prof. Ježeka, šifra projekta: IP-2016-06-3692, „Epigenetički biomarkeri raka prostate“, voditelja doc. Sinčića, šifra projekta: UIP 2017-05-8138, Projekt razvoja karijere, mentorstvo doktorandice. Kao recenzent je sudjeluje u radu stručnih časopisa: Biomolecules and Biomedicine, Journal of Health Sciences, Case Reports in Pathology, Virchow Archive, Cancers, Cells, cancer Cell International, Medicina, Croatian Medical Journal, Frontiers in Immunology-Cancer Immunity and Immunotherapy. Od 2012. godine je tajnica, a od 2018. i podpredsjednica organizacijskog odbora skupa Apoptoza i novotvorine pri Razredu za medicinske znanosti u Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti, a od 2018. je potpredsjednica istog skupa. Sudjeluje u organizacijama međunarodnog skupa patologa „Ljudevit Jurak“. Članica je Europskog društva patologa (ESP), Međunarodnog društva za urološku patologiju (ISUP), Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) i Hrvatskog društva patologa i sudskih medicinara te Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIS), kao i Europskog udruženja za istraživanje raka (EACR), Međunarodnog društva pedijatrijske patologije (SIOP), Hrvatskog i Europskog društva biokemije i molekularne biologije (HDBMB, FEBS).

**KOMPARATIVNA ANALIZA MOLEKULARNIH BILJEGA  
TERATOKARCINOMA MIŠA I ČOVJEKA**

MAJA BULJUBAŠIĆ

Etiologija i patogeneza tumora testisa čovjeka ostaju do danas nerazjašnjene. Ograničenom razumijevanju doprinosi i tendencija istraživanja primarno na humanom materijalu te *in vitro* sustavima. Eksperimentalni teratokarcinom miša jedan je od priznatijih animalnih modela za istraživanje tumora testisa. Međutim, opravdanost korištenja ovog modela temelji se isključivo na morfološkom profiliranju. Cilj ovog istraživanja bio je po prvi puta na molekularnoj razini sustavno analizirati i usporediti mišji model s humanim teratokarcinom, te testirati opravdanost upotrebe ovog animalnog modela. U tu svrhu analizirani su biljezi proliferacije, apoptoze, diferencijacije i matičnosti metodama imunohistokemije i Western blottinga. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša vjerno modelira teratokarcinom čovjeka ne samo na morfološkoj već i na molekularno biološkoj razini. Iz svega navedenog proizlazi da je eksperimentalni teratokarcinom miša pogodan za potrebe istraživanja razvoja teratokarcinoma čovjeka na molekularnoj razini, te da je njegova upotreba u znanstvenim istraživanjima opravdana.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

(101 stranica, 41 slika, 12 tablica, 117 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom)

Ključne riječi: Tumori testisa, teratokarcinom, animalni model, morfološko profiliranje, molekularno profiliranje

Mentor: Nino Sinčić, izv. prof. dr. sc.

Komentor: Monika Ulamec, doc. dr. sc.

Ocjenjivači:

Damjan, Franjević, Prof. dr. sc.

Ana, Katušić Bojanac, izv. Prof. dr. sc.

Davor, Ježek, Prof. dr. sc.



University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

## **COMPARATIVE ANALYSIS OF MOLECULAR MARKERS IN TERATOCARCINOMA OF MICE AND MAN**

MAJA BULJUBAŠIĆ

The etiology and pathogenesis of human testicular tumors remain unclear to this day, in part due to the trend of human material and *in vitro* systems research. Experimental mouse teratocarcinoma is one of the recognized animal models for testicular tumor research. However, the justification for using this model is based solely on the morphological profile. The goal of this research was to systematically analyze and compare the mouse model with human teratocarcinoma at the molecular level for the first time, and to test the justification of its use in research. For this purpose, markers of proliferation, apoptosis, differentiation and stemness were analyzed using immunohistochemistry and Western blotting. The results indicate that the animal model of experimental mouse teratocarcinoma faithfully models human teratocarcinoma not only at the morphological but also at the molecular level. From all of the above, it follows that experimental mouse teratocarcinoma is suitable for researching the development of human teratocarcinoma at the molecular level, and that its use in scientific research is justified.

School of Medicine University of Zagreb

(101 pages, 41 figures, 12 tables, 117 references, original in Croatian)

Keywords: Testicular tumours, teratocarcinoma, animal model, morphologic profiling, molecular profiling

Supervisor: Nino Sinčić, assoc. prof. Ph.D.

Co-supervisor: Monika Ulamec, assis. prof. Ph.D.

Reviewers:

Damjan, Franjević, Prof. dr. sc.

Ana, Katušić Bojanac, izv. Prof. dr. sc.

Davor, Ježek, Prof. dr. sc.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. SVRHA RADA	3
1.2. CILJ RADA	3
1.3. SPECIFIČNI CILJEVI	3
1.4. OPSEG RADA	4
1.5. METODE	4
1.6. POLAZNA HIPOTEZA	5
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b>	6
2.1. ANATOMIJA TESTISA	6
2.1.1. <i>Građa testisa</i>	6
2.1.2. <i>Vaskularna opskrba testisa</i>	8
2.1.3. <i>Inervacija testisa</i>	9
2.2. EMBRIONALNI RAZVOJ TESTISA	9
2.3. TUMORI TESTISA	11
2.3.1. <i>Etiologija tumora testisa</i>	11
2.3.2. <i>Epidemiologija</i>	12
2.3.3. <i>Klasifikacija</i>	13
2.3.4. <i>Liječenje</i>	17
2.4. GENETIČKE PROMJENE TZST	19
2.5. EPIGENETIKA I EPIGENETIČKI MEHANIZMI	22
2.5.1. <i>Metilacija DNA</i>	22
2.5.2. <i>Posttranslacijske modifikacije histona</i>	24
2.5.3. <i>RNA interferencija</i>	27
2.6. EPIGENETIKA TZST	27
2.6.1. <i>Epigenetika u razvoju TZST-a</i>	28
2.6.2. <i>Epigenetički biomarkeri TZST-a</i>	29
2.7. EKSPERIMENTALNI ANIMALNI MODEL TERATOKARCINOMA	31
2.7.1. <i>Eksperimentalni teratokarcinom miša</i>	31
2.8. MOLEKULARNI BILJEZI PROFILIRANJA TUMORA	32
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	33
3.1. UZORAK NA KOJEM JE IZVRŠENO TESTIRANJE	33
3.1.1. <i>Etička načela korištena u radu s laboratorijskim životinjama</i>	33
3.1.2. <i>Etička načela u radu s pacijentima regrutiranim u istraživanje</i>	34
3.2. POPIS I SASTAV UPORABLJENIH KEMIKALIJA	35
3.3. PRIBOR I APARATURA	37
3.4. METODE	37
3.4.1. <i>Izolacija zametaka miša</i>	37
3.4.2. <i>Transplantacija zametaka miša i razvoj eksperimentalnog TCa in vivo</i>	39
3.4.3. <i>Uzorkovanje humanog TCa</i>	40
3.4.4. <i>Metoda klasične histologije</i>	41
3.4.5. <i>Analiza ekspresije gena na razini proteina imunohistokemijskim modelom i mofometrijom</i>	41

3.4.6. <i>Analiza ekspresije gena na razini proteina metodom Western blottinga</i>	45
3.4.7. <i>Statistička obrada podataka</i>	49
<b>4. REZULTATI</b>	50
4.1. USPJEŠNOST IZAZIVANJA EKSPERIMENTALNOG TCa MIŠA	50
4.2. PROLIFERACIJSKA AKTIVNOST U TCa	51
4.3. APOPTOTIČKA AKTIVNOST U TCa	54
4.4. HISTOLOŠKA ANALIZA DIFERENCIJACIJE TKIVA U TCa	57
4.5. MOLEKULARNA ANALIZA DIFERENCIJACIJE TKIVA U TCa	61
4.5.1. <i>Ekspresija gena Nfh biljega neuronske i aksonske diferencijacije</i>	62
4.5.2. <i>Ekspresija gena Gfap biljega diferencijacije glijalnih stanica</i>	65
4.5.3. <i>Ekspresija gena CK15 biljega epidermalne diferencijacije</i>	68
4.5.4. <i>Ekspresija gena Nestin biljega diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica</i>	71
4.5.5. <i>Ekspresija gena Hnf4a biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica</i>	74
4.6. MOLEKULARNA ANALIZA PRISUTNOSTI TUMORSKIH STANICA MATIČNIH STANICA U TKIVU TCa	77
4.6.1. <i>Ekspresija gena matičnosti Nanog</i>	77
4.6.2. <i>Ekspresija gena matičnost Oct3/4</i>	80
<b>5. RASPRAVA</b>	84
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	90
<b>7. LITERATURA</b>	91
<b>8. ŽIVOTOPIS</b>	101

## 1. UVOD

Tumori testisa (TT) klasificirani su u rijetke tumore čovjeka i čine do 1,5% novodijagnosticiranih tumora svjetske muške populacije. Usprkos niskoj incidenciji, TT imaju specifičnu dobnu distribuciju incidencije gotovo isključivo u muškaraca između 20. i 45. godine života. Nadalje, dok je u afričkim populacijama i populacijama potomaka afričkih doseljenika relativno niska, incidencija TT najviša je u razvijenim zemljama zapadne i sjeverne Europe, poput Danske, te u populacijama potomaka europskih kolonizatora poput Australije i Sjedinjenih Američkih Država. Epidemiološka istraživanja upozoravaju da se incidencija u najzahvaćenijim populacijama udvostručila u posljednjih 40 godina, uz stabilni godišnji trend porasta od 3-6%. Navedeno stavlja TT u najčešće neoplastično oboljenje, a time i izniman medicinski, javnozdravstveni te socio-ekonomski problem mlade muške populacije indoeuropskog podrijetla diljem svijeta (1,2). Epidemiološko istraživanje provedeno 2012. na hrvatskoj populaciji potvrdilo je visoku incidenciju TT u mladim muškaraca u RH. Iako je trend porasta očekivan, usporedbom s objavljenim istraživanjima na populacijama diljem svijeta, autori su zaključili da hrvatska muška populacija pokazuje naj snažniji godišnji trend porasta incidencije TT u svijetu (3). Navedeni su podaci doprinijeli proaktivnijem pristupu istraživanju TT u okviru hrvatskog biomedicinskog kruga te formiranju znanstvene skupine za istraživanje TT unutar istraživačke jedinice (IJ) za biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja Znanstvenog centra izvrsnosti (ZCI) za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Termin TT odnosi se na tumore zametnih stanica testisa (TZST) koji čine 98% svih TT. TZST čine heterogenu skupinu tumora od kojih je svaki entitet specifičnog histološkog izgleda te se dijele na: 1) prepubertetske teratome i tumore žumanjčane vreće; 2) TZST adolescenata i mlade odrasle dobi; 3) spermatocitični tumori starije dobi. TZST adolescenata i mlade odrasle dobi koji će biti predmet ovog istraživanja dijele se u skupinu čistih seminomskih tumora i skupinu miješanih TZST (MTZST). U skupinu MTZST ubraja se teratokarcinom (TCa), a definiran je kao TZST građen od embrionalnog karcinoma i teratoma, koji se mogu pojaviti kao samostalne komponente ili u kombinaciji s nekim drugim oblicima iz te skupine. Stanice embrionalnog karcinoma (EC) smatraju se tumorskim matičnim stanicama i ishodišnom neoplazijom iz koje se mogu razviti ostali oblici MTZST (4). TCa pruža jedinstvenu sliku razvoja ishodišne lezije MTZST, odnosno EC, s tumorskim matičnim stanicama od kojih neke postepeno gube svojstvo matičnosti i nastavlja

proces diferencijacije u stanice teratoma. Stoga se istraživanje TCa smatra iznimno važnim za razumijevanje razvoja TT, ali i biologije tumora uopće (5). Kao mogući faktori rizika u patogenezi TT navode se kriptorhizam, neplodnost, testikularne traume, poremećaji razine testosterona i izlaganje ksenestrogenima. Međutim, svi do danas opisani faktori rizika predstavljaju čimbenike niske vrijednosti te nije dokazana njihova uzročna povezanost s razvojem MTZST (4). Navodi se da važnu ulogu u nastanku MTZST imaju kromosomske aberacije od kojih je najpoznatija izokromosom 12p (6,7). Pojedini autori opisuju sklonost stanica TT ka gubitku i Y kromosoma te uspostavi X0 kariotipa (8). Ipak, suvremena znanost priklanja se ideji da veća oštećenja genetičkog materijala prije doprinose progresiji nego inicijaciji TT te ih tumači kao sekundarne promjene genoma nakupljene tijekom same tumorigeneze (9). Genetičke mutacije koje se često spominju u kontekstu razvoja TT jesu mutacije gena *KIT*, *TP53*, *KRAS/NRAS* i *BRAF* (7,10). Propitkivanju genetičke hipoteze doprinosi relativno nedavno postavljena epigenetička hipoteza razvoja TT koja općenito osporava genetičke incidente kao pokretače tumorigeneze i promatra ih također kao sputnike kumulirane tijekom progresije (11). Međutim, ni ta hipoteza nije mogla dokazati uzročno-posljedičnu vezu epimutacija i inicijacije TT (12). Većina istraživanja TZST temelji se na istraživanju uzoraka humanih klinički manifestnih ili slučajno otkrivenih, ali već dobro razvijenih TT. Navedeni modeli nisu pogodni ni za istraživanje kaskade događanja niti uzročno posljedične veze među (epi)genetičkim incidentima tijekom tumorigeneze (13). Pored toga, rezultati se ne mogu eksperimentalno testirati. Modeli na staničnim, *in vitro* modelima podložniji su eksperimentalnom testiranju. Međutim, dobiveni su primarno kultiviranjem stanica tumora. Sukladno tome, (epi)genetička je pozadina takvih modela već narušena i kondicionirana u kontekstu tumorigeneze. Zaključno, takvi modeli nisu pogodni za identifikaciju, reprodukciju i eksperimentalno testiranje molekularnih poremećaja indukcije i progresije tumora u vremenu odnosno cjelovitom organizmu (14). Kako bi se formirala cjelovita slika razvoja tumora, potrebni su animalni modeli koji su informativni za neoplastičnu transformaciju zametnih stanica u TZST. Istraživanja razvoja TZST na *in vivo* modelima primarno se provode na mišjim modelima. Jedan od priznatijih je eksperimentalni model TCa miša kojeg su 1970. razvili Škreb, Solter i Damjanov na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (15). Ektopičnom transplantacijom zametnog štita zametka miša u stadiju gastrulacije pod čahuru bubrega singenične životinje, postigli su razvoj retransplantabilnog TCa s populacijom teratomske stanice i stanice EC. Upravo je nalaz EC stanice u tumorskom materijalu temeljna pretpostavka po kojoj se mišji model smatra adekvatnim

eksperimentalnim modelom TCa i za istraživanje TCa u čovjeka (16). Međutim, identifikacija EC stanica u eksperimentalnom TCa miša temelji se primarno na klasičnim histološkim analizama postavljenim prije gotovo 50 godina (16). Iako jeftina i jednostavna, ta se metoda temelji isključivo na morfološkim osobinama stanica, niske je osjetljivosti s obzirom na heterogenost tumora i malog udjela analiziranog tkiva, te je subjektivna. U međuvremenu, molekularni biljezi EC stanica kao i neki drugi molekularni biljezi povezani s tumorigenezom TZST u čovjeka, jasno su definirani (17). Međutim, do danas nije učinjena sustavna analiza i usporedba spontanog humanog odnosno eksperimentalnog mišjeg TCa na molekularnoj razini koja bi potvrdila ili odbacila relevantnost istraživanja na mišjem eksperimentalnom TCa u kontekstu tumorigeneze humanog TCa odnosno MTZST, a na tragu tendencije suvremene znanosti za opravdanim korištenjem životinja u istraživanjima biologije tumora (13).

### **1.1 Svrha rada**

Ovaj rad je izrađen u svrhu sustavne analize i usporedbe, na morfološkoj i molekularnoj razini, humanog teratokarcinoma (TCa) testisa i mišjeg modela TCa kako bi se utvrdila moguća pogodnost animalnog modela za istraživanje tumorigeneze spontanog tumora zametnih stanica testisa u čovjeka, dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera te uspostavu novih terapijskih pristupa.

### **1.2 Cilj rada**

Opći cilj ovog istraživanja je ustanoviti, temeljem analize i usporedbe bioloških markera, dali je eksperimentalni teratokarcinom miša, dobiven ektopičnom transplantacijom singeničnog zametka, pogodan animalni model za istraživanje teratokarcinoma čovjeka.

### **1.3 Specifični ciljevi**

1. Ustanoviti i usporediti proliferacijsku aktivnost u teratokarcinomu miša i čovjeka.
2. Ustanoviti i usporediti apoptotsku aktivnost u teratokarcinomu miša i čovjeka.
3. Ustanoviti i usporediti prisutnost organotipičnih struktura u teratokarcinomu miša i čovjeka.
4. Ustanoviti i usporediti diferencijacijsku aktivnost u teratokarcinomu miša i čovjeka.

5. Ustanoviti i usporediti prisutnost matičnih tumorskih stanica u teratokarcinomu miša i čovjeka.

#### **1.4 Opseg rada**

Ovo istraživanje provedeno je na laboratorijskim životinjama iz vlastitog uzgoja u Nastambi za laboratorijske životinje (HR-POK-010) Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, sukladno pozitivnim propisima Republike Hrvatske, pod nadzorom Povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a u okviru odobrenja nadležnih Etičkih povjerenstava. Tijekom istraživanja korištene su ženke i mužjaci laboratorijskog miša soja C3H za uzorkovanje i eksperimentalne ektopične transplantacije. Eutanazirano je 67 životinja.

Tijekom istraživanja korištena je infrastruktura Zavoda za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu: Nastamba za laboratorijske životinje, Laboratorij za izolaciju i transplantaciju zametaka, Laboratorij za histologiju i Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu. Dio metodologije proveden je koristeći infrastrukturu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice kao suradne ustanove.

Ovo je istraživanje financirano od strane Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je trošak materijala i metoda procijenjen na ukupan iznos od 150.000,00 HRK. Administrativne troškove i troškove školovanja kandidat je podmirio iz vlastitih izvora financiranja. Trošak diseminacije rezultata predstavljenih u ovoj disertaciji te trošak daljnjih istraživanja temeljenih na predstavljenim rezultatima ovog istraživanja preuzima Centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao vlasnik rezultata ovog i budućih vezanih istraživanja, a u dogovoru s doktorandom.

#### **1.5 Metode**

U ovom istraživanju korištene su metode kako slijedi: izolacija zametaka miša u stadiju gastrule, izolacija zametnog cilindra, ektopična transplantacija zametka pod čahuru bubrega singenične

životinje, izolacija tumora miša, prikupljanje tumora čovjeka nakon kirurškog zahvata, a u okviru standardne dijagnostičke i terapijske obrade sukladno važećim kliničkim protokolima, fiksacija tkiva i uklapanje u parafinske blokove, rezanje serijskih histoloških rezova na rotacionom mikrotomu i izrada histoloških preparata, kriopohrana uzoraka tumora, rezanje serijskih histoloških rezova na krio-mikrotomu i izrada histoloških preparata, bojanje histoloških preparata metodom hemalaun-eozin, analiza ekspresije gena na razini proteina metodom imunohistokemije i morfolometrijska analiza, homogenizacija proteina i mjerenje koncentracije proteina, analiza ekspresije gena na razini proteina metodom Western blottinga i denzitometrijska analiza te statistička analiza podataka prikladnim statističkim testovima.

### **1.6 Polazna hipoteza**

Temeljem usporedbe bioloških markera, eksperimentalni teratokarcinom miša pogodan je animalni model za istraživanje teratokarcinoma testisa u čovjeka.



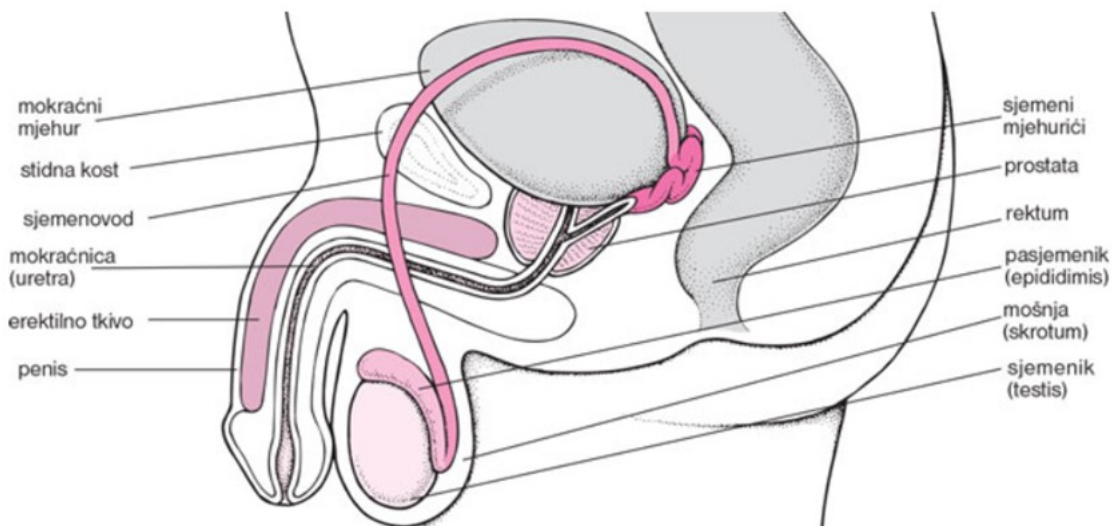
## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1 Anatomija testisa

Testis (sjemenik) je parna muška spolna žlijezda koja se nalazi u kožnoj vreći koja se naziva skrotum (mošnja). Ovalnog je oblika i teži od 20 do 40 grama i prosječnih je dimenzija 5 x 3,5 x 2,5 cm (Slika 1.). U testisu se umnažaju i sazrijevaju spermiji te izlučuju muški spolni hormoni.

#### 2.1.1 Građa testisa

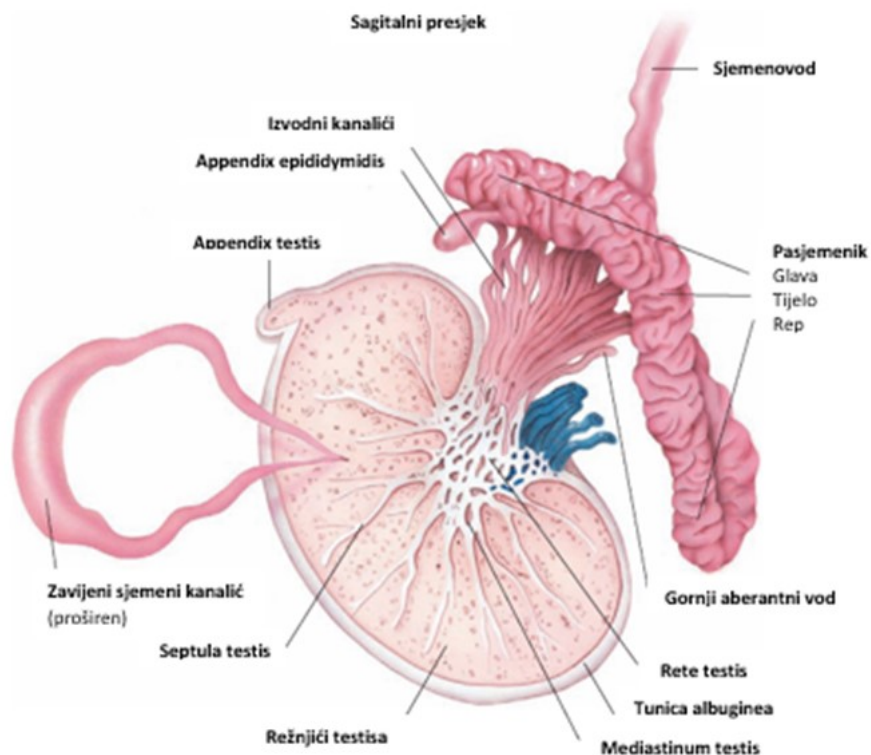
Testis ima dvije strane - medijalnu (lat. *facies medialis*) i lateralnu (lat. *facies lateralis*), dva ruba - prednji (lat. *margo anterior*) i stražnji (lat. *margo posterior*) te dva kraja - gornji (lat. *polus superior*) i donji (lat. *polus inferior*). Prednji rub je konveksan i gladak, a stražnji rub pokriva pasjemenik (lat. *epididymis*). Stražnji rub smatra se hilusom testisa jer kroz stražnji rub idu iz testisa u pasjemenik odvodne cjevčice testisa, a u testis ulaze žile i živci. Između testisa i pasjemenika uvlači se seroza i tako se formira sinus pasjemenika (lat. *sinus epididymidis*).



**Slika 1. Anatomska građa muškog spolnog sustava.** Muški spolni sustav usko je vezan za urotelni sustav. Sastavljen je od niza žlijezdi s vanjskim i unutarnjim izlučivanjem te sustavom

odvodnih kanala. Preuzeto s: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/specifne-bolesti-muskaraca/reproduktivni-sustav-muskarca>.

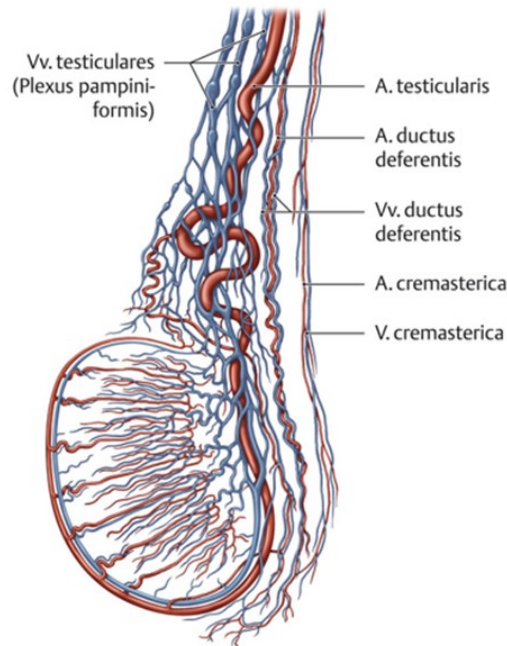
Testis obavijaju dvije ovojnice, vaginalna i vezivna. Vaginalna ovojnica testisa (lat. *tunica vaginalis testis*) ima svoja dva lista, visceralni (lat. *lamina visceralis*) i parijetalni (lat. *lamina parietalis*). Ona ne prekriva pasjemenik i druge tvorbe sjemenog snopa koje pristupaju na gornji kraj i stražnju površinu testisa. Ispod vaginalne ovojnice nalazi se vezivna ovojnica testisa (lat. *tunica albuginea*). Ona je čvrsta, sjajna i glatka membrana koja izravno obavija testis. U dubokom sloju vezivne ovojnice nalazi se ovojnica bogata krvnim žilama (lat. *tunica vasculosa*). Ovojnica je deblja i manje gusta na stražnjoj strani testisa i naziva se medijastinum testisa (lat. *mediastinum testis*). Od medijastinuma kroz tkivo testisa idu vezivne pregrade (lat. *septule testis*) koje ga dijele u režnjiće (lat. *lobule testis*). Testis ima oko 250 režnjića (lat. *lobula*) piramidnog oblika s bazom okrenutom prema periferiji, a vrhom prema medijastinumu, koji tvore parenhim testisa. U režnjićima se nalaze barem dva zavijena kanalića (lat. *tubuli seminiferi contorti*) u kojima nastaju spermiji. Više tubula spaja se u ravni kanalić (lat. *tubulus seminiferus rectus*). Ravni kanalići (lat. *tubuli seminiferi recti*) su početak izvodnog sustava testisa. Oni stvaraju mrežu testisa (lat. *rete testis*). Mreža testisa se nastavlja u 6-12 izvodnih kanalića (lat. *ductuli efferentes*) i njima spermiji iz testisa odlaze u pasjemenik (Slika 2.).



**Slika 2. Presjek kroz testis.** Testis ima jednostavnu anatomsku, ali složenu histološku građu. Preuzeto s: <http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/08/tmp696789.png>

### 2.1.2 Vaskularna opskrba testisa

Testikularna arterija (lat. *A. testicularis*) je ogranak abdominalne aorte te jedna od arterija koja opskrbljuje testis krvlju. Polazi u razini drugog lumbalnog kralješka i ide ispod peritoneja po stražnjoj trbušnoj stijenci. U testis arterije ulaze kroz medijastinum testisa, anastomoziraju s dvije arterije izvodnih kanalića (lat. *aa. ducti deferentis*), ograncima pupčane arterije i kremasteričnim arterijama (ograncima donje epigastrične arterije). Venska krv se skuplja u venski splet (lat. *plexus pampiniformis*) koji se nalazi uz testikularnu arteriju u sjemenom snopu. Venski splet se reducira na dvije do tri prateće vene te konačno na jednu testikularnu venu (Slika 3.).



**Slika 3. Vaskularizacija testisa.** Testis je visoko vaskulariziran organ premrežen kompliciranim sustavom krvnih žila. Preuzeto s: [https://eref.thieme.de/images/l/866714\\_25.jpg](https://eref.thieme.de/images/l/866714_25.jpg)

### 2.1.3 Inervacija testisa

Testis inerviraju simpatički živci iz prsnog dijela kralježnične moždine (Th10-12) i oko testisa tvore živčani splet testisa (lat. *plexus testis*) koji inervira krvne žile i kontrolira njihovu prokrvljenost (18).

## 2.2 Embriološki razvoj testisa

Razvoj testisa i mokraćnog sustava usko su povezani. Rana diferencijacija započinje u razdoblju gastrulacije i formiranju zametnih listića (3. tjedan embrionalnog razvoja). Gastrulacija slijedi nakon stadija dvoslojnog zametnog štita kada stanice epiblasta započnu proces invaginacije. Invaginacijom određen broj stanica potiskuje hipoblast i formira endoderm, a dio migrira između epiblasta (koji postaje ektoderm) i novostvorenog endoderma te formiraju mezoderm. Proces formira primitivnu prugu, a lokacija na kojoj dolazi do invaginacije stanica epiblasta duž primitivne pruge odrediti će njihov daljnji razvoj. Kroz središnji dio primitivne pruge migriraju stanice koje će formirati intermedijarni mezoderm, osnovu za razvoj urogenitalnog sustava (19).

Temelj spolnih žlijezda je par uzdužnih spolnih nabora (lat. *plicae genitales*) smještenih medijalno od mezonefrosa (prabubrega) u kojima nema spolnih stanica sve do 6. tjedna razvoja. Spolne prastanice pojavljuju se u ranim stadijima razvoja između endodermalnih stanica stijenke žumanjčane vreće. U 6. tjednu razvoja, spolne prastanice migriraju do epitela spolnih nabora u kojem značajnu ulogu igra KIT/KITLG (engl. *stem cell factor*, SCF) signalni put. Ove prastanice eksprimiraju niz biljega, poput OCT3/4 (poznat još kao POU5F1), c-KIT, PLAP, NANOG, SOX2 (samo za neseminome) i SOX17, koji su korisni u dijagnostici tumora zametnih stanica testisa kao i karcinoma *in situ*. Kasnije tijekom normalnog embrionalnog razvoja u potpunosti prestaje ekspresija OCT3/4 i PLAP markera, a ekspresija c-KIT je smanjena. S druge strane markeri SOX17 i VASA74 ostaju pozitivni i nakon rođenja (20).

Neposredno prije i tijekom migracije spolnih prastanica, epitel spolnog nabora proliferira i urasta u mezenhim u obliku nepravilnih spolnih tračaka. Tijekom tog razdoblja, muška i ženska spolna žlijezda se međusobno ne razlikuju te se nazivaju indiferentnom spolnom žlijezdom. Ukoliko je embrij genetski muškog spola, njegove spolne prastanice sadržavaju XY par spolnih kromosoma. Pod utjecajem Y kromosoma koji sadrži testis determinirajući faktor (TDF), primitivni spolni tračci proliferiraju i prodiru u mezenhim te nastaju medularni tračci ili tračci testisa. Oni se u području hilusa granaju u mrežu tankih tračaka stanica od kojih kasnije nastaje rete testis. Tijekom daljnjeg razvoja, tračci testisa se odvoje od površinskog epitela ispod kojeg se diferencira ovojnica od gustog veziva, vezivna ovojnica testisa (lat. *tunica albuginea*). U 4. mjesecu embrionalnog razvoja, tračci testisa zaviju se u oblik potkove, a krajevi im se nastavljaju u tračke u rete testis. Tračci testisa se tada sastoje od spolnih prastanica i Sertolijevih potpornih stanica, koje potječu od epitela na površini testisa. Leydigove intesticijske stanice, razvijene od mezenhimskih stanica u spolnom naboru, smještene su između tračaka testisa i počinju se diferencirati ubrzo nakon svojeg nastanka. U 8. tjednu, Leydigove stanice počinju lučiti testosteron koji potiče diferencijaciju spolnih kanala i vanjskih spolnih organa karakterističnih za muški spol. Tračci testisa ostaju neprohodni sve do puberteta kada dobivaju lumen i postaju sjemeni kanalići koji prelaze u kanaliće mreže testisa (lat. *rete testis*) te se spajaju s eferentnim kanalićima (lat. *ductuli efferentes*). Eferentni kanalići se razvijaju od preostalih sekretornih kanalića mezonefrosa i spajaju mrežom testisa (lat. *rete testis*) s Wolffovim kanalom od kojega nastaje sjemenovod (lat. *ductus deferens*) (19,20).

## 2.3 Tumori testisa

Tumori testisa su najčešći maligni tumori muškaraca u dobi između 14. i 44. godine. Incidencija tumora je porasla širom svijeta u zadnja dva desetljeća. Usprkos tome, u općoj populaciji su tumori testisa relativno rijetki. Najčešći su tumori zametnih stanica koji čine manje od 1% svih tumora dijagnosticiranih u muškoj populaciji. Od njih, 90% čine seminomi i neseminomski tumori. Početna dijagnoza u 70% slučajeva je prvi stadij tumora (vrijednosti tumorskih markera unutar referentnih vrijednosti bez zahvaćenih limfnih čvorova i metastaza), a u ostalih 30% dijagnosticirana je metastatska bolest (21).

### 2.3.1 Etiologija tumora testisa

Etiologija tumora testisa većim je dijelom nepoznata. Rizik od razvoja tumora testisa je veći u slučajevima pozitivne obiteljske anamneze. Rizik je čak 8 puta veći kod osoba čiji je brat imao tumor i oko 4 puta veći ukoliko je od tumora bolovao otac. Osim toga, rizik je veći kod blizanaca, posebice monozigotnih (22). Procjenjuje se da je oko 25% tumora zametnih stanica genetski uvjetovana iako nisu utvrđene mutacije gena koje bi se nasljeđivale s visokom penetrantnošću. Utvrđeno je da se osobe s pozitivnom obiteljskom anamnezom prezentiraju 2-3 godine ranije.

Genetski učinci doprinose više od 40% karcinoma testisa (23). Genetski poremećaji povezani s povećanim rizikom uključuju mozaicizam u kojem je prisutna aneuploidija spolnih kromosoma (45,X/46,XY), mutacije *AR* gena (geni za androgeni receptor) te mutacije *SRY* gena.

Faktori rizika za razvoj tumora zametnih stanica testisa su pozitivna obiteljska anamneza, prethodno dijagnosticiran tumor zametnih stanica u kontralateralnom testisu, subfertilnost, kriptorhizam, hipospadija te testikularna mikrolitijaza kod subfertilnih pacijenata. *In utero* izloženost dietilstilbestrolu može povećati rizik od razvoja tumora, dok se kao perinatalni čimbenici rizika spominju niska porođajna težina, niski paritet majke, redosljed rađanja djeteta (prvorodeni imaju povećan rizik), kriptorhizam, ingvinalna hernija te blizanačka trudnoća (21). Smatra se da u razdoblju adolescencije i odrasloj dobi izloženosti organoklornim pesticidima te profesionalna izloženost (vatrogasci, održavanje zrakoplova) povećavaju rizik za razvoj tumora zametnih stanica testisa.

Kriptorhizam je stanje najznačajnije povezano s razvojem tumora zametnih stanica. Studije su pokazale da je došlo do porasta prevalencije kriptorhizma između 1950.-ih i 1980.-ih godina, ali je udio pacijenata s tumorom testisa koji imaju kriptorhizam ostao konstantan. S druge strane, neke studije su pokazale da kasnija orhidopeksija znatno povećava rizik razvoja tumora zametnih stanica što ide u prilog kriptorhizmu kao rizičnom faktoru (22).

### *2.3.2 Epidemiologija*

Zabilježeno je da se u svijetu javi 1,5 slučaj tumora testisa na 100.000 ljudi, uz značajnu varijaciju u stopama incidencije. Tako je primjerice u Norveškoj, Danskoj i Švicarskoj incidencija do 10/100.000 dok je u afričkim zemljama manja od 1/100.000 ljudi. U zemljama koje su prethodno imale nisku incidenciju (Finska, Španjolska, Slovenija, Čile, Australija) stope se ubrzano povećavaju približavajući se onim područjima koja imaju zabilježenu visoku incidenciju. U SAD-u incidencija varira ovisno o rasi, tako primjerice kod bijelaca stopa iznosi 6,9/100.000 u usporedbi s 1,2/100.000 kod Afroamerikanaca (21).

Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) o incidenciji raka u Hrvatskoj za 2017. godinu pokazuju da je u toj godini bilo 13229 novodijagnosticiranih zloćudnih tumora kod muškaraca, od toga 193 tumora testisa (1,46% svih zloćudnih tumora kod muškaraca). Incidencija je najviša između 25 i 44 godina, najizraženije u skupini 25 do 29 godina u kojoj je zabilježen 41 novi slučaj. Stopa incidencije tumora testisa u 2017. godini bila je ukupno 9,7 na 100.000 stanovnika (Tablica 1.).

Podaci HZJZ-a o proširenosti tumora u trenutku postavljanja dijagnoze pokazuju da je od ukupno 193 novodijagnosticiranih pacijenata tumor bio lokaliziran kod njih 132 (68,8%), regionalno proširen kod 18 (9,4%), a s udaljenim metastazama kod 8 pacijenata (4,1%). Kod 34 pacijenta (17,7%) nepoznata je proširenost tumora u trenutku postavljanja dijagnoze (24).

**Tablica 1. Broj novodijagnosticiranih slučajeva i stopa incidencije tumora testisa u 2017. godini u Republici Hrvatskoj po dobnim skupinama.** Iz raspodjele incidencije TT po dobnim skupinama, razvidno je da TT ne poštuju uobičajenu dobnu distribuciju za tumore odrasle dobi, već da vrhunac incidencije pokazuju u mlađoj muškoj populaciji. Izvor: Hrvatski registar za rak.

Dobna skupina	Broj novih slučajeva	Stopa incidencije (na 100.000 stanovnika)	Dobna skupina	Broj novih slučajeva	Stopa incidencije (na 100.000 stanovnika)
0-4	0	0,0	45-49	10	7,4
5-9	0	0,0	50-54	5	3,5
10-14	0	0,0	55-59	3	2,0
15-19	11	9,8	60-64	4	2,8
20-24	19	15,3	65-69	0	0,0
25-29	41	32,4	70-74	1	1,3
30-34	34	24,6	75-79	2	2,9
35-39	31	21,4	80-84	1	2,3
40-44	31	22,3	> 85	0	0,0

### 2.3.3 Klasifikacija

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je 2016. godine ažurirala patohistološku klasifikaciju tumora mokraćnog sustava i muških spolnih organa. U usporedbi s prethodnom klasifikacijom iz 2004. godine, najviše promjena uvedeno je u skupini tumora zametnih stanica testisa (TZST). Klasifikacija definira dva značajna entiteta tumora zametnih stanica – podrijetla od neoplazije zametnih stanica *in situ* (engl. *Germ cell neoplasia in situ*, GCNIS) i podrijetla nevezanog uz GCNIS. Dob kliničke prezentacije igra važnu ulogu u prepoznavanju podtipa tumora zametnih stanica, posebice zbog preklapanja u histološkom pogledu.

Tumori zametnih stanica koji imaju podrijetlo od neoplazije zametnih stanica *in situ* imaju neke zajedničke karakteristike, između ostalog sličnu epidemiologiju, poremećaj spermatogeneze, proširenje intersticijskih prostora testisa, hijalinizaciju tubula, sklerozu peritubularnih prostora, nezrelost Sertolijevih stanica te amplifikaciju gena na kratkom kraku kromosoma 12 (12p), često u formi izokromosoma 12p. Imaju samo jedan podtip, tip 2 tumore zametnih stanica koji su uvijek maligni te se javljaju u adolescenata i mlađih muškaraca. Histološki se dijele na seminomske i neseminomske tumore (25).



Neseminomski tumori mogu se sastojati od čistih i miješanih elemenata embrionalnog karcinoma, teratoma, tumora žumanjčane vreće i koriokarcinoma, ali mogu biti prisutni i seminomski elementi (21).

Tumori zametnih stanica podrijetla nevezanog uz GCNIS podijeljeni su na tip 1 (pre-pubertetski teratomi i tumori žumanjčane vreće) i tip 3 (spermatocitični tumori).

Tip 1 tumori zametnih stanica javljaju se u pedijatrijskih pacijenata (najčešće mlađih od 14 godina), iako se rijetko mogu manifestirati i u odraslih pacijenata. Histološki se dijele na teratome koji su benigni i tumore žumanjčane vreće koji su maligni. Navedeni tumori nemaju abnormalnosti na kratkom kraku kromosoma 12 (12p).

Spermatocitični tumor (ranije spermatocitični seminom) izdvojen je iz skupine seminoma jer nema amplifikaciju na kratkom kraku kromosoma 12, pokazuje amplifikaciju gena *DMRT1* na kromosomu 9, a ne pokazuje ni povezanost s neoplazijom zametnih stanica *in situ* (GCNIS). Sadrži stanice slične sekundarnim spermatocitima i poglavito je dijagnosticiran u starijih muškaraca (21).

Proširenost tumora određuje se prema TNM-sustavu (T - primarni tumor, N - metastaze u limfnim čvorovima, M - udaljene metastaze) (Tablica 2.), a stadij (Tablica 3.) se određuje sukladno TNM klasifikaciji i serumskoj razini tumorskih markera (S) (Tablica 4.) koji se određuju nakon orhidektomije (26).

**Tablica 2. TNM klasifikacija tumora testisa.** T - primarni tumor, N - metastaze u limfnim čvorovima, M - udaljene metastaze. Izvor: *American Joint Committee on Cancer (AJCM)*.

<b>Primarni tumor (T)</b>	
<b>TX</b>	tumor se ne može odrediti
<b>T0</b>	nema dokaza primarnog tumora
<b>Tis</b>	neoplazija zametnih stanica <i>in situ</i>
<b>T1</b>	tumor je ograničen na testis (uključujući i invaziju <i>rete testis</i> ), bez limfovaskularne invazije.
<b>T1a</b>	tumor <3 cm
<b>T1b</b>	tumor ≥3 cm
<b>T2</b>	tumor je ograničen na testis i pasjemenik, uz limfovaskularnu invaziju ili prisutnu invaziju <i>tunicae albugineae</i> i zahvaćenost <i>tunicae vaginalis</i>
<b>T3</b>	tumor zahvaća <i>funiculus spermaticus</i> s limfovaskularnom invazijom ili bez nje
<b>T4</b>	tumor zahvaća skrotum s limfovaskularnom invazijom ili bez nje
<b>Metastaze u limfnim čvorovima (N)</b>	
<b>NX</b>	zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova se ne može odrediti
<b>N0</b>	bez zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova
<b>N1</b>	zahvaćen jedan ili više (≤5) regionalnih limfnih čvorova veličine <2 cm u promjeru
<b>N2</b>	zahvaćen jedan ili više (>5) regionalnih limfnih čvorova veličine >2 cm <5 cm u promjeru ili dokaz ekstranodalne proširenosti tumora
<b>N3</b>	zahvaćen limfni čvor veličine >5 cm u promjeru
<b>Udaljene metastaze (M)</b>	
<b>M0</b>	bez udaljenih metastaza
<b>M1a</b>	metastaze u neregionalne limfne čvorove ili metastaze u plućima
<b>M1b</b>	udaljene metastaze u drugim organima

**Tablica 3. Određivanje stadija tumora testisa.** *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* donio je 2017. godine sustav grupiranja prognostičkih stadija za TZST. Izvor: AJCC.

Stadij	T	N	M	S
<b>0</b>	neoplazija <i>in situ</i>	N0	M0	S0
<b>I</b>	T1-T4	N0	M0	SX
IA	T1	N0	M0	S0
IB	T2-T4	N0	M0	S0
IS	bilo koji T	N0	M0	S1-S3
<b>II</b>	bilo koji T	N1-N3	M0	SX
IIA	bilo koji T	N1	M0	S0-S1
IIB	bilo koji T	N2	M0	S0-S1
IIC	bilo koji T	N3	M0	S0-S1
<b>III</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1	SX
IIIA	bilo koji T	bilo koji N	M1a	S0-S1
IIIB	bilo koji T	N1-N3	M0	S2
	bilo koji T	bilo koji N	M1a	S2
IIIC	bilo koji T	N1-N3	M0	S3
	bilo koji T	bilo koji N	M1a	S3
	bilo koji T	bilo koji N	M1b	bilo koji S

**Tablica 4. Stadiji postorhidektomijske razine tumorskih markera u serumu.** Biokemijski markeri u serumu krvi koriste se u kliničkoj praksi poglavito za određivanje stadija bolesti i praćenje bolesti kod pacijenata. Izvor: Milose JC et al., 2011.

Stadij	AFP (ng/mL)	βHCG (IU/L)	LDH
<b>SX</b>	nedostupno ili nije rađeno	nedostupno ili nije rađeno	nedostupno ili nije rađeno
<b>S0</b>	unutar referentnih granica	unutar referentnih granica	unutar referentnih granica
<b>S1</b>	<1,000	<5,000	<1,5x gornja granica normale
<b>S2</b>	1,000-10,000	5,000-50,000	1,5-10x gornja granica normale
<b>S3</b>	>10,000	>50,000	>10x gornja granica normale

#### 2.3.4 Liječenje

Nakon dijagnostičke obrade koja se sastoji od kvantifikacije tumorskih markera (AFP,  $\beta$ HCG i LDH) i radiološke dijagnostike (transskrotalni ultrazvuk, RTG pluća, CT toraksa i abdomena ili MR), slijedi kategorizacija na kliničke stadije I, II (zahvaćenost limfnih čvorova) i III (metastaze u visceralnim organima). Daljnja kategorizacija tumora s metastazama (klinički stadij II i iznad) vrši se pomoću prognostičke tablice izrađene od strane Internacionalne kolaborativne grupe tumora zametnih stanica (IGCCCG, eng. *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*) te se ovisno o prognozi prilagođava liječenje pacijenta (Tablica 5.)(25).

Neoplazija *in situ* u 70% slučajeva progredira u tumor zametnih stanica unutar 7 godina, stoga su orhidektomija i radioterapija preporučene terapijske opcije. S obzirom da je kod oko 2,5% bolesnika prisutna neoplazija *in situ* i u kontralateralnom testisu, bolesnicima s čimbenicima rizika potrebno je ponuditi opciju biopsije i tog testisa. S obzirom na štetan učinak orhidektomije i radioterapije na plodnost, kod bolesnika koji žele u budućnosti imati potomstvo moguća opcija je redovito ultrazvučno praćenje (27). U slučaju progresije neoplazije *in situ*, provodi se konačno zbrinjavanje operacijom ili zračenjem.

Približno 75% svih tumora zametnih stanica testisa (80% seminoma i 60% neseminomskih tumora) otkriveno je u kliničkom stadiju I. Bolesnici u kliničkom stadiju I, gdje je tumor ograničen na testis, liječe se orhidektomijom tumora zahvaćenog testisa. U bolesnika s jednim testisom, poštedni pristup resekcije tumora je preporučen kako bi se očuvala funkcija Leydigovih stanica (21).

Seminomi u stadiju I imaju 13-19%-tnu stopu recidiva. Adjuvantna kemoterapija s jednokratnom dozom karboplatina smanjuje rizik recidiva za dvije trećine, ali radiološka kontrola je svakako potrebna. Novija istraživanja preporučuju adjuvantnu kemoterapiju karboplatinom radi manje toksičnosti dugoročno, s obzirom da je s prijašnjom uobičajenom metodom liječenja, adjuvantnim zračenjem retroperitoneuma, povezana veća incidencija sekundarnih tumora, sterilnost i kardiovaskularne bolesti. Nakon provođenja terapije preporuča se aktivno praćenje bolesnika tijekom 5 godina uz preporuku da se kontrolni CT učini svakih 6 mjeseci tijekom prve 2 do 3 godine (28).

Bolesnici s ne seminomskim tumorima zametnih stanica u stadiju I imaju 30%-tni rizik progresije tumora. Predviđanje rizika recidiva bazira se na histološkom tipu primarnog tumora (embrionalni karcinom ima najveći rizik recidiva). Limfovaskularna invazija smatra se jednom od klinički najznačajnijih rizičnih faktora za progresiju. Preporučena je neoadjuvantna terapija s jednim (rijetko dva) ciklusa kemoterapije po protokolu BEP (bleomicin, etopozid, cisplatina) u svih visokorizičnih pacijenata (29).

**Tablica 5. Prognostičko grupiranje TZST prema *International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG)*.** Zbog različite ekspresije tumorskih biomarkera u serumu pacijenata te različite reperkusije na prognozu, uveden je dodatni sustav određivanja stadija bolesti. Prevedeno i prilagođeno iz: Cheng L et al. 2018.

Status rizika		Visceralne metastaze (izuzev na plućima) ili medijastinalne primarne metastaze	Serumski markeri <sup>a</sup>			5-godišnje preživljenje bez progresije bolesti (%)	5-godišnje cjelokupno preživljenje (%)
			AFP (ng/ml)	βHCG (IU/l)	LDH		
Dobar	NSGCT	Ne	<1.000	<5.000	<1,5 x GGN	89 <sup>b</sup> (90 <sup>c</sup> )	92 <sup>b</sup> (95 <sup>c</sup> )
	Seminom	Ne	Normalna	Sve	Sve	82 <sup>b</sup> (87 <sup>c</sup> )	86 <sup>b</sup> (93 <sup>c</sup> )
Srednji	NSGCT	Ne	1.000-10.000	5.000-50.000	1,5-10 x GGN	75 <sup>b</sup> (76 <sup>c</sup> )	80 <sup>b</sup> (85 <sup>c</sup> )
	Seminom	Da	Normalna	Sve	Sve	67 <sup>d</sup>	72 <sup>d</sup>
Loš	NSGCT	Da	>10.000	>50.000	>10 x GGN	41 <sup>b</sup> (55 <sup>c</sup> )	48 <sup>b</sup> (64 <sup>c</sup> )
	Seminom <sup>e</sup>	-	-	-	-	-	-

**AFP**, α- fetoprotein; **βHCG**, β-humani korionski gonadotropin; **IU**, međunarodna jedinica (eng. international unit); **LDH**, laktatna dehidrogenaza; **NSGCT**, tumor zametnih stanica ne-seminomskog podrijetla (eng. nonseminomatous germ cell tumour); **GGN**, gornja granica normale.

<sup>a</sup> Markeri korišteni za procjenu rizika nakon orhidektomije

<sup>b</sup> Prema podacima iz: International Germ Cell Cancer Collaborative Group. International germ cell consensus classification: a prognostic factor- based staging system for metastatic germ cell cancers. J. Clin. Oncol.

<sup>c</sup> Prema podacima iz: Kier, M. G. et al. Prognostic factors and treatment results after bleomycin, etoposide, and cisplatin in germ cell cancer: a population- based study. Eur Urol. 2017;71:290–8.

<sup>d</sup> Na temelju nekoliko pacijenata

<sup>e</sup> Nijedan slučaj seminoma nije klasificiran kao loša prognoza

Bolesnike s tumorom u kliničkom stadiju II i III liječi se kombinacijom orhidektomije i lokalnog ili sistemskog liječenja zahvaćenih limfnih čvorova. Metastatski tumori zametnih stanica testisa imaju znatno visoku stopu izlječenja otkako je uvedena kombinacijska kemoterapija cisplatinom. Lokalizirane manje metastaze treba pažljivo procijeniti na individualnoj bazi. Većina bolesnika tretirana je s tri ciklusa kemoterapije po BEP protokolu. Važno je naglasiti da su seminomi

radiosenzitivniji od ne seminomskih tumora te stoga radioterapija igra značajnu ulogu u njihovom liječenju (21,30,31). Tako se adjuvantna radioterapija, od paraaortalne regije do ipsilateralnog ilijačnog područja, provodi u seminoma u stadijima IIA i IIB. Nakon završetka liječenja rezidualne mase seminoma se ne resekiraju nego samo redovito prate, a kod ne seminomskih tumora resekcija je potrebna 4-6 tjedana nakon završetka liječenja ukoliko su veći od 1 cm (25).

## 2.4 Genetičke promjene TZST

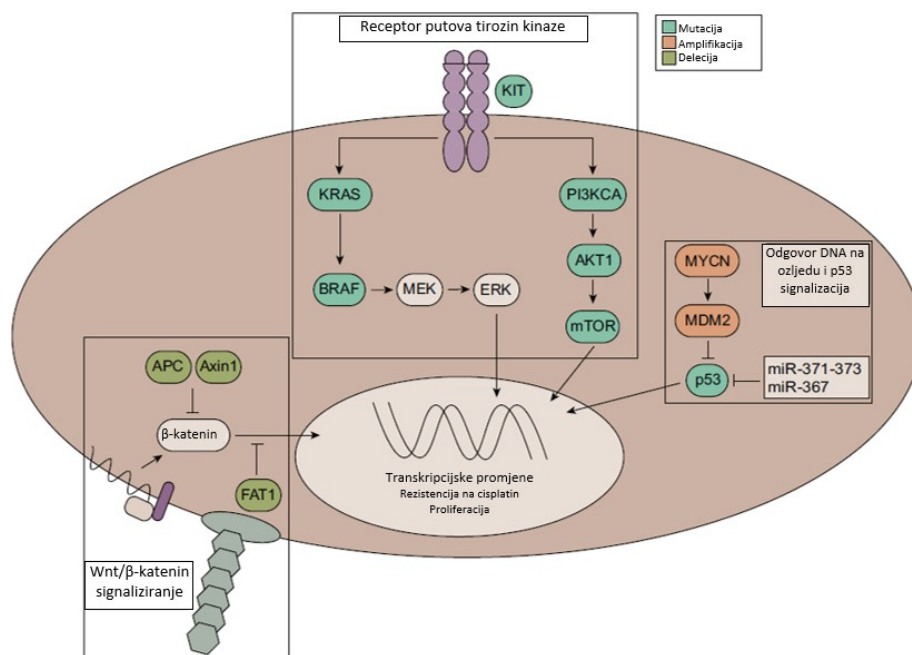
Obiteljski rizik za TZST jedan je od najvećih od svih karcinoma. U do sada najvećoj objavljenoj studiji, pokazano je da braća muškaraca s TT imaju 3-8 puta povećan rizik, a sinovi očeva s TT 2-4 puta povećan rizik od obolijevanja od TT. TZST u odraslih je karakteriziran čestim kromosomskim anomalijama i malim brojem somatskih mutacija, naročito onih koje bi mogle biti metom ciljanog personaliziranog liječenja (32). U usporedbi s ostalim čvrstim tumorima u odraslih, poput tumora pluća, mjehura i bubrega, koji imaju 8-11 mutacija po megabazi, frekvencija somatskih mutacija u TZST je mnogo niža, oko 0,5 mutacija po megabazi (7,33–35). Genetske i kromosomske promjene TZST se ogledaju o njihovom embriološkom izvorištu pa vrsta kromosomskih i genetskih anomalija ovisi o samoj vrsti TZST. Tumori zametnih stanica tip I su najčešće pre-pubertetski teratomi i tumori žumančane vreće (TŽV). Zanimljivo, kromosomski disbalansi nisu identificirani kod teratoma tipa I. Kromosomske anomalije koje se javljaju kod TŽV uključuju dobitak dugog kraka kromosoma 1 (1q), kromosoma 3, pozicije 24 na kromosomu 8 (8q24), kromosoma 12p13, kromosoma 20q i kromosoma 22, te gubitke kromosoma 1p36, kromosoma 4, kromosoma 6q24-ter, kromosoma 16q i kromosoma 20p. Kao posljedica ovih anomalija pretpostavljaju se gubitak *CHD5* (kodira kromodomena-helikaza-DNA-vezujući protein 5) i dobitak *MYC* (kodira MYC protoonkogen). Potom, dobiveni geni *STELLAR*, *NANOG* i *GDF3* s kromosoma 12p13 su svi povezani s biološkim procesima matičnih stanica (21).

Prvi patogenetski koraci u TZST tipa II i III su poliploidizacija i aneuploidizacija. Kod oba kasnije slijede daljnji kromosomski disbalansi, a u kasnijim stadijima i rijetke somatske mutacije. Kod ranog TZST tipa II, odnosno GCNIS, poliploidija se javlja na samom početku, iako razlozi za to do danas nisu razjašnjeni. Genetska osobitost TZST proizašlih iz GCNIS, odnosno TZST tipa II, je amplifikacija 12p kromosoma, najčešće u vidu izokromosoma 12p (i12p) (36). Izokromosom 12p predstavlja nebalansiranu kromosomsku aberaciju u kojoj dolazi do gubitka duge ruke

kromosoma te zamjene iste duplikatom kratkog kraka. Dobitkom 12p tumorske stanice mogu preživljavati neovisno od Sertolijevih stanica, čime dobitak 12p predstavlja ključnu točku razvoja iz GCNIS u invazivni tumor. Dvije su karakteristične kromosomske aberacije povezane s TZST, poliploidizacija i amplifikacija kromosoma 12. Sama amplifikacija se često manifestira kao izokromosom i(12)p.

U iscrpnim genomskim, epigenomskim, transkriptomskim i proteomskim analizama TZST poput one TCGA (eng. *The Cancer Genome Atlas*) mreže istraživača, ponavljajuće somatske mutacije kod TZST su uopćeno rijetke, a aktivirajuće mutacije su pronađene u samo tri gena. Prema podacima generiranim u TCGA databazi, te tri somatske mutacije su mutacije gena *KRAS*, *KIT* i *NRAS*, sve tri skoro isključivo kod seminoma (37,38) (Slika 4.). Mutacija *KIT* gena je u COSMIC (eng. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) databazi identificirana u 19% seminoma i samo 2% TZST neseminomskog podrijetla. *KIT* gen kodira protoonkogen protein receptora tirozin kinaze te ima ključnu ulogu u proliferaciji i preživljenju stanice. Iako je *KIT*-pozitivnost tumora generalno pozitivna radi mogućnosti liječenja imatinibom (poput *KIT* pozitivnih gastrointestinalnih stromalnih tumora-GIST), sekvenciranje genoma TZS pokazala je da je većina *KIT* mutacija na egzonu 17, koja u praksi znači i rezistenciju na imatinib (34,39). Samim time, klinička dobit bi se ostvarila korištenjem genotipizacije u selekciji pacijenata, naspram do sada korištene imunohistokemije.

Mutacije proteina Ras familije, u TZST najčešće *KRAS* i *NRAS*, su također učestalije kod seminoma nego kod TZST neseminomskog podrijetla. Proteini Ras familije su onkogeni receptori tirozin kinaze koji aktiviraju više signalizacijskih putova, uključujući Ras/MEK/ERK i PI3K putove (40). Sam *KRAS* gen se nalazi na često amplificiranom kromosomu 12 (40). Donedavno se smatralo da *KRAS* mutacije predstavljaju „nepogodivu“ metu za ciljanu terapiju, međutim posljednji napreci u razvoju ciljanih terapeutika stvaraju mogućnost kreiranja ciljane terapije ove relativno česte mutacije u TZST.



**Slika 4. Shematski prikaz najčešćih genetičkih mutacija staničnih putova u TZST.** Tumori testisa ne pokazuju česte i mnogobrojne genetičke mutacije. Najčešće su zahvaćeni geni iz WNT, KIT i MYC puta. Prevedeno i prilagođeno iz: Bagrodia LJ et al., 2019.

Analizom pacijenata s tumorima rezistentnim na liječenje cisplatinom pronađene su visoke stope promjena u *TP53-MDM2* osovini (34). *TP53* gen kodira p53, protein koji ima regulacijsku ulogu u staničnom ciklusu i koji je naročito važan za indukciju apoptoze i zamrzavanje staničnog ciklusa za popravak DNA u stanjima stresa. Gubitak funkcije p53 je asociiran s agresivnim tumorima te tumorima rezistentnim na kemoterapiju. Ova mutacija je česta u somatskim tumorima, međutim kod tumora zametnih stanica mutacija je sveukupno identificirana u 1-2% svih TZST (41,42), odnosno samo 7% seminoma i 0% neseminoma. Međutim, incidencija mutacija p53 kaskade je znatno češća u tumorima rezistentnih na liječenje kemoterapijom baziranoj na platini (39,40). Paradoksalno, TZST često pokazuju visoku razinu ekspresije p53 divljeg tipa i u citoplazmi i u nukleusu (21,40,43,44). Prekomjerna ekspresija p53 može se javljati zajedno s prekomjernom ekspresijom brojnih p53 inhibitora, uključujući miR-371-373 i miR367, te onkoprotein MDM2 (eng. murine double minute 2) (39,45). MDM2 inhibira p53 putem nuklearnog eksporta i ubikvinacije (34). S obzirom da funkcionalna p53 signalizacija doprinosi osjetljivosti tumora na kemoterapiju baziranu na platini, farmakološka inhibicija MDM2 predstavlja moguću terapijsku metu. Trenutno se provode klinička ispitivanja na nekoliko inhibitora MDM2, poput liječenja



pomoću Nutlin-3 inhibitora. Nutlin-3 inhibira djelovanje mdm2 te na taj način uzrokuje nakupljanje p53 čime se izbjegava onkogenom inducirana apoptoza. U *in vitro* studijama se na ovaj način deseterostruko povećala osjetljivost TZST na cisplatin (34,40,46).

Mutacije su zabilježene i duž Wnt/ $\beta$ -katenin puta čije su mutacije zabilježene u oko 8,7% TZST rezistentnih na cisplatin (39,47). Poremećaji duž ovog puta su implicirani i u progresiji ovih tumora, međutim, njihovi izolirani poremećaji nisu dovoljni za daljnji razvoj tumora (40).

Velike genomske, genetičke i epigenetičke studije opetovano pokazuju da se jasne razlike, naročito između histoloških podvrsta TZST, vide na nivou metilacije DNA, miRNA ekspresije, imune infiltracije te profila broja kopija aberacija.

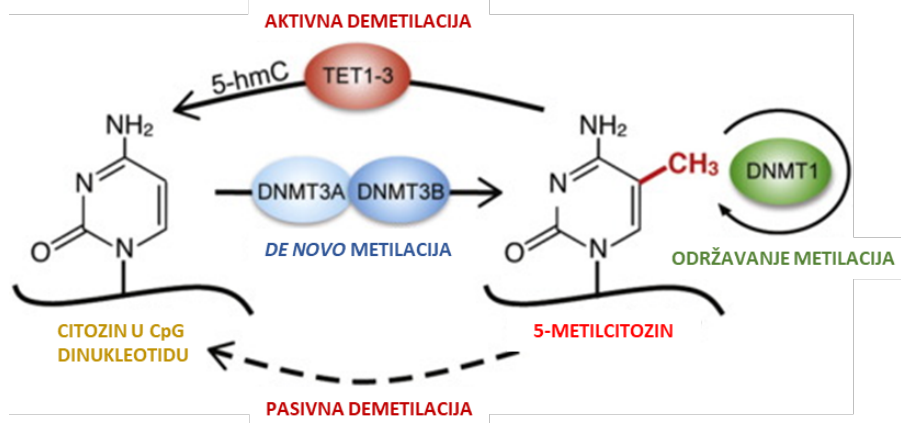
## **2.5 Epigenetika i epigenetički mehanizmi**

Pojam epigenetika je definiran kao sve zajedničke nasljedne promjene u fenotipu koje se događaju procesima neovisnima o genotipu. Nazvana je „novom genetikom“ i opisuje mnoge biološke procese koji nisu posljedica genskih mutacija nego kroz reverzibilne, plastične i nasljedne epigenetičke fenomene kontroliraju čitav spektar bioloških funkcija. Najistraženiji mehanizmi epigenetičkih promjena su metilacija DNA i histonske modifikacije, dok su se razvojem polja otkrile i uloge nekodirajuće DNA, priona, utjecaja položaja kromosoma i Polycomb mehanizmi. Ovi mehanizmi ne djeluju neovisno jedan o drugome, nego se nalaze u konstantnom međudjelovanju te su rezultati ovih mehanizama zapravo rezultati njihovih skupnih promjena. S genetskim i molekularnim studijama dokazane su veze epigenetičkih promjena s ljudskim patologijama. Uzimajući u obzir da su epigenetičke promjene, za razliku od genetskih, reverzibilne, dolazi se do zanimljivih implikacija u liječenju karcinoma, a polje epigenetike je stvorilo veliki broj potencijalnih molekularnih meta za razvoj ciljane terapije.

### *2.5.1 Metilacija DNA*

Najizučavaniji epigenetički mehanizam predstavlja prijenos metilne skupine sa S-adenozilmetionina (SAM) na 5-poziciju citozina uglavnom na citozin-gvanin dinukleotidnim kompleksima (CpG), stvarajući 5-metil-citozin (5mC) (Slika 5.). Metilacijom određenog dijela

DNA dolazi do aktivacije niza epigenetičkih modifikacija koje dovode do određene razine kondenzacije kromatina, odnosno zatvaranja njegove strukture. Time dolazi do ograničenja pristupa DNA sekvenci transkripcijskim faktorima te posljedično dolazi do represije ekspresije gena.



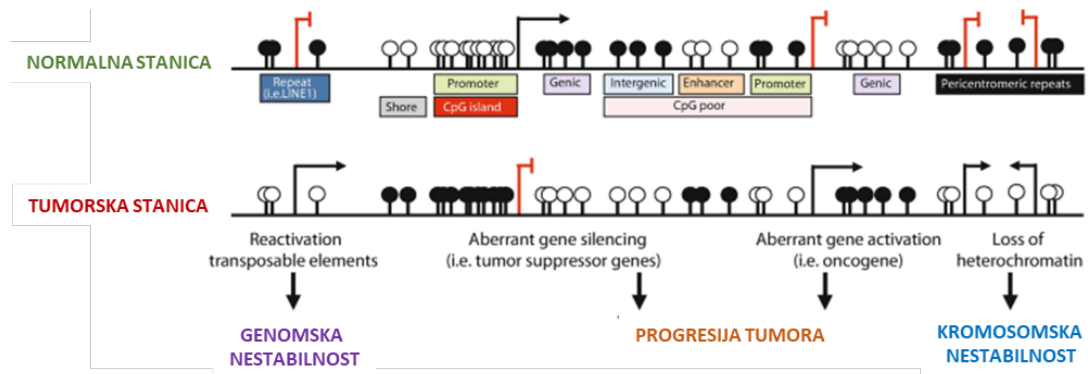
**Slika 5. Shematski prikaz metilacije citozina.** Metilacija DNA provodi se isključivo metilacijom citozina iza kojega slijedi gvanin. Metilacija DNA reverzibilni je proces u koji su uključeni stanični enzimi, dok se demetilacija DNA može odviti i pasivno. Izvor: Ambrosi C et al., 2017.

Metilaciju kataliziraju enzimi DNA-metil-transferaze (DNMT), kojih imamo tri vrste podijeljene u dvije obitelji. Dnmt 3 obitelj sadrži enzime Dnmt3a i Dnmt3b, čija je funkcija metilacija, hidroksilacija i demetilacija *de novo*, dok je Dnmt1 zaslužan za očuvanje uzoraka metilacija tijekom popravka i replikacije kromosoma (48,49).

DNA metilacija nije ravnomjerno raspoređena u genomu. Regije asociirane sa sekvencama DNA čija je funkcija regulacija gena često su više metilirane od kodirajućih regija DNA. Sami CpG dinukleotidi predstavljaju oko 80% ukupne metilirane DNA, i možemo ih pronaći rasprostranjene po genomu ili koncentrirane u regije poznate kao CpG otoci (50). Sami CpG otoci su rijetko metilirani i nalaze se najčešće na promotorskim regijama gena. Trenutno nije u potpunosti jasna uloga metilacije van CpG otoka. Nadalje, uloga metilacije nije ista na svim CpG otocima. Naime, metilacija na područjima u blizini početnih mjesta transkripcije blokira njenu inicijaciju, dok metilacija u tijelu gena ne blokira transkripciju, štoviše, postoje indicacije da je stimulira (51). Metilacija u području centromera je bitna za stabilnost kromosoma (52). Pored svih novootkrivenih

uloga metilacije, postoje tri klase gena kod kojih stabilna, cjeloživotna DNA metilacija igra ključnu ulogu: geni inaktiviranog X kromosoma, utisnuti (eng. *imprinted*) geni te geni specifičnih zametnih loza (53).

Metilacija DNA osnovni je epigenetički proces koji određuje strukturu kromatina. Eukromatizacijom metilacija DNA omogućuje transkripcijski potencijal gena u području, ali omogućuje i genetičku i kromosomalnu nestabilnost. Heterokromatizacijom pak uvjetuje nemogućnost ekspresije gena u području, ali osigurava genetičku i kromosomalnu stabilnost. Iz navedenog proizlazi važnost uloge metilacije DNA kako u genomima zdravih stanica tako i u patološkim procesima i bolestima (Slika 6.)



**Slika 6. Utjecaj metilacije DNA i njenih promjena na gensku ekspresiju te stabilnost genoma i kromosoma.** Metilacijom DNA pokreće se kaskada reorganizacije kromatina u ekspresijski inaktivni stabilni heterokromatin. Demetilacijom DNA heterokromatin prelazi u stanje eukromatina, transkripcijski aktivnog, ali podložnog genskim i kromosomalnim poremećajima. Upravo su promjene metilacije DNA značajan molekularni mehanizam inicijacije i progresije tumora. Izvor: prema Paro R et al., 2021.

### 2.5.2 Posttranslacijske modifikacije histona

Kromatin je jako kondenzirana struktura koja formira kalup osnovnih jezgrenih procesa poput transkripcije, dijeljenja te popravaka DNA. Sam kromatin dijelimo u dvije funkcionalne forme, kondenziranu formu zvanu heterokromatin u kojoj generalno ne postoji DNA regulatorna aktivnost i dekonenziranu, rahlu formu, koja omogućuje regulatorne procese, zvanu eukromatin.

Modifikacije strukture kromatina uključuju modeliranje kromatina i posttranslacijske modifikacije histona.

Struktura individualnih histonskih proteina utječe na sveukupnu strukturu kromatina, te na taj način određeni geni postaju eksponirani, a neki reprimirani. Studije su pokazale da je za postojanje učinka histonskih modifikacija potreban veliki broj njihovih kopija te da modifikacije iznimno rijetko funkcioniraju zasebno. Ova izrazito komplicirana priča dovela je do razvoja hipoteze histonskog koda kojom se postulira da mnoštvo histonskih modifikacija, u kombinaciji ili sekvenci, vrši specifične „nizvodne“ funkcije. Ostaje nerazjašnjeno pitanje samog uspostavljanja tako kompleksnog koda (50,54–56).

Posttranslacijske modifikacije histona se događaju većinom na N-terminusima histona. Postoji čitav spektar mogućih posttranslacijskih promjena s mnogobrojnim posljedicama. Do danas, otkriveno je preko 60 mogućih histonskih ostataka na kojima su pronađene modifikacije. Poznato je 8 vrsta modifikacije histona, a to su: acetilacija, metilacija, ubikvinacija, fosforilacija, sumoilacija, ADP ribozilacija, deiminacija i izomerizacija prolina (48,57–60) Dokazano je da različite histonske modifikacije svoje promjene na kromatinu vrše indirektno, odnosno, interakcijom s regulatornim proteinima koji mijenjaju strukturu kromatina. Međutim, dvije vrste posttranslacijskih modifikacija, acetilacija i fosforilacija, mijenjaju naboj histonskih završetaka te na taj način mogu direktno mijenjati strukturu kromatina (50).

Razvojem masene spektrometrije, reagensnih protutijela te ostale biokemijske i biomolekularne tehnologije došlo je do „eksplozije“ liste poznatih histonskih modifikacija i njihovih učinaka (61,62). Naprimjer, acetilacija lizinskih ostataka je dugo povezivana s aktivacijom transkripcije i depozicije histona, dok je nedavno otkrivena i njena uloga u popravku DNA (62). Lista nekih posttranslacijskih modifikacija histona te njihova funkcija prikazane su u tablici 6.

**Tablica 6. Pregled funkcija posttranslacijskih modifikacija histona.** Ovaj epigenetički mehanizam usko je vezan za metilaciju DNA te je ključan u mnogim staničnim procesima kao što su stabilnost kromatina, popravak DNA i regulacija genske ekspresije. Prevedeno i prilagođeno iz: Armstrong L. Epigenetics. Garland Science; 2014.

Modifikacija	Histon	Položaj aminokiseline	Funkcija
Acetilacija	H2A	Lizin 4	Aktivacija transkripcije
	H2B	Lizin 5	Aktivacija transkripcije
		Lizin 12	Aktivacija transkripcije
		Lizin 15	Aktivacija transkripcije
		Lizin 20	Aktivacija transkripcije
		Lizin 9	Aktivacija transkripcije
		Lizin 14	Aktivacija transkripcije
		Lizin 23	Aktivacija transkripcije i popravak DNA
		Lizin 27	Aktivacija transkripcije
	Lizin 56	Popravak DNA	
	H4	Lizin 5	Aktivacija transkripcije i popravak DNA
		Lizin 8	Aktivacija transkripcije i popravak DNA
		Lizin 12	Depozicija histona, aktivacija transkripcije
Lizin 16		Aktivacija transkripcije i popravak DNA	
Metilacija	H1	Lizin 26	Utišavanje transkripcije
	H3	Lizin 4	Permisivni eukromatin (dimetilacija), Aktivacija transkripcije (trimetilacija)
		Lizin 9	Represija transkripcije (trimetilacija)
		Arginin 17	Aktivacija transkripcije
		Lizin 27	Represija transkripcije, inaktivacija X (trimetilacija)
		Lizin 36	Aktivacija transkripcije
	H4	Lizin 79	Biljeg eukromatina i aktivacija transkripcije
		Arginin 3	Aktivacija transkripcije
		Lizin 20	Utišavanje transkripcije (monometilacija), formacija heterokromatina (trimetilacija)
	Lizin 59	Utišavanje transkripcije	
Fosforilacija	H1	Serin 27	Aktivacija transkripcije i dekondezacija kromatina
	H2A	Serin 1	Mitoza, represija transkripcije i popravak DNA
		Serin 139	Popravak DNA
	H2B	Serin 10	Apoptoza
		Serin 14	Apoptoza, popravak DNA
		Serin 33	Aktivacija transkripcije
	H3	Treonin 3	Mitoza
		Serin 10	Aktivacija transkripcije
		Treonin 11	Mitoza
	H4	Serin 1	Mitoza, sakupljanje kromatina, popravak DNA
Ubikvinacija	H2A	Lizin 119	Spermatogeneza
	H2B	Lizin 120	Mejoza
Sumoilacija	H2A	Lizin 126	Represija transkripcije
	H2B	Lizin 6/Lizin 7	Represija transkripcije
Biotinilacija	H3	Lizin 4	Uloga nerazjašnjena
	H4	Lizin 12	Odgovor na ozljedu DNA

### 2.5.3 RNA interferencija

Nekodirajuće RNA (ncRNA) su one ribonukleinske kiseline koje su transkribirane sa DNA, ali ne prolaze proces translacije u proteine. Mnoge od njih su funkcionalne i imaju ulogu u regulaciji drugih vrsta RNA poput mRNA, tRNA i rRNA. Druge vrste ncRNA su male nuklearne RNA (snRNA) s ulogom u prekrajanju (eng. *splicing*) male nukleolarne RNA (snoRNA) i ostale. Manje ncRNA imaju ulogu u regulaciji ciljnih mRNA i kromatina, poput mikro RNA (miRNA) i kratkih interferentnih RNA (siRNA), koje, s još nekoliko podvrsta, grupiramo u skupinu interferentnih RNA (RNAi) (Tablica 7.). Pored RNAi, u regulaciji gena implicirane su i duge nekodirajuće RNA. Uloga RNAi u epigenetičkim procesima poput inaktivacije X kromosoma ili utiskivanju (eng. *imprinting*) gena je odavno poznata, međutim, posljednja istraživanja ukazuju i na njihovu ulogu u nerazvojnim mehanizmima i karcinomu (48,63).

**Tablica 7. Prikaz različitih tipova nekodirajućih RNA.** Nekodirajuće RNA kratke su RNA molekule koje ne kodiraju za proteine već su ključan epigenetički element u regulaciji mnogih staničnih procesa regulacije strukture kromatina i genske ekspresije. Prevedeno i prilagođeno iz: Tollefsbol T et al., 2011.

ncRNA	Značenje kratice (engl.)	Duljina	Opis
miRNA	Micro RNA	21-23 nt	Ciljaju i vežu se na mRNA i utječu na translaciju
siRNA	Short interfering ili silencing RNA	20-25 nt	Reguliraju specifične gene, posttranslacijsko utišavanje gena
piRNA	Piwi-interacting RNA	27-30 nt	Interagiraju sa PIWI proteinima i reguliraju kromatin i utišavaju transpozone
XiRNA	XCI inactivation linked small RNA	24-42 nt	Kontroliraju metilaciju budućeg neaktivnog X kromosoma i metilaciju Xist promotor regiju budućeg aktivnog X kromosoma
Duge ncRNA	Long ncRNA	>200 nt	Imaju specifične uloge; Ključni u inaktivaciji X kromosoma

## 2.6 Epigenetika TZST

Epigenetički poremećaji poznati su inicijacijski i progresijski faktor u razvoju TZST-a. Mnoga istraživanja upozoravaju na epigenetičko programiranje stanica zametnog epitela kao ishodišta

razvoja TZST još *in utero* tijekom fetalnog razvoja, što potvrđuju istraživanja na animalnim modelima i komparativne studije matičnih stanica TZST-a i embrionalnih matičnih stanica.

### 2.6.1 Epigenetika u razvoju TZST-a

Tijekom razvoja primordijalnih zametnih stanica i gonocita u muškoj gonadi u 6. tjednu gestacije se nalaze nediferencirane embrionske stanice koje su prošle stupanj epigenetičkog reprogramiranja, odnosno prošle su kroz val brisanja i ponovnog uspostavljanja profila metilacije (64,65). S obzirom da je originalni epigenetički profil obrisan, moguće je da neuobičajena kombinacija aktiviranih i inaktiviranih gena transformira gonocite u GCNIS. U usporedbi s normalnim spermatogonijama, genom GCNIS ostaje nemetiliran u odraslom testisu (66,67). Stanice GCNIS zadržavaju transkripcijske faktore POU5F1 (OCT3/4), NANOG, TIA-2, MYCL1, GDF3, DPPA4, KIT i TFAP2C, koji su asocirani s pluripotentnošću embrionskih matičnih stanica (66). Sam OCT4 koristi se kao marker nediferenciranih stanica. Predložen je model prema kojem seminomi proizlaze iz GCNIS stanica koje su proizašle iz primordijalnih zametnih stanica i koje su prošle proces globalne demetilacije, dok su neseminomi rezultat GCNIS stanica koje su prošle kroz proces *de novo* metilacije (66,68). Između podvrsta TZST postoje razlike u razini metilacije pa su tako nediferencirani TZST (seminomi, GCNIS, gonadoblastomi) hipometilirani, dok teratomi, TŽV te koriokarcinomi pokazuju viši stupanj metilacije.

Globalna hipometilacija DNA doprinosi malignoj transformaciji aktivacijom onkogenih i latentnih transpozona. Jedan takav primjer je retrotranspozon *LINE-1* (eng. *long interspersed nuclear element 1*), koji u TZST doprinosi genomske nestabilnosti i malignoj transformaciji putem insercijske mutageneze, disregulacije transkripcije, prekida u DNA te povišene razine rekombinacije DNA (69). Zanimljivo je da je stupanj metilacije *LINE-1* moguće naslijediti od roditelja, te da je hipometilacija asocirana s povišenim rizikom za dobivanje TZST. Ta asocijacija je veća kod pacijenata sa seminomom i pacijenata s bilateralnim tumorom (70).

Kada je riječ o enzimima za metilaciju DNA, nije nađena ekspresija DNMT1 kod seminoma, dok je kod embrionalnih karcinoma regulirana naviše (eng. *up-regulated*) (71). DNMT3a je reguliran naviše u TZST naspram normalnog tkiva testisa (72). DNMT3b i njegov uzorak ekspresije se pokazao kao mogući pokazatelj recidiva seminoma prvog stadija (73,74). S obzirom na važnost

njihove funkcije, promjene u ekspresiji DNMT dovode do velikih razlika profila transkriptoma između stanica tumora i stanica normalnog testisa. Naročito značajna su dva gena, OCT 3/4 i NANOG, s obzirom da su oni biljezi pluripotencije. Sam NANOG promotor je tijekom razvoja selektivno reprimiran, odnosno, u spermatogonijama je hipometiliran, dok je u spermatozoidima hipermetiliran (75). Metilacija NANOG promotora u stanicama TZST korelira sa stadijem diferencijacije tumora. OCT 3/4 je hipometiliran u seminomu i u embrionalnom karcinomu (74,76).

Histonske modifikacije H3K9me2 i H3K27me3 su obje povezane s restriktivnom kromatinskom strukturom i nisu pronađene u GCNIS stanicama tumora testisa. Suprotno navedenom, H14K34ac se nalazi u GCNIS-u i stanicama seminoma, stoga bi potencijalno mogao služiti kao dijagnostički marker tih maligniteta (77). Predložen je mehanizam kojim GCNIS i seminomi zadržavaju svoje nediferencirano stanje putem dimetilacije histona H2A i H4 arginin 3, dok gubitak ovih histonskih modifikacija omogućuje određeni stupanj diferencijacije kod neseminomskih tumora (74,78).

Nekoliko miRNA su jedinstvene za testis. Dokazana je obrnuta veza između ekspresije miR-199a-5p i PODXL antigena (eng. *podocalyxin-like protein 1*), izraženog kod embrionalnog karcinoma. Sam PODXL, inače antiadhezivni protein, je izražen kod agresivnih tumora (79). Klasteri miR-371-373 i miR-302 pokazuju prekomjernu ekspresiju kod TZST. Njihova uloga je regulacija naniže (eng. *down-regulation*) mRNA u putovima vezanim za senescenciju stanice prilikom perioda onkogenog stresa (74).

PIWI/piRNA signalni putovi imaju ključne uloge u razvoju normalnih muških zametnih stanica. U TZST i GCNIS nije pronađena ekspresija njihovih gena te je hipermetilacija asocirana sa utišavanjem *PIWIL1*, *PIWIL2*, *PIWIL4* i *TRDII* gena u TZST. Zanimljivo, isti epigenetički profil uočen je i kod neplodnih muškaraca, čime se stvara asocijacija između neplodnosti i TT (66,80–83).

### 2.6.2 Epigenetički biomarkeri TZST-a

Unatoč fenotipskoj raznovrsnosti TZST, većina TZST dijeli citogenetske i tumorigenetske karakteristike (84). Shodno tome, histopatološka dijagnoza TZST unatoč morfološkoj i imunohistokemijskoj karakterizaciji može biti komplicirana (85). Korištenje klasičnih serumskih



tumorskih biljega može pružiti dodatne informacije, međutim niska osjetljivost i specifičnost tih testova ograničava njihovu stvarnu korist (86).

Da se hipermetilacija gena može koristiti kao dijagnostički i prognostički marker za TZST, dokazano je u studiji iz 2009. kada je hipermetilacija promotora gena češće zabilježena u serumu pacijenata s TZST nego kod zdravih kontrola. Štoviše, mjerenje hipermetilacije određenih promotora gena pokazalo se osjetljivijim i specifičnijim nego kombinacija sva četiri klasična tumorska biljega (hipermetilacija bilo koja dva gena promotora: osjetljivost 67%, specifičnost 97%; kombinacija četiri klasična tumorska biljega: osjetljivost 58%) (87).

U studiji koju su sproveli Costa i suradnici dokazano je da različite kombinacije epigenetičke regulacije pet odabranih gena omogućuje razlikovanje pet podtipova TZST, čime se otvaraju vrata za precizniju diskriminaciju između podtipova TZST (88). Pokazali su značajnu razliku razine uzorka metilacije CRIPTO, HOXA, MGMT, RASSF1A i SCGB3A1 promotora u GCNIS TZST naspram kontrolnih uzoraka, te da panel dva gena (HOXA9/RASSF1A) precizno razlikuje između dva glavna podtipa TZST, odnosno između seminoma i neseminoma (90.1% osjetljivost, 81.6% specifičnost i 87.4% preciznost). Nadalje, pokazana je značajna razlika razine metilacije CRIPTO, MGMT i RASSF1A gena između *čistih* vrsta TZST i miješanih tumora te značajnu razliku razine metilacije CRIPTO, HOXA9, MGMT i SCGB3A1 između pre- i postpubertetskih tipova TZST. Pronađena je asocijacija razine metilacije HOXA9, RASSF1A i SCGB3A1 i stadija tumora (88). Uspješnost kombinacija nekoliko epigenetičkih markera, odnosno epigenetičkih panela, je naročito značajna s obzirom da pojedinačni epigenetički markeri ne nude takav stupanj preciznosti. Naprimjer, sam CRIPTO marker u jednoj studiji je detektiran u oko 50% svih pacijenata s TZST (89), međutim, daljnje studije su pokazale da i koncentracija CRIPTO biomarkera u serumu korelira sa stadijem tumora (90). Ista studija je pokazala višu razinu CRIPTO/miR-371a-3p kod razvijenog TZST naspram GCNIS. Poliploidizacija kod GCNIS-vezanih tumora može dovesti do relativnog dobitka X kromosoma. Uzorak inaktivacije X kromosoma u TZST jednaka je onoj u normalnom ženskom razvoju, odnosno specifični transkript inaktiviranog X (eng. XIST) je izražen te se vrši hipermetilacija prekobrojnog (ili prekobrojnih) X kromosoma. Na osnovu toga, koncentracija metiliranih XIST fragmenata pokazala se kao biomarker za TZST (21,91), dok se u nekim studijama pokazala kao mogući način razlikovanja seminoma od neseminoma (92).

Uzimajući u obzir doprinos epigenetičke disregulacije na TSZT fenotip, korištenje epigenetičkih biomarkera predstavlja dodatni alat u dijagnosticiranju i diferenciranju TSZT te bi u kliničkim uvjetima mogli zamijeniti ili biti komplement postojećim tumorskim biljezima.

## 2.7 Eksperimentalni animalni model teratokarcinoma

Teratokarcinomi u životinjskim modelima, primarno mišjim, mogu se javiti spontano ili ih se može inducirati. Spontani TCa miševa su izrazito rijetki, s izuzetkom onih linija miševa kod kojih je to pod strogom genetskom kontrolom, odnosno linija 129/ter SV za TT i linija LT za OT (93–96). Razvijeno je i nekoliko tehnika indukcije TCa u animalnih modela, poput transplantacije genitalnih nabora (*plica genitalis*) u odrasle testise, koje rezultiraju stvaranjem TCa morfološki identičnih ljudskim, međutim, indukcija TCa je u tom slučaju pod genetskom kontrolom te ne rezultira u TCa kod svih linija miševa (97). Kao pouzdana metoda pokazala se transplantacija pre- i ranih postimplantacijskih embrija na ekstrauterine lokacije (15, 98, 99).

### 2.7.1 Eksperimentalni teratokarcinom miša

Škreb, Solter i Damjanov su 1970. godine razvili pouzdanu metodu kojom se dobije retransplantibilan TCa miša (15). Njihova metoda obuhvaća ektopičnu transplantaciju zametnog štita zametka miša u stadiju gastrulacije pod čahuru bubrega singeničnog odraslog miša. Razvijeni TCa ima populacije dobro diferenciranih stanica teratoma i nediferenciranih stanica embrionalnog karcinoma, čije se postojanje uzima kao dokaz za adekvatnost modela teratokarcinoma (96). Unatoč morfološkoj sličnosti, nesavršenost mišjeg modela TCa naspram ljudskog ekstenzivno je opisivana još sredinom prošlog stoljeća. Još u tadašnjim istraživanjima opisan je različit razvojni potencijal ljudskih od mišjih tumora, poput velike učestalosti trofoblastičnih elemenata u ljudskim tumorima koji su ekstremno rijetki u mišjim. Nadalje, embrioidna tijela u ljudskom TCa sličie ranom preimplantacijskom stadiju razvoja, dok u mišjim nalikuju na cilindre jajašaca (96). Ni tada nije bio jasan značaj i utjecaj ovih razlika na provođenje istraživanja.

Eksperimentalni teratokarcinom miša nastaje iz embrionalnih pluripotentnih stanica, a sadrži i embriokarcinomske (EC) matične stanice koje su pluripotentne prirode. EC stanice dijele dosta sličnosti s embrionalnim matičnim stanicama (ES), te su godinama korištene kao model za

izučavanje ES stanica. Transplantacijom ES na druge lokacije dobiva se dobro diferencirani teratom, u pravilu bez malignih karakteristika teratokarcinoma (100). Ipak, umetanjem jedne EC stanice u blastocistu singeničnog miša, ta stanica preuzima fenotip normalne embrionalne matične stanice, dok uvođenjem iste EC stanice supkutano ili intraperitonealno u čovjeka stvara se teratokarcinom (101, 102). Isti postupak kod kasnijih stadija postimplantacijskih embrija, naročito nakon organogeneze, također rezultira stvaranjem teratokarcinoma, čime se nameće zaključak da je sklonost malignoj transformaciji lakše suprimirati u ranijim stadijima razvoja embrija (101). Sposobnost ES stanica da se razviju u dobro diferencirani tumor u diferenciranom tkivu te sposobnost EC stanica da sudjeluju u fiziološkom razvoju normalne jedinke miša ukazuje na ovisnost staničnog razvoja i staničnog programiranja pluripotentnih stanica o epigenetičkom mikrookolišu ishodišnog tkiva. Samim time ovaj životinjski model se nameće kao adekvatan model za istraživanje epigenetičkih promjena i karakteristika teratokarcinoma miša te omogućuje praćenje i istraživanje epigenetičkih promjena u realnom vremenu.

## **2.8 Molekularni biljezi profiliranja tumora**

Molekularni biljezi posebice proteinska ekspresija gena, neizmjereno su važni za molekularno profiliranje zdravih tkiva i tumora. U kontekstu definiranja opravdanosti upotrebe animalnih modela u cilju istraživanja bolesti u čovjeka, molekularni biljezi imaju neprocijenjivu vrijednost. Uistinu, u doba molekularne biologije i molekularne medicine, animalni eksperimentalni modeli moraju odgovarati na molekularnoj, a ne samo anatomsko-histološkoj odnosno (pato)fiziološkoj razini pandanima u čovjeka.

U ovom istraživanju sukladno ciljevima odlučili smo istražiti ekspresiju molekularnih biljega na proteinskoj razini i to biljege proliferacije Pcn (Boehm et al., 2016), apoptoze Kaspaza-3 (Crowley i Waterhouse, 2016), jezgre matičnosti stanica Oct3/4 i Nanog (Rodda et al., 2005), diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica Nestin (Bernal i Arranz, 2018), glijalne diferencijacije Gfap (Middeldorp & Hol, 2011), diferencijacije endodermalnih matičnih stanica Hnf4a (Morrisey et al., 1998), neuralne i aksonske diferencijacije Nfh (Lees et al., 1988), te epidermalne diferencijacije CK15 (Sieber-Blum, 2011).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio istraživanja proveden je sukladno pozitivnim propisima Republike Hrvatske i u skladu s pravilima struke koristeći uhodane i optimizirane laboratorijske protokole odnosno upute proizvođača, znanstvene materijale, tehnologiju i infrastrukturu.

#### 3.1 Uzorak na kojem je izvršeno istraživanje

Ovo istraživanje provedeno je na uzorcima eksperimentalnog teratokarcinoma u miša i uzorcima teratokarcinoma testisa u čovjeka.

##### 3.1.1 Etička načela korištena u radu s laboratorijskim životinjama

Prije početka ovog istraživanja dobiveno je pozitivno rješenje nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Ministarstva poljoprivrede RH.

Istraživanje je uključilo upotrebu visokorođenih 25 ženki i 47 mužjaka laboratorijskog miša soja C3H, starih 2-3 mjeseca tjelesne mase oko 25 g odnosno 35 g i kontroliranog optimalnog zdravstvenog stanja. Tijekom pokusa korišten je randomizirani dizajn. Miševi su bili uzgojeni, a pokusi provedeni u nastambi Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-010). Na njima nije izvođena nikakva prethodna istraživačka manipulacija. Dodatna skupina mužjaka bila je korištena isključivo u postupku parenja s ciljem dobivanja zametaka i niti jedan nije eutanaziran zbog potreba ovog istraživanja. Gravidne su ženke bile eutanazirane kako bi se uzorkovali zamci u stadiju gastrule. Zamci su transplantirani u mužjake, a mužjaci postoperativno praćeni i potom eutanazirani za potrebe uzorkovanja nastalog tumorskog tkiva, sve sukladno niže navedenim zakonskim propisima i važećim regulativama.

Laboratorijske životinje su bile smještene u polikarbonatnim (PC) kavezima pod konvencionalnim laboratorijskim uvjetima na 20-24°C, relativne vlažnosti od 40-70% i nivoa buke 60 dB. Automatiziranim sustavom rasvjete bio je osiguran ciklus dan/noć (12:12 h). Standardna peletirana prehrana i svježa voda su omogućene *ad libitum*. Skrb za životinje bila je u skladu sa standardnim

operativnim procedurama nastambe te Europskom konvencijom za Zaštitu vertebratnih životinja korištenih u Eksperimentalne i druge Znanstvene svrhe (ETS 123).

U istraživanju se slijedila Direktiva 2010/63/EU, Zakon o zaštiti životinja RH (NN br. 102/2017), FELASA smjernice, te odluke, preporuke i postupnici nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Prema Pravilniku za zaštitu životinja koji se koristi u znanstvene svrhe (NN 55/2013), težina pokusa na ženka se svrstava kao uzorkovanje, a na mužjacima kao blaga težina pokusa jer životinje osim stresa izazvanog rukovanjem (vađenje i stavljanje u kavez, i primjena injekcija) i postoperativnog oporavka nisu trpjele bol. Pokus na zamecima se ne klasificira sukladno zakonskoj regulativi budući da su zameci bili stari 7-8 dana te nemaju razvijenu svijest i osjet boli.

Operativni zahvati provedeni su sukladno zakonskoj regulativi s predoperacijskom, intraoperacijskom i postoperacijskom njegom. Tijekom trajanja pokusa, životinje su bile svakodnevno praćene i bodovane od osoblja osposobljenog za brigu o životinjama. Shodno bodovanju (tjelesna kondicija životinja, stanje dlačnog pokrova, kretanje u kavezu, nepravilnosti disanja, gubitak tjelesne mase), odlučilo bi se treba li provesti humano usmrćivanje životinja, što nije bilo potrebno. Nije bilo potrebno postoperativno provoditi analgezijski tretman. Eutanazija se provodila cervikalnom dislokacijom kao prihvaćeni oblik humanog usmrćivanja laboratorijskih životinja.

### *3.1.2 Etička načela korištena u radu s pacijentima regrutiranim u istraživanje*

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 20 ispitanika koji su pristupali orhiektomiji testisa radi sumnje na dijagnozu raka testisa u okviru rutinskog rada Klinike za urologiju KBC-a Sestre milosrdnice. U niti jednom trenutku rutinski klinički protokol liječenja pacijenata nije bio modificiran ili ometan potrebama ovog istraživanja.

Ispitanici su prije uključanja u istraživanje, odnosno prikupljanja uzoraka detaljno upoznati sa svrhom i tijekom istraživanja te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Obaviješteni su o tajnosti njihovih podataka, namjenskom korištenju njihova biološkog i

genetičkog materijala te o mogućnosti izlaska iz istraživanja vlastitom voljom u bilo kojem trenutku. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu projekta „Regenerativna i reproduktivna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“ (KK.01.1.1.01.0008) financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj, konkurentnost i koheziju (EU). Odobreno je od strane nadležnog Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice.

Biološki uzorci u istraživanje uključenih pacijenata bili su šifrirani. Šifarnik sa osobnim podacima bio je pohranjen u osobnom računalu glavnog voditelja istraživanja izv. prof. dr. sc. Nine Sinčića koji se nalazio u uredu bez prava ulaza neovlaštenim osobama. Tijekom istraživanja korištene su isključivo šifre uzoraka. Osobni podaci pacijenata nisu nigdje objavljeni ni prikazani te se šifre uzoraka nikako ne mogu povezati s osobnim podacima pacijenata bez Šifrnika.

### 3.2 Popis i sastav uporabljenih kemikalija

U ovom istraživanju korištene su navedene komercijalne kemikalije i otopine, odnosno otopine priređene u laboratoriju prema navedenim recepturama.

- 10% puferiranim formalinom (Biognost)
- Bicinkoninične kiseline (BCA) (Sigma-Aldrich)
- BioMount DPX Low medij (Biognost)
- Citratni pufer pH 6 (Agilent Technologies)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich)
- Destilirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) -
- Eozin (Biognost)
- Etilni alkohol ( $\text{EtOH}$ ) Denaturirani etilni alkohol. Ukoliko je korišten u određenom postotku, volumski je bio razrijeđen s  $\text{dH}_2\text{O}$ . (Sigma-Aldrich)
- Fiziološka otopina puferirana fosfatnim solima (PBS) 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 (Sigma-Aldrich)
- Govedi serum (Sigma-Aldrich)

- Hematoxylin (Hemalaun) (Biognost)
- Koktela inhibitora proteaza (Roche)
- Kozji serum (Imunološki zavod)
- Ksilol (Sigma-Aldrich)
- Laemmler pufer 4X 0,250 M Tris HCl, 40 % glicerol, 8 %  $\beta$ -merkaptoetanol, 8 % SDS, 0,008 % bromfenol plavo (Sigma-Aldrich)
- Ledena octena kiselina (Sigma-Aldrich)
- Narketan (VETOQUINOL)
- Otopini za protutijela 5M NaCl, 1M Tris, 10 % natrijev azid, 5 % BSA, 1% fenol crveno
- Parafin (Kemika)
- Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)
- Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard (BioRad)
- Pufer za radioimunoprecipitacijsku analizu (RIPA) 25 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1 % Na-Deoxycholate, 1 % TX-100, 5mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- Puferu za blokiranje membrane 5% BSA (Sigma-Aldrich) u TBST puferu
- Sekundarnog protutijela protiv zečjeg antigena (Abcam)
- TBS 5 mM Tris (Carl Roth), 150 mM NaCl (Kemika) pH 7.5
- TBST TBS pufer, 1% Tween-20 (Roth), pH 7,5
- Tris - EDTA pufer pH9 1 mM Tris (Carl Roth), 0,1 mM EDTA (Kemika)
- Tween 20 (Roth)
- Vodikov peroksid (Kemika)
- Vodovodna voda (vH2O) -
- Xylapan (VETOQUINOL)

### 3.3 Pribor i aparatura

U ovom istraživanju korišten je navedeni pribor i aparatura: „braking“ pipeta, ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), laboratorijska staklena čaša, disekcijski mikroskop (Leica), grijani jastuk za laboratorijske životinje, histološka čašica, histološka mapa, histološka pinceta, histološka pokrovnica, histološka predmetnica, histološko zvono sa stalkom, medicinska igla, kirurška sonda, kirurški resorptivni konac, kirurški skalpel, kirurški pean, kirurške škare, klackalica, kriomikrotom (Leica CM1860 UV), kuglični homogenizator (Bertin), kuhalo na paru, Michel kopča, Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), mikropipetor 0,1-2  $\mu$ L, mikropipetor 1,0-10,0  $\mu$ L, mikropipetor 10-100  $\mu$ L, mikropipetor 100-1.000  $\mu$ L, jednokratni nastavci za mikropipete 10  $\mu$ L, jednokratni nastavci za mikropipete 100  $\mu$ L, jednokratni nastavci za mikropipete 1.000  $\mu$ L, Petrijeva zdjelica, plastične kutije za inkubaciju, plinski plamenik, PVDF Immobilon membranu (Millipore), rotacijski mikrotom (Leica), silanizirana histološka stakla, spektrofotometar Tecan Spark Multimode Microplate Reader (Tecan), staklene kuglice promjera 1,0-1,51 mm (Retsch), svjetlosni mikroskop (Olympus BX51), šprica volumena 2 mL, tubica volumena 1,5 mL, tubica volumena 2 mL, tubica volumena 5 mL, tuba volumena 25mL, urarska pinceta, urno staklo i wolframova iglica.

### 3.4 Metode

Tijekom ovog istraživanja korištene su: eksperimentalna metoda dobivanja eksperimentalnog TCa u miša, prikupljanje te primarna obrada i pravilna pohrana animalnog i humanog materijala, klasične metode histološke analize tkiva, molekularne metode analize ekspresije proteina te statistička obrada podataka.

#### 3.4.1 Izolacija zametaka miša

Za dobivanje zametaka u fazi gastrulacije, mužjaci su uvečer stavljeni na parenje u kavez sa ženkama, a sutradan ujutro određena je prisutnost vaginalnog čepa. Dan nalaza vaginalnog čepa označen je kao 0. dan graviditeta, odnosno 0,5. dan starosti zametka.

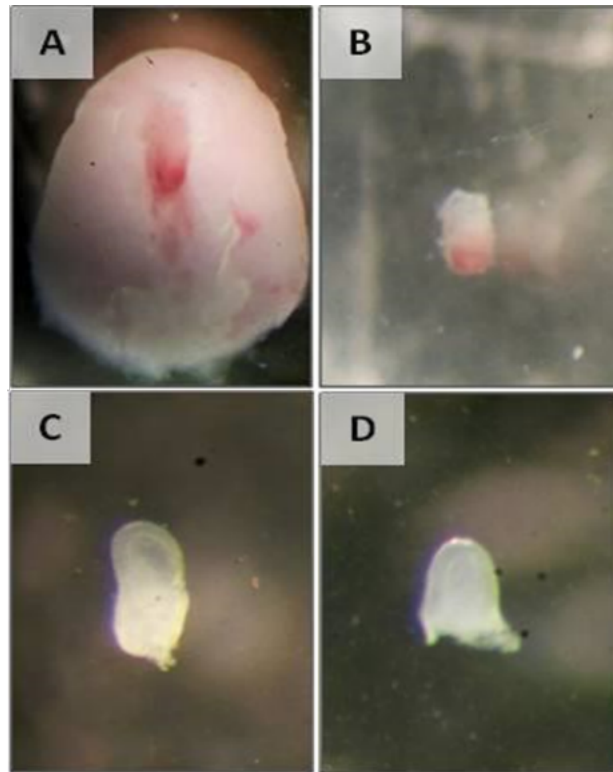
Ujutro 7. dana graviditeta, zameci su stari 7,5 dana i nalaze se u stadiju gastrulacije. Ženke su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Trbušna stijenka dezinficirana je s 70% EtOH radi aseptične



izolacije uterusa. Kirurškim škarama učinjen je široki rez kože na distalnom dijelu trbuha okomito na medijanu. Rukama je oderana koža sa trbušnog zida kako bi se spriječila kontaminacija operativnog polja dlakama životinje. Otvaranjem trbušnog zida pristupilo se uterusu. Nakon odvajanja od mezometrija, rogovi uterusa su izolirani i isprani u sterilnom PBS-u u Petrijevoj zdjelici. Na rogovima uterusa bila su primijećena zadebljanja zbog prisutnosti deciduoma.

Daljnji postupak izolacije rađen je u sterilnim uvjetima pod disekcijskim mikroskopom (binokularnom lupom). Urarskim pincetama otvoren je uterus i izolirani su deciduomi (Slika 7.). Pojedini deciduom je pažljivo otvoren finim urarskim pincetama čime se pristupilo zametnom cilindru. Nakon što je zametni cilindar izoliran, urarskom pincetom je odvojen parijetalni list žumanjčane vreće s Reichertovom membranom od ektoplacentalnog konusa. Zatim su zameci pomoću "braking" pipete prebačeni u urno staklo s čistim PBS-om. Nadalje, zametak je prerezan wolframovim iglicama na razini amniona čime je odvojen ekstraembrionalni dio od zametnog cilindra. Zametni su cilindri pomoću „braking“ pipete prebačeni u urno staklo s čistim PBS-om.

U ovom istraživanju upotrijebljen je isključivo zametni cilindar kao transplantat, te se u daljnjem tekstu zametni cilindar naziva zametak i označava slovom Z radi jasnijeg izričaja i jednostavnijeg označavanja.



**Slika 7. Prikaz izolacije zametka miša u stadiju gastrule.** Prikaz različitih faza u protokolu izolacije zametka miša iz uterusa za potrebe ektopične transplantacije. A) Deciduum otvoreno u medijani s prikazom zametka. B) Izolirani zametak s ekto-placentalnim konusom. C) Zametak s ekstraembrionalnim dijelom. D) Zametni cilindar u stadiju gastrule. Izvor: Zbirka slika Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.4.2 Transplantacija zametaka miša i razvoj eksperimentalnog TCa in vivo

Nakon izolacije i ispiranja u PBS, Z su pod disekcijskim mikroskopom pomoću „braking“ pipete transplantirani pod bubrežnu čahuru mužjaka slijedećom tehnikom. Nakon predoperativne njege koja je uključivala uklanjanje hrane i vode u uvjetima potpune tišine, dnevnog svjetla i sobne temperature, mužjaci su anestezirani jednokratnom i.p. injekcijom kombinacije Xylapana (4 mg/kg) i Narketana (5 mg/kg). Mužjaci su bili postavljeni na grijani jastuk radi sprječavanja hipotermije i uginuća, a na očne otvore je stavljena i održavana kap dH<sub>2</sub>O kako bi se spriječila dehidracija rožnice i posljedična sljepoća. Postupak ektopične transplantacije slijedio je uobičajen protokol. Ukratko, u desnom lumbalnom području, kirurškim škarama je učinjen rez na koži veličine do 1 cm. Slijedeći rez učinjen je kirurškim škarama na trbušnom zidu okomito na prethodni

i veličine 0,5-0,7 cm kroz koji se pristupilo bubregu. Bubrežna kapsula zarezana je 2 mm skalpelom na frontalnoj strani bubrega. Kroz rez, ispod bubrežne kapsule, a iznad parenhima bubrega, sondom širine 2 mm učinjen je džep dubine do 5 mm u koji je „braking“ pipetom postavljen jedan Z. Nakon samostalne repozicije bubrega, trbušni je zid zatvoren jednim šavom resorptivnim koncem, a kožna rana je zatvorena Michel kopčom. Pored polaganja na grijani jastuk, održavanja očiju pod kapi dH<sub>2</sub>O, osiguravanja potpune tišine i sobne temperature prostora, dodatna postoperativna njega i analgezija nisu bile potrebne. Po samostalnom buđenju, životinje su vraćene u kaveze i slijedećih četiri tjedna uobičajeno monitorirane bez ikakve eksperimentalne manipulacije. 28 dana po transplantaciji, životinje su usmrćene cervikalnom dislokacijom, a tumori izolirani. Ukupno je dobiveno 30 tumora. Tkivo 10 TCa je za potrebe Western blottinga (WB) pohranjeno u sterilnu tubicu volumena 2 mL bez dodanog medija na -80°C. Tkivo 20 TCa za potrebe histološke i imunohistokemijske analize pohranjeno je u sterilnu tubicu volumena 5 mL sa dodanim 10% puferiranim formalinom do vrha tubice na +4°C.

Za potrebe histološke analize, nakon fiksacije u 10% puferiranom formalinu TCa su dehidrirani u uzlaznom nizu EtOH i ksilola te uklapljeni u parafinske blokove, sukladno standardnom histološkom protokolu uklapanja tkiva u parafin. Parafinske kocke su skladištene na +4°C. Rezanjem parafinskih blokova na rotacijskom mikrotomu dobiveni su serijski rezovi debljine 4 µm koji su položeni na silanizirana histološka stakla. Rezovi su dalje čuvani na +4°C.

### *3.4.3 Uzorkovanje humanog TCa*

Humani materijal uzorkovan je nakon regrutiranja pacijenata u istraživanje, a tijekom preuzimanja tkiva tumora testisa na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ KBC Sestre milosrdnice, neposredno nakon učinjene indicirane orhidektomije u okviru rutinskog liječenja pacijenata sa sumnjom na tumor testisa. U istraživanje su uključeni uzorci parafinskih blokova TCa 20 pacijenata i krioblokovi TCa 8 pacijenata, nakon potvrde kliničkog patologa da je riječ o definitivnoj dijagnozi TCa testisa sukladno rutinskoj dijagnostičkoj patohistološkoj analizi orhiektomiranog tkiva pacijenta uključenog u istraživanje. Za potrebe WB-a, svježi humani tumorski materijal je pohranjen u sterilnoj tubici volumena 2 mL bez dodanog medija na -80°C na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ KBC Sestre milosrdnice te naknadno

transportiran u tekućem dušiku na daljnju pohranu na  $-80^{\circ}\text{C}$  na Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta. Za potrebe histološke analize i IHC korišten je standardno obrađen materijal prema protokolu rutinske dijagnostike za TT, odnosno tkivo tumora fiksirano je u 10% puferirani formalin i potom uklopljeno u parafin te pohranjeno do obrade na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Na rotacijskom mikrotomu dobiveni su serijski rezovi debljine  $4\ \mu\text{m}$  koji su položeni na silanizirana stakla. Rezovi su dalje čuvani na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

#### *3.4.4 Metode klasične histologije*

U izradi histoloških preparata obojanih hemalaun-eozinom (HE) korišteni su hematoxylin (BioGnost) i eozin (BioGnost) uz dodatak kapi ledene octene kiseline.

Odabrani serijski rezovi parafinskih blokova TCa debljine  $4\ \mu\text{m}$  položeni na silanizirana stakla prethodno čuvani na  $+4^{\circ}\text{C}$ , ostavljeni su 30 min na sobnoj temperaturi. HE preparati izrađeni su prema sljedećem protokolu koristeći histološke čašice za kemikalije i histološku pincetu za predmetnice: 100% ksilol I. 10 min, 100% ksilol II. 10 min, 100% EtOH I. 5 min, 100% EtOH II. 5 min, 96% EtOH I. 5 min, 96% EtOH II. 5 min, 70% EtOH 5 min,  $\text{dH}_2\text{O}$  5 min, hemalaun 50 sek, ispiranje u  $\text{dH}_2\text{O}$  10 sek,  $\text{vH}_2\text{O}$  5 min,  $\text{dH}_2\text{O}$  5 min, eozin 40 sek, ispiranje u 70% EtOH 10 sek, 70% EtOH 5 min, 96% EtOH II. 5 min, 96% EtOH I. 5 min, 100% EtOH II. 5 min, 100% EtOH I. 5 min, 100% ksilol II. 10 min, 100% ksilol I. 10 min. Obojeni histološki preparati uklopljeni su u BioMount DPX Low medij (BioGnost) i ostavljeni da se osuše na zraku na sobnoj temperaturi pod histološkim zvonom sa stalkom 24 sata. Potom su skladišteni u histološkim mapama na sobnoj temperaturi. HE rezovi 20 mišjih eksperimentalnih TCa i 20 humanih TCa pregledani su na velikom i malom povećanju svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX51) u svrhu identifikacije različitih tipova stanica i struktura prisutnih u svakom uzorku.

#### *3.4.5 Analiza ekspresije gena na razini proteina imunohistokemijskom metodom i morfometrijom*

Analiza ekspresije gena *Pcna*, *Kaspaza 3*, *Oct3/4*, *Nanog*, *Neurofilament 200 (NfH)*, *Gfap*, *Nestin*, *Keratin-15 (CK15)* i *Hnf4 $\alpha$*  na razini proteina provedena je detekcijom prisutnosti proteina u tkivu tumora metodom IHC. Detektirani su proteinski produkti pomoću specifičnih primarnih protutijela

(Tablica 8.) upotrebom peroksidaza–anti-peroksidaza metode uz vizualizaciju DAB kromogenom (DAKO).

Odabrani serijski rezovi parafinskih blokova TCa debljine 4  $\mu\text{m}$  položeni na silanizirana stakla prethodno čuvani na  $+4^{\circ}\text{C}$ , ostavljeni su 30 minuta na sobnoj temperaturi. IHC preparati tkiva uklopljenih u parafin izrađeni su prema sljedećem protokolu koristeći histološke čašice za kemikalije, histološku pincetu za predmetnice te vlažnu komoru: 100% ksilol I. 10 min, 100% ksilol II. 10 min, 100% EtOH I. 5 min, 100% EtOH II. 5 min, 96% EtOH I. 5 min, 96% EtOH II. 5 min, 70% EtOH 5 min,  $\text{dH}_2\text{O}$  5 min, demaskiranje epitopa kuhanjem preparata u kuhalu na paru u citratnom pufer pH 6 (Agilent Technologies) ili Tris- EDTA pufer pH9 (1 mM Tris (Carl Roth), 0,1 mM EDTA (Kemika) prema tablici 8., TBS 5 min (5 mM Tris (Carl Roth), 15 mM NaCl (Kemika), blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela inkubacijom u 5% kozjem serumu (Imunološki zavod) 20 minuta, inkubacija u otopini primarnog protutijela razrijeđenog prema tablici 8. u TBS-u s 1% govedeg seruma (Sigma-Aldrich) te 0.1% deterdženta Tween 20 (Sigma-Aldrich) preko noći na  $+4^{\circ}\text{C}$  u vlažnoj komori, TBS 5 puta po 5 min, blokiranje endogenih peroksidaza 3% vodikovim peroksidom (Kemika) 20 min u mraku, TBS 3 puta po 5 min, inkubacija u otopini sekundarnog protutijela protiv zečjeg antigena konjugiranog enzimom peroksidaze iz hrena razrijeđenog (ab97051, Abcam) 1:1000 u TBS-u s 1% govedeg seruma (Sigma-Aldrich) te 0.1% deterdženta Tween 20 1 sat na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, TBS 3 puta po 5 min, vizualizacija signala inkubacijom u otopini DAB kromogena i DAB supstrata (Dako REAL, K5007, DAKO) 5 minuta u mraku u vlažnoj komori,  $\text{dH}_2\text{O}$  5 min, bojanje hemalaunom 10 sek,  $\text{vH}_2\text{O}$  8 min,  $\text{dH}_2\text{O}$  5 min, ispiranje u 70% EtOH 10 sek, 70% EtOH 5 min, 96% EtOH II. 5 min, 96% EtOH I. 5 min, 100% EtOH II. 5 min, 100% EtOH I. 5 min, 100% ksilol II. 10 min, 100% ksilol I. 10 min. Obojeni histološki preparati uklopljeni su u BioMount DPX Low medij (BioGnost) i ostavljeni da se osuše na zraku na sobnoj temperaturi pod histološkim zvonom sa stalkom 24 sata. Potom su skladišteni u histološkim mapama na sobnoj temperaturi.

Kao negativna metodološka kontrola korišteni su histološki preparati tkiva TCa koji tijekom imunohistokemijskog protokola nisu inkubirani s primarnim protutijelima.

**Tablica 8. Popis primarnih protutijela i adekvatnih kemikalija za demaskiranje epitopa korištenih u analizi ekspresije gena na razini proteina metodom IHC analize tkiva.** Za potrebe analize ekspresije gena biljega proliferacije, apoptoze i diferencijacije metodom IHC korišten je niz primarnih protutijela sukladno optimiziranim koncentracijama i protokolima. Sva korištena primarna protutijela bila su poliklonalnog izotipa podrijetlom iz zeca. Također su prikazane adekvatne kemikalije i protokoli korišteni za demaskiranje epitopa.

Antigen	Biljeg	Kataloški broj	Proizvođač	Razrjeđenje	Demaskiranje epitopa
PCNA	proliferacije	ab15497	Abcam	1:100	pH 6 citratni pufer 20 min
Kaspaza 3	apoptoze	ab13847	Abcam	1:50	pH 6 citratni pufer 60 min
Oct3/4	pluripotentnosti i matičnosti	NBP2-67748	Novus Biologicals	1:150	pH 6 citratni pufer 60 min
Nanog	pluripotentnosti i matičnosti	ab106465	Abcam	1:200	pH9 Tris-EDTA pufer 60 min
Neurofilament 200	matičnih stanica ektoderma	N4142	Sigma-Aldrich	1:500	pH 6 citratni pufer 20 min
GFAP	glijalne diferencijacije	NB300-141	Novus Biologicals	1:1.000	pH 6 citratni puffer 20 min
Nestin	neuralnih matičnih stanica	NBP1-02419	Novus Biologicals	1:150	pH 6 citratni pufer 20 min
Keratin-15	kožne diferencijacije	SAB4501658	Sigma-Aldrich	1:100	pH 6 citratni pufer 20 min
HNF4 $\alpha$	endodermalne diferencijacije	NBP1-89679	Novus Biologicals	1:200	pH9 Tris-EDTA pufer 60 min

Svi preparati bili su pregledani od strane iskusnog patologa pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51). HE preparati korišteni su pri analizi lokalizacije imunohistokemijskog signala. Svi su preparati pregledani pod malim povećanjem (40X). Procjena imunopozitiviteta je utvrđena na velikom povećanju (200X) pod svjetlosnim mikroskopom tehnikom semikvantitativne analize uzimajući u obzir intenzitet reakcije bojenja (IR) (Tablica 9.) te postotak imunoreaktivnih stanica (PRS) (Tablica 10.).

**Tablica 9. Određivanje IR skora.** Ovisno o intenzitetu reakcije bojenja, analiziranim su tkivima dodijeljeni odgovarajući IR skorovi.

IR skor	Opis
0	nema reakcije
1	slaba reakcija
2	umjerena reakcija
3	jaka reakcija

**Tablica 10. Određivanje PRS skora.** Ovisno o postotku imunoreaktivnih stanica prisutnih u tkivu, analiziranim su tkivima dodijeljeni odgovarajući PRS skorovi.

PRS skor	Opis
0	nema reaktivnih stanica
1	<10 % pozitivnih stanica
2	10 – 50 % pozitivnih stanica
3	>50 % pozitivnih stanica

Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB, engl. *Immunoreactive score, IRS*) dobiven je kao umnožak IR-a i PRS-a prema prikazanoj formuli.

$$IIB=IR \times PRS$$

IIB može iznositi od 0 do 9. Sukladno dobivenom IIB-u, tkiva su morfometrijski kategorizirana kako je prikazano u Tablici 11.

**Tablica 11. Određivanje IIB kategorije.** Ovisno o dobivenoj vrijednosti IIB-a, analizirana su tkiva raspoređena u odgovarajuće morfometrijske kategorije koje odražavaju razinu ekspresije gena od interesa na proteinskoj razini u analiziranim tkivima TCa.

IIB	Morfometrijska kategorija
0-1	nema ekspresije gena
2-4	niska ekspresija gena
6-9	visoka ekspresija gena

### 3.4.6 Analiza ekspresije gena na razini proteina metodom Western blottinga

Za potrebe analize ekspresije gena na razini proteina metodom Western blottinga, inicijalno je korišteno deset smrznutih eksperimentalnih TCa miša, no zbog male količine tumorskog tkiva dva TCa nije bilo moguće analizirati na sve biljege. Također, za analizu metodom Western blottinga korišteno je 8 humanih TCa.

Humani i mišji uzorci TCa, ranije pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ , radi uspješnije homogenizacije prvo su uklopljeni u kriostatu, a potom narezani na kriomikrotomu (Leica CM1860 UV) na serijske rezove debljine  $10\ \mu\text{m}$  pri temperaturi  $-20^{\circ}\text{C}$  u kriostatu. Rezovi su u kriostatu položeni na histološke predmetnice. Tkivo je potom sastrugano oštricom sterilnog skalpela sa stakla i stavljeno u homogenizacijski pufer za radioimunoprecipitacijsku analizu (RIPA) (25 mM Tris Ph 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Na-Deoxycholate, 1% TX-100, 5 mM EDTA) uz dodatak 4% koktela inhibitora proteaza (Complete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche). Budući da je mišji teratokarcinom mješavina isključivo teratoma i embrionalnog karcinoma, korišteni su svi dijelovi kriorezova mišjeg TCa. Budući da postoji mogućnost pojave miješanih formi TZST-a u kojima se pored teratoma i embrionalnog karcinoma pojavljuju i ostali tipovi TZST-a, humani kriorezovi su makrodisecirani skalpelom prema markacijama kliničkog patologa na temelju HE preparata, a s ciljem da se u homogenat uključe isključivo komponente teratokarcinoma.

Homogenizacija je provedena na kugličnom homogenizatoru (Bertin) uz dodatak sterilnih staklenih kuglica promjera 1,0-1,5 mm (Retsch). Homogenizacija je provedena vibracijom 3 puta po 60 sekundi sa međuperiodima bez vibracije 60 sekundi. Miješanjem malih volumena humanih i mišjih u jedinstveni uzorak napravljen je referentni uzorak. Uzorci su pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za potrebe daljnjih analiza, uzorci su otapani u posudi s ledom u trajanju od 15 minuta te rehomogenizirani vibracijom 30 sekundi.

Nakon homogenizacije, određena je koncentracija proteina u homogenatima metodom pomoću bicinkoninične kiseline (BCA1, Sigma-Aldrich). U tu svrhu po  $5\ \mu\text{L}$  homogenata razrijeđeno je s RIPA puferom do konačnog volumena  $25\ \mu\text{L}$  (razrjeđenje 1:5). Uzorci su inkubirani 30 minuta na  $37^{\circ}\text{C}$  s  $200\ \mu\text{L}$  otopine dobivene miješanjem BCA s 4% otopinom  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) u volumnom omjeru 50:1. Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu, intenzitet obojenja



otopine izmjeren je pri valnoj duljini od 562 nm na spektrofotometru Tecan Spark Multimode Microplate Reader (Tecan). Koncentracija proteina u uzorcima očitana je iz baždarnog pravca. Kao standardna otopina proteina rabljena je otopina BSA u RIPA (područje koncentracija 100–1000 µg/mL, odnosno 0,01–1,0 mg/mL). Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su i očitani u triplikatu.

Mjerenju ekspresije 9 gena od interesa Western blotting metodom prethodila je optimizacija metode kako bi se odredila najbolja količina proteina, koncentracija protutijela te gustoća gela za razdvajanje. Prema optimiziranim protokolima, određena količina homogenata je pomiješana s Laemmli puferom 4X (0,250 M Tris HCl, 40% glicerol, 8% β- merkaptotanol, 8% SDS, 0,008% bromfenol plavo). Tako priređeni uzorci su prokuhani 5 minuta na 95°C u vH<sub>2</sub>O u čaši na plinskom plameniku.

Priređeni uzorci homogenata podvrgnuti su diskontinuiranoj denaturirajućoj gel-elektroforezi proteina provedenoj u sabijajućem (5%) i razdvajajućem (5-15%) poliakrilamidnom gelu, debljine 0,5 mm, prema metodi po Laemmliju (104). Pritom je korišten Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). U prvu jažicu je nanoseno 5 µL proteinskog standarda Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (BioRad), a u ostale homogenati.

Elektroforezom razdvojeni proteini preneseni su na PVDF Immobilon membranu (Millipore) u uređaju za vlažan elektroforetski prijenos Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) sukladno uputama proizvođača u trajanju od 45 minuta.

Membrane su inkubirane 1 sat u puferu za blokiranje membrane (5% BSA (Sigma) u TBST puferu (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (Roth)), u dH<sub>2</sub>O, pH 7,5), u svrhu sprječavanja

nespecifičnog vezanja proteina na slobodna vezna mjesta na membrani. Membrane su potom uzdužno razrezane skalpelom na nekoliko dijelova kako bi trake PVDF Immobilon membrane uključivale područje očekivanog položaja proteina od interesa, a sukladno oznakama standarda. Određene trake membrana inkubirane su u plastičnim kutijama za inkubaciju sa specifičnim primarnim protutijelima u određenim koncentracijama (Tablica 12.) na +4°C uz kontinuirano gibanje na klackalici preko noći. Sva primarna protutijela priređena su u otopini za protutijela (5M

NaCl, 1M Tris, 10% natrijev azid, 5% BSA, 1% fenol crveno). Membrane su zatim isprane 5 puta po 5 minuta u puferu TBST te potom izložene vezanju odgovarajućeg sekundarnog protutijela (Tablica 12.) uz kontinuirano gibanje na klackalici tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Po ispiranju membrane 6 puta po 5 minuta u puferu TBST, inkubirane su s reagensom za pojačanu kemiluminiscenciju Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), a zatim su signali vizualizirani korištenjem ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) i integriranog računalnog programa (Bio-Rad). Isti računalni program korišten je za analizu denzitometrijskog signala tako da je dobivena denzitometrijska vrijednost razine pojedinog analiziranog proteina u uzorku normirana na relativnu vrijednost razine signala referentnog proteina (Histon H2B,  $\alpha$ -Tubulin ili GAPDH), a dobivena vrijednost normirana na referentni uzorak prema jednadžbi:

$$CUX = DUX \times DSH / DUH \times DSX$$

pri čemu CUX označava razinu proteina od interesa u analiziranom tkivu, DUX denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u analiziranom uzorku, DSH denzitometrijsku vrijednost razine referentnog proteina u standardnom uzorku, DUH denzitometrijsku vrijednost razine referentnog proteina u analiziranom uzorku, a DSX denzitometrijsku vrijednost razine proteina od interesa u referentnom uzorku.

Dobivene vrijednosti su dalje grafički prikazane i opisane u rezultatima.

**Tablica 12. Popis primarnih i sekundarnih protutijela korištenih u analizi ekspresije gena na razini proteina metodom Western blottinga.** Za potrebe analize ekspresije gena biljega proliferacije, apoptoze i diferencijacije metodom Western blottinga korišten je niz primarnih i sekundarnih protutijela sukladno optimiziranim koncentracijama. <sup>1</sup>Monoklonalni izotip protutijela, <sup>2</sup>poliklonalni izotip protutijela.

Antigen	Biljeg	Kataloški broj	Podrijetlo <sup>izotip</sup>	Proizvođač	Razrjeđenje
PCNA	proliferacije	ab15497	Zec <sup>2</sup>	Abcam	1:1.000
Kaspaza 3	apoptoze	NB100-56112SS	zec <sup>2</sup>	Novus Biologicals	1:500
Oct3/4	pluripotentnosti i matičnosti	sc-5279	Miš <sup>1</sup>	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Nanog	pluripotentnosti i matičnosti	ab106465	zec <sup>2</sup>	Abcam	1:250
Neurofilament 200	matičnih stanica ektoderma	N4142	zec <sup>2</sup>	Sigma-Aldrich	1:5.000
GFAP	glijalne diferencijacije	NB300-141	zec <sup>2</sup>	Novus Biologicals	1:12.500
Nestin	neuralnih matičnih stanica	sc-23927	miš <sup>1</sup>	Novus Biologicals	1:400
Keratin-15	kožne diferencijacije	NBP2-67525	zec <sup>1</sup>	Novus Biologicals	1:500
HNF4 $\alpha$	endodermalne diferencijacije	sc-374229	miš <sup>1</sup>	Santa Cruz Biotechnology	1:500
H2B	referentni protein	sc-8650	Koza <sup>1</sup>	Santa Cruz Biotechnology	1:200
GAPDH	referentni protein	IMG-5143A	zec <sup>2</sup>	Imgenex	1:2.000
Tubulin	referentni protein	ab52866	zec <sup>1</sup>	Abcam	1:10.000
Zečji IgG	sekundarno protutijelo	ab97051	koza <sup>2</sup>	Abcam	1:40.000
Mišji IgG	sekundarno protutijelo	K500711	miš i zec (poliklonalno)	Agilent Technologies	1:30
Kozji IgG	sekundarno protutijelo	sc-2033	magarac (poliklonalno)	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000

### *3.4.7 Statistička obrada podataka*

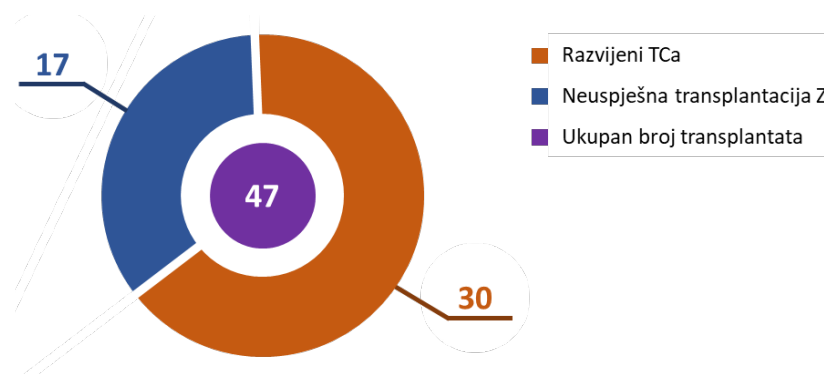
Rezultati su obrađeni u računalnom programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, USA) za Windows operativni sustav. Broj licence je GPW6-278912-RLMU-966F4.

Mjere centralne tendencije (aritmetička sredina) kao i mjere disperzije (standardna pogreška, SEM) opisane su koristeći deskriptivnu statistiku. Razlika u prisutnosti različitih tipova stanica i struktura analizirana je Fisherovim egzaktnim testom. Za normalno raspoređene rezultate korišten je parametrijski (t-test), a za ostale neparametrijski test (Mann-Whitney U test). Statistički značajni rezultati smatrani su oni čija je  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

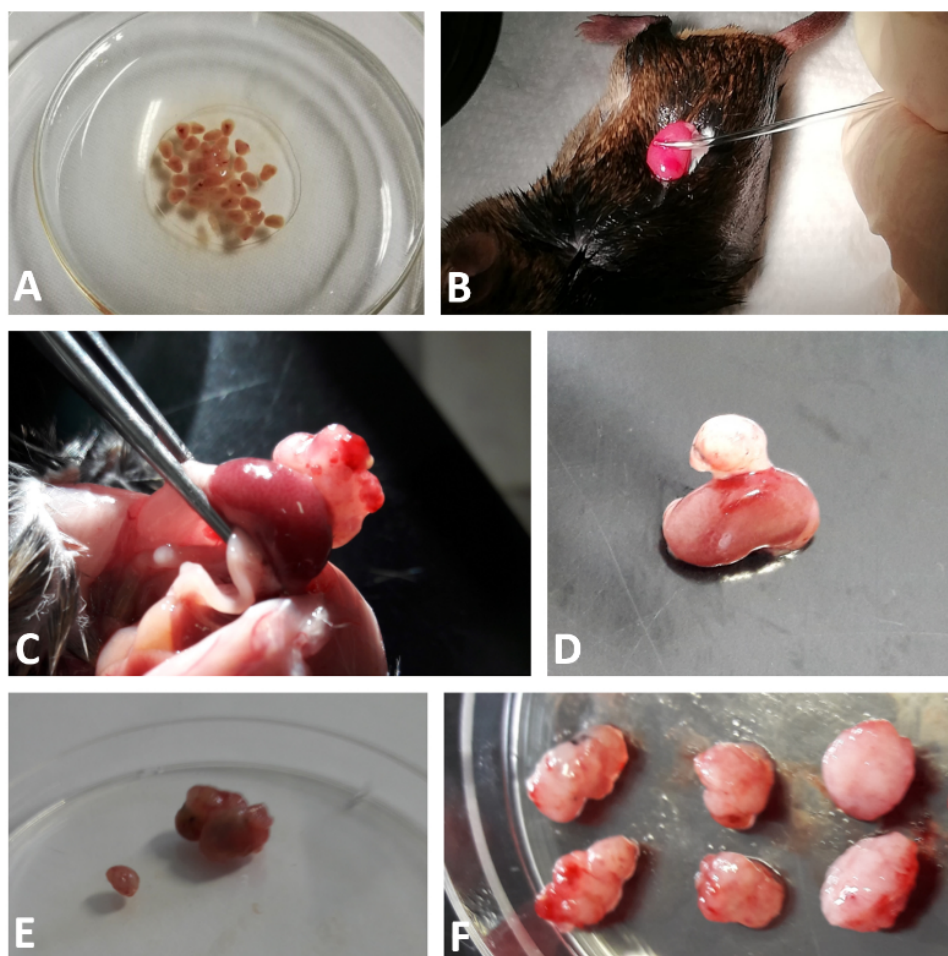
### 4.1 Uspješnost izazivanja eksperimentalnog TCa miša

Ukupno je ektopično transplantirano 47 Z pod čahuru bubrega singeničnih mužjaka miševa soja C3H. Inspekcijom bubrega nakon 28 dana nakon transplantacije izolirano je ukupno 30 tumora. Postignuta je uspješnost transplantacije od 63,8% (Slika 8.).



**Slika 8. Uspješnost transplantacije Z u uspostavi animalnog modela eksperimentalnog TCa miša.** Od ukupno 47 transplantiranih Z, 30 se razvilo u makroskopski jasno vidljivu masu TCa što pokazuje uspješnost transplantacije Z od preko 60%.

Tumori su se prikazali kao bijela tvrda masa koja je prominirala nad tkivom bubrega. Tumori su se lako odvajali od tkiva bubrega budući da nisu invadirali parenhim bubrega (Slika 9.).

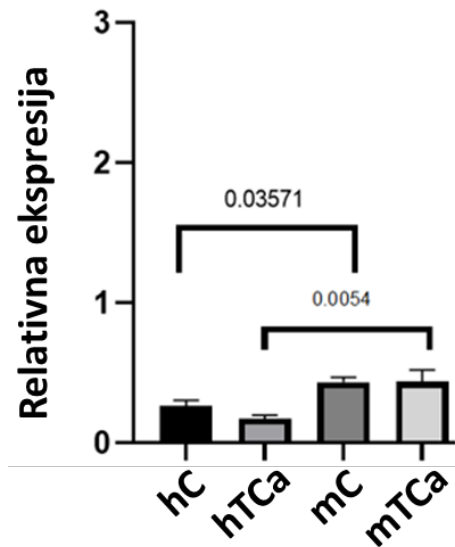


**Slika 9. Razvoj eksperimentalnog teratokarcinoma u miša.** Nakon 28 dana po transplantaciji Z pod čahuru bubrega, razvili su se jasno vidljive tumorske mase koje prominiraju nad parenhimom bubrega. A) Izolirani deciduomi prije izolacije Z. B) Bubreg po završetku transplantacije Z pod čahuru. C) Pogled na abdominalnu šupljinu i bubreg sa tumorskom masom. D) Izolirani bubreg sa prominirajućom tumorskom masom. E) Dva izolirana tumora koja jasno pokazuju razliku u tumorskoj masi. F) Skup 6 većih tumora.

#### 4.2 Proliferacijska aktivnost u TCa

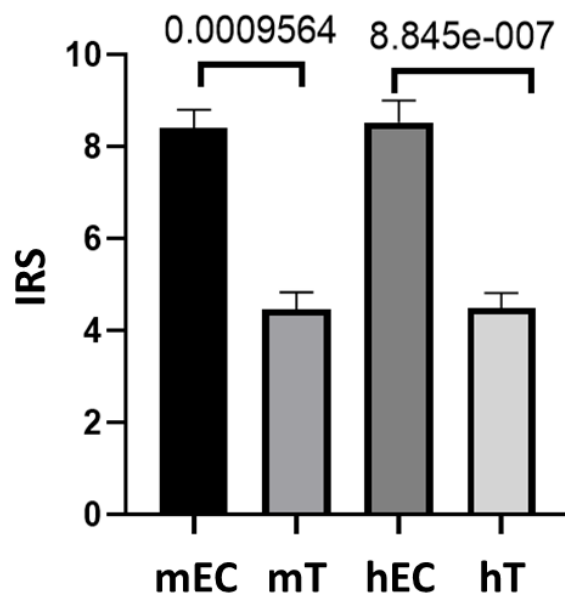
Analiza proliferacije stanica učinjena je analizom ekspresije biljega proliferacije gena *Pcna* na proteinskoj razini. Western blotting analiza homogenata cijelih tumora pokazuje da ne postoji značajno odstupanje proliferacijske aktivnosti odnosno ekspresije gena *Pcna* u tkivu TCa ni miša niti čovjeka u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim netumorskim tkivima (Slika 10.). Ukratko, proliferacijska aktivnost u eksperimentalnom TCa miša pokazuje jednaki obrazac intenziteta kao i

u humanom TCa u odnosu na kontrolna tkiva. Usporedba proliferacijske aktivnosti u tumorskim tkivima ukazuje na snažniju proliferacijsku aktivnost u mišjem TCa u odnosu na humani TCa (Slika 10.).



**Slika 10. Ekspresija biljega proliferacije *Pcna* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega proliferacije gena *Pcna* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na snažniju proliferacijsku aktivnost u mišjim tkivima u odnosu na humano tkivo. Jasna je statistički značajno snažnija proliferacija u mišjem u odnosu na humano kontrolno tkivo ( $p=0,03571$ ) te u mišjem TCa u odnosu na humani TCa ( $p=0,0054$ ). Ne postoji značajna razlika u proliferaciji tumorskog tkiva u odnosu na netumorske kontrole ni u mišjem ni u humanom TCa. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTca: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTca: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

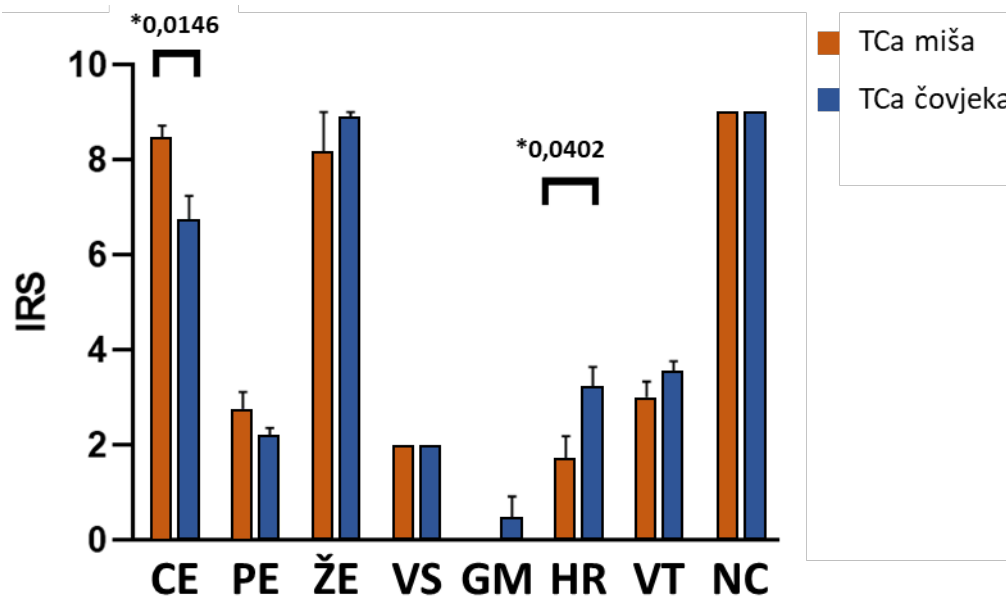
Analiza proliferacijske aktivnosti odnosno ekspresije biljega proliferacije gena *Pcna* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Protein Pcna u nediferenciranoj EC komponenti pokazao je višu imunoreaktivnost (IIB) nego u diferenciranoj T komponenti u uzorcima i miševa i ljudi. Taj trend IIB-a jednak je u usporedbi mišjih tkiva sa humanim tkivima budući da je ustanovljen podjednak IIB u EC i T miša i čovjeka (Slika 11.).



**Slika 11. Ekspresija biljega proliferacije *Pcna* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega proliferacije gena *Pcna* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na snažniju proliferacijsku aktivnost u nediferenciranim EC komponentama TCa i u miša ( $p=8.845e-007$ ) i u čovjeka ( $p=0,0009564$ ). Ne postoji značajna razlika u proliferaciji pojedine komponente u TCa miša u usporedbi sa TCa čovjeka. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije proteina *Pcna* po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu proliferacijsku aktivnost u mnogoslojnom pločastom epitelu, žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, glatkim mišićnim stanicama, vezivnom tkivu i neuralnim cijevima. Ipak, identificirana su tkiva koja pokazuju različit intenzitet proliferacije u usporedbi mišjeg sa humanim TCa. Tako je statistički značajno viši IIB ekspresije *Pcna* uočen u cilindričnom epitelu u TCa miša, a hrskavice u TCa čovjeka (Slika 12.).



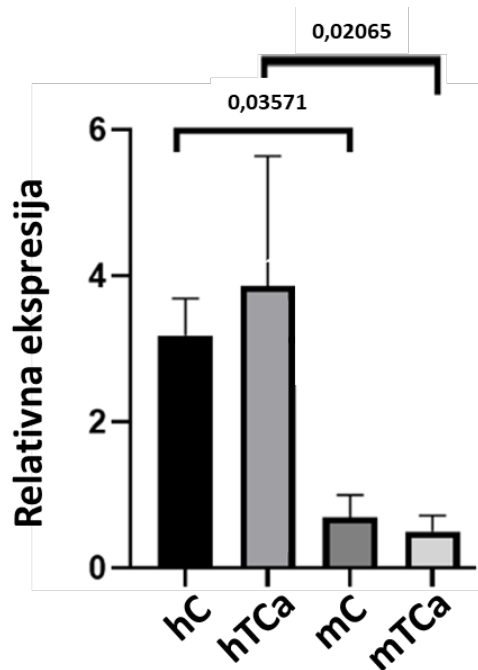


**Slika 12. Ekspresija biljega proliferacije *Pcna* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega proliferacije gena *Pcna* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku proliferacijsku aktivnost u pojedinim diferenciranim tkivima TCa miša u usporedbi sa TCa čovjeka. Statistički značajno snažnija proliferacijska aktivnost pronađena je jedino u hrskavici u TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,0402$ ), odnosno u cilindričnom epitelu TCa miša u odnosu na TCa čovjeka ( $p=0,0146$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

### 4.3 Apoptotička aktivnost u TCa

Analiza apoptoze stanica učinjena je analizom ekspresije biljega apoptoze gena *Kaspaza-3* i to aktivne forme na proteinskoj razini. Western blotting analiza homogenata cijelih tumora pokazuje da ne postoji značajno odstupanje apoptotičke aktivnosti odnosno ekspresije gena *Kaspaza-3* u tkivu TCa ni miša niti čovjeka u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim netumorskim tkivima (Slika 13.). Ukratko, apoptotička aktivnost u eksperimentalnom TCa miša pokazuje jednaki

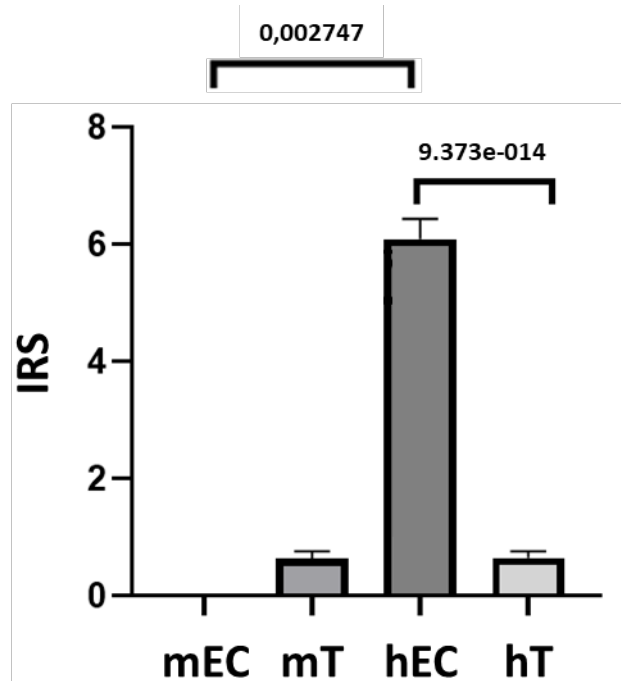
obrazac intenziteta kao i u humanom TCa u odnosu na kontrolna tkiva. Usporedba apoptotičke aktivnosti u tumorskim tkivima ukazuje na snažniju proliferacijsku aktivnost u humanom TCa u odnosu na mišji TCa (Slika 13.).



**Slika 13. Ekspresija biljega apoptoze aktivne *Kaspaze-3* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega apoptoze gena aktivne *Kaspaze-3* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na snažniju apoptotičku aktivnost u tkivima čovjeka u odnosu na tkivo miša. Jasna je statistički značajno snažnija apoptoza u humanom TCa u odnosu na mišji TCa ( $p=0,02065$ ) te u okolnom netumorskom kontrolnom tkivu u čovjeka u odnosu na netumorsko kontrolno tkivo u miša ( $p=0,03571$ ). Ne postoji značajna razlika u apoptozi tumorskog tkiva u odnosu na netumorske kontrole ni u mišjem niti u humanom TCa. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

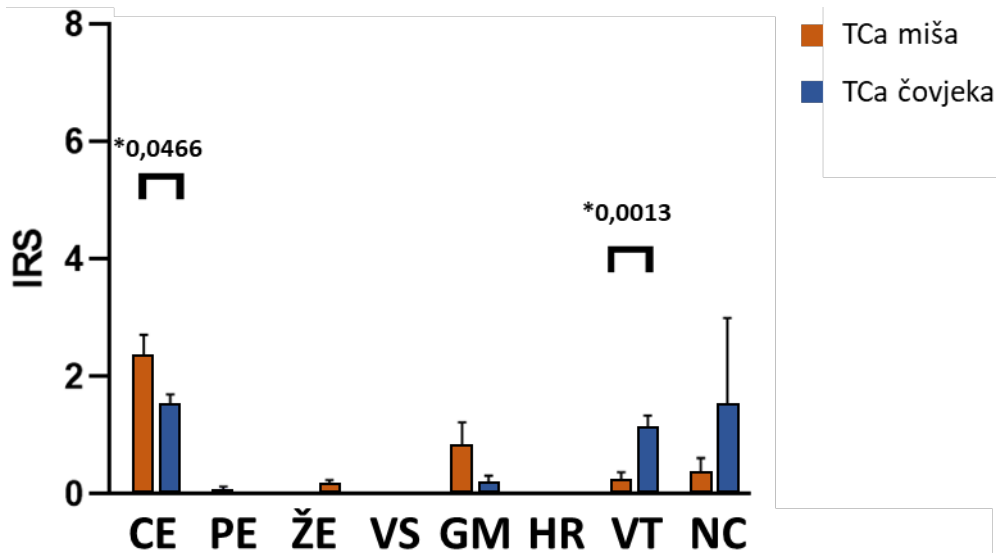
Analiza apoptotičke aktivnosti odnosno ekspresije biljega apoptoze gena *Kaspaza-3* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Statistički značajna razlika pokazana je pri usporedbi IIB vrijednosti *Kaspaze-3* u EC i T komponentama humanog TCa. Taj odnos nije detektiran u usporedbi mišje EC i T komponente.

IIB vrijednost u EC komponenti humanog TCa bila je viša nego u EC komponenti mišjeg TCa, iako nije uočena nikakva razlika u vrijednosti IIB-a u usporedbi diferencirane komponente teratoma u humanog TCa u odnosu na mišji TCa (Slika 14.).



**Slika 14. Ekspresija biljega apoptoze *Kaspaze-3* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega apoptoze gena *Kaspaza-3* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na snažnu apoptotičku aktivnost u nediferenciranoj EC komponenti TCa u čovjeka i u usporedbi s netumorskim okolnim tkivom testisa u čovjeka ( $p=9.373e-014$ ) i u usporedbi s nediferenciranom EC komponentom animalnog modela eksperimentalnog TCa u miša ( $p=0,002747$ ). Diferencirane teratomske komponente TCa pokazuju jednaku apoptotičku aktivnost kako u miša tako i u čovjeka. Također, nasuprot velike razlike u tkivima čovjeka, nije pronađena statistički značajna razlika u apoptotičkoj aktivnosti mišje nediferencirane EC komponente u odnosu na diferenciranu teratomsku komponentu TCa u miša. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije proteina *Kaspaza-3* po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu apoptotičku aktivnost u mnogoslojnom pločastom epitelu, žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, glatkim mišićnim stanicama, hrskavici i neuralnim cijevima. Ipak, identificirana su tkiva koja pokazuju različit intenzitet apoptotičke aktivnosti u usporedbi mišjeg sa humanim TCa. Tako je statistički značajno viši IIB ekspresije *Kaspaza-3* uočen u cilindričnom epitelu u TCa miša, a u vezivnom tkivu u TCa čovjeka (Slika 15.).

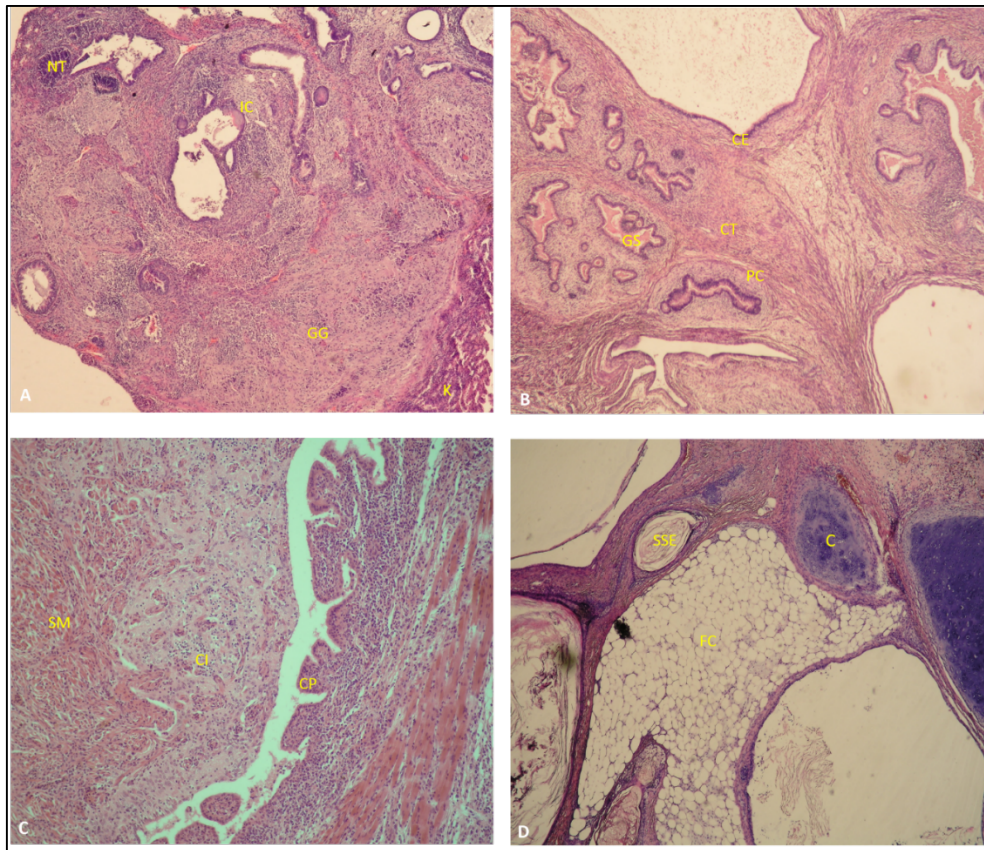


**Slika 15. Ekspresija biljega apoptoze *Kaspaza-3* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega apoptoze gena *Kaspaza-3* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku apoptotičku aktivnost u pojedinim diferenciranim tkivima TCa miša u usporedbi sa TCa čovjeka. Statistički značajno snažnija apoptotička aktivnost pronađena je jedino u vezivnom tkivu u TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,0013$ ), odnosno u cilindričnom epitelu TCa miša u odnosu na TCa čovjeka ( $p=0,0466$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

#### 4.4 Histološka analiza diferencijacije tkiva u TCa

Analiza diferencijacije tkiva provedena je od strane kliničkog patologa na HE preparatima. Na svim preparatima mišjih i humanih uzoraka potvrđen je nalaz TCa, odnosno jasno su se nalazile

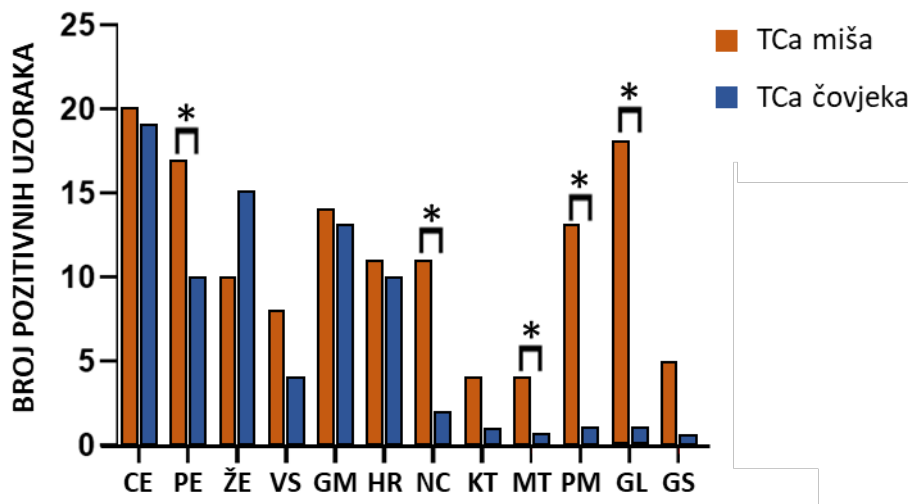
komponente teratoma i embrionalnog karcinoma (Slika 16.). Teratomska komponenta bila je građena od derivata svih triju zametnih listića, ali različitog stupnja diferenciranosti i različite zastupljenosti. Komponenta embrionalnog karcinoma bila je građena od stanica embrionalnog karcinoma.



**Slika 16. Histološka građa TCa.** A) i C) TCa miša. B) i D) humani TCa. NT: neuralna cijev; IC: nezrela hrskavica; GG: ganglijske stanice i glija; K: bubreg; CE: stupčasti epitel; GS: žljezdana struktura sa stupčastim epitelom; CT: vezivno tkivo; PC: periglandularno vezivno tkivo; SM: skeletni mišić; CI: vezivno tkivo s upalnim stanicama; CP: struktura nalik horoidnom pleksusu; C: hrskavica; SSSE: višeslojni pločasti epitel; FT: masne stanice. HE (100X).

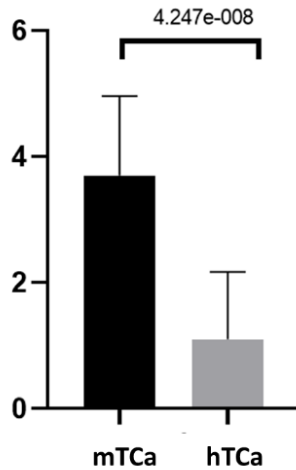
Analiza diferencirane teratomske komponente TCa, ukazala je na prevladavajuću sličnost u prisutnosti pojedinih diferenciranih tkiva između mišjih i humanih TCa. Cilindrični epitel, žljezdani epitel, vrčaste stanice, stanice glatkog mišića, hondrociti, koštano tkivo i ganglijske stanice jednako su zastupljene i u mišjem i u humanom TCa. Ipak, detektirana su tkiva sa statistički značajnom razlikom u zastupljenosti. Tako je u mišjem TCa statistički značajno češće prisutan

pločasti epitel ( $p=0,0407$ ), neuralna cijev ( $p=0,0057$ ), masno tkivo ( $p=0,0202$ ), poprečno-prugasti mišić ( $p=0,0004$ ) i glija stanice ( $p=0,0001$ ) u odnosu na humani TCa (Slika 17.).



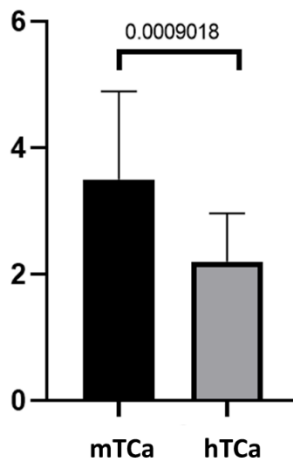
**Slika 17. Histološka analiza prisutnosti diferenciranih stanica i tkiva u teratomskoj komponenti mišjeg i humanog TCa.** Većina analiziranih tkiva podjednako je zastupljena u mišjem i humanom TCa. Ipak, uočena je statistički značajna razlika u zastupljenosti pojedinih tkiva uglavnom ektodermalnog i mezodermalnog podrijetla. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; NC: neuralne cijevi; KT: kost; MT: masno tkivo; PM: poprečnoprugasti mišić; GL: glija stanice; GS: gangliji. Podaci su statistički obrađeni korištenjem Fisherovog egzaktnog testa.  $p < 0,05$ .

Daljnja analiza histoloških preparata te naknadno grupiranje prema embrionalnom podrijetlu dokazala je uočenu razliku. Naime, strukture ektodermalnog podrijetla pokazale su najsnažniju statistički značajnu razliku zastupljenosti, prevladavajući u mišjem TCa dok su se u humanom TCa tek povremeno prikazivale (Slika 18.).



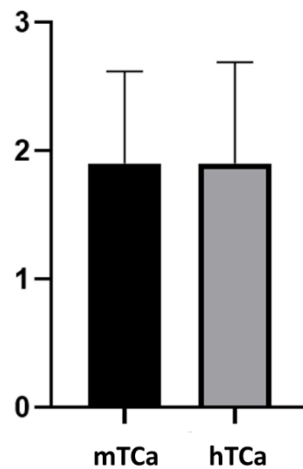
**Slika 18. Zastupljenost ektodermalnih struktura.** Analiza HE preparata ukazala je na statistički značajnu snažniju zastupljenosti stanica i tkiva ektodermalnog podrijetla u mišjem TCa u odnosu na humani TCa. Podaci su statistički obrađeni korištenjem Fisherovog egzaktnog testa.  $p= 4.247e-008$ .

Strukture mezodermalnog podrijetla također su se statistički značajnije prikazivale u mišjem TCa u usporedbi sa humanim TCa (Slika 19.).



**Slika 19. Zastupljenost mezodermalnih struktura.** Analiza HE preparata ukazala je na statistički značajnu snažniju zastupljenosti stanica i tkiva mezodermalnog podrijetla u mišjem TCa u odnosu na humani TCa. Podaci su statistički obrađeni korištenjem Fisherovog egzaktnog testa.  $p= 4.247e-008$ .

Tek su strukture endodermalnog podrijetla bile jednako zastupljene i u mišjem i u humanom TCa bez značajnih statističkih razlika (Slika 20.).



**Slika 20. Zastupljenost endodermalnih struktura.** Analiza HE preparata ukazala je na podjednaku zastupljenost stanica i tkiva endodermalnog podrijetla u mišjem i humanom TCa. Podaci su statistički obrađeni korištenjem Fisherovog egzaktnog testa.

#### 4.5 Molekularna analiza diferencijacije tkiva u TCa

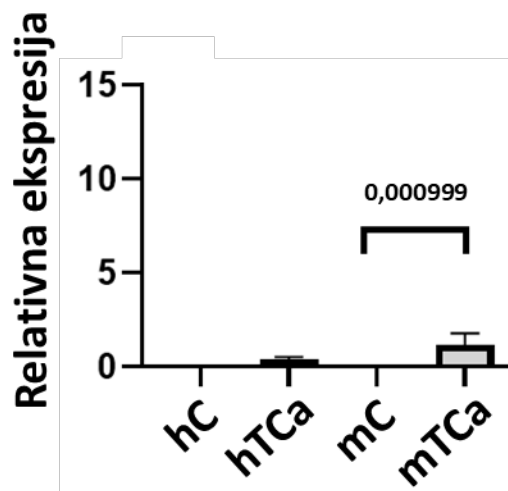
Molekularna analiza diferencijacije tkiva provedena je metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena biljega diferenciranosti stanica ili određenog stupnja i smjera diferencijacije u cjelokupnom tkivu TCa. Mišji TCa analizirani su u cijelosti, dok su humani TCa prije homogenizacije mikrodisecirani kako bi se osiguralo da se u homogenatu nalaze isključivo proteini teratomske i embrionalno karcinomske komponente odnosno TCa te izbjegnu primjese ostalih tipova TZST koji bi se mogli nalaziti u miješanom tumoru testisa.

Naknadno je učinjena analiza diferencijacije tkiva metodom IHC i naknadnom morfometrijskom analizom odnosno određivanjem ekspresije gena biljega diferenciranosti stanica ili određenog stupnja i smjera diferencijacije u pojedinim komponentama odnosno tkivima TCa.



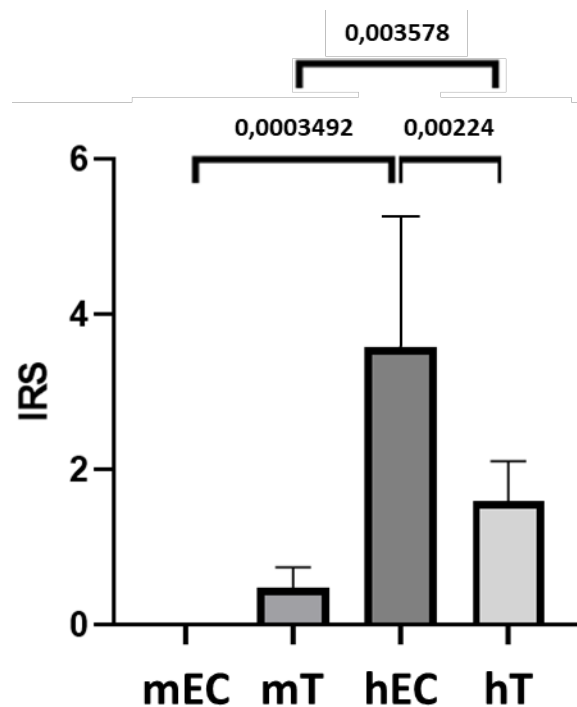
#### 4.5.1 Ekspresija gena *Nfh* biljega neuronske i aksonske diferencijacije

Ekspresija gena *Nfh* potiče neuralnu i aksonsku diferencijaciju. Molekularna analiza diferencijacije tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *Nfh* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je na gotovo jednak stupanj neuronske diferencijacije u TCa miša i TCa čovjeka. Također je uočeno da humani TCa pokazuje jednak stupanj ekspresije gena *Nfh* kao i okolno netumorsko tkivo, za razliku od mišjeg TCa koji ima statistički značajniju ekspresiju gena *Nfh* u odnosu na netumorsko kontrolno tkivo (Slika 21.).



**Slika 21. Ekspresija biljega neuronske i aksonske diferencijacije *Nfh* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega neuronske i aksonske diferencijacije gena *Nfh* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na gotovo podjednaku neuronsku diferencijaciju humanih i mišjih tkiva. Naime, nije uočena statistički značajna razlika u neuronskoj diferencijaciji ni u kontrolnim niti u tumorskim tkivima miša u usporedbi s tkivima čovjeka. Iako mišji TCa pokazuje snažniju neuronsku diferencijaciju u usporedbi s netumorskim kontrolnim tkivom ( $p=0,000999$ ), humani TCa i mišji TCa pokazuju jednak stupanj neuronske diferencijacije. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

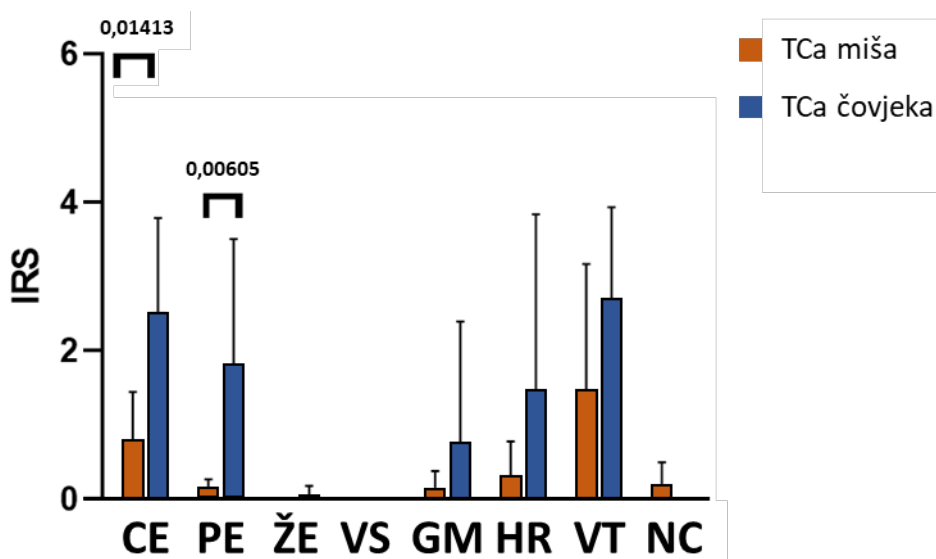
Analiza neuronske i aksonske diferencijacije odnosno ekspresije gena *Nfh* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Statistički značajna razlika pokazana je pri usporedbi IIB vrijednosti *Nfh* u EC i T komponentama humanog TCa. Taj odnos nije detektiran u usporedbi mišje EC i T komponente. IIB vrijednost u EC komponenti humanog TCa bila je statistički značajno viša nego u EC komponenti mišjeg TCa. Statistički značajna snažnija ekspresija detektirana je i u teratomskej komponenti humanog TCa u odnosu na TCa miša. Dakle, neuronska diferencijacija značajno je prisutnija u humanom TCa u usporedbi sa TCa miša. Valja napomenuti i inverziju ekspresije. Naime, u mišjem TCa, ekspresija *Nfh* snažnija je u teratomskej komponenti, dok je u TCa čovjeka snažnija u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti (Slika 22.).



**Slika 22. Ekspresija biljega neuronske i aksonske diferencijacije *Nfh* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega neuronske i aksonske diferencijacije gena *Nfh* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na snažnu neuronsku i aksonsku diferencijaciju u nediferenciranoj EC komponenti TCa u čovjeka i u usporedbi s netumorskim okolnim tkivom testisa u čovjeka ( $p=9.373e-014$ ) i u usporedbi s nediferenciranim EC komponentom animalnog modela eksperimentalnog TCa u miša ( $p=0,002747$ ). Diferencirane teratomske komponente TCa pokazuju jednaku neuronsku i aksonsku

diferencijaciju kako u miša tako i u čovjeka. Također, nasuprot velike razlike u tkivima čovjeka, nije pronađena statistički značajna razlika u neuronskoj i aksonskoj diferencijaciji mišje nediferencirane EC komponente u odnosu na diferenciranu teratomsku komponentu TCa u miša. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p < 0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije proteina Nfh po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu neuronsku i aksonsku diferencijaciju u žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, glatkim mišićnim stanicama, hrskavici, vezivnom tkivu i neuralnim cijevima. Ipak, identificirana su tkiva koja pokazuju različit intenzitet neuronske i aksonske diferencijacije u usporedbi mišjeg sa humanim TCa. Tako je statistički značajno viši IIB ekspresije Nfh uočen u cilindričnom i pločastom epitelu u TCa čovjeka u odnosu na TCa miša (Slika 23.).

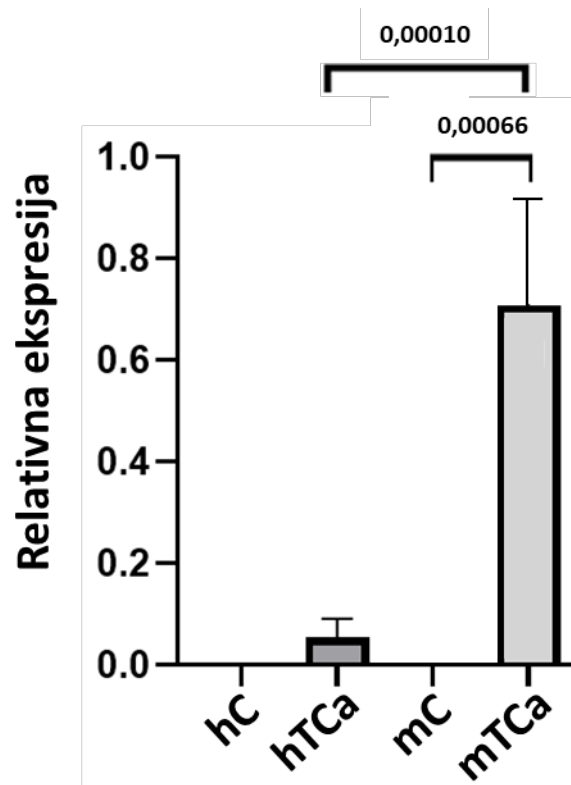


**Slika 23. Ekspresija biljega neuronske i aksonske diferencijacije *Nfh* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega neuronske i aksonske diferencijacije gena *Nfh* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku diferencijacijsku aktivnost u većini tkiva TCa čovjeka i TCa miša. Statistički značajno snažnija neuronska i aksonska diferencijacija pronađena je jedino u cilindričnom epitelu u TCa

čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,01413$ ), i u pločastom epitelu TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,00605$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

#### 4.5.2 Ekspresija gena *Gfap* biljega diferencijacije glijalnih stanica

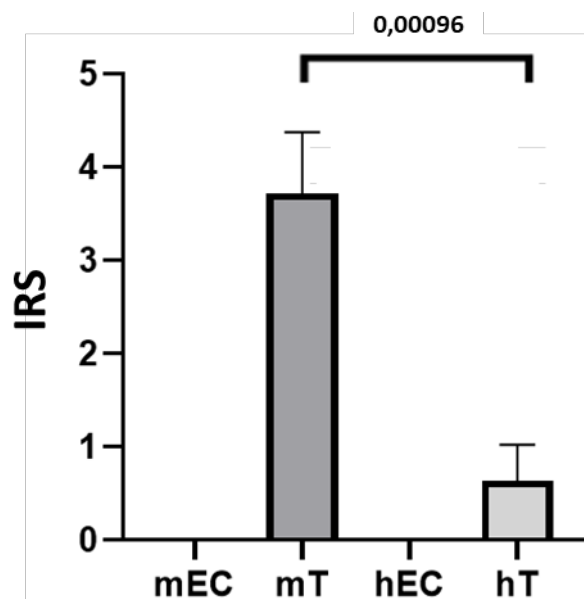
Ekspresija gena *Gfap* potiče diferencijaciju u glijalne stanice. Molekularna analiza diferencijacije tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *Gfap* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je na snažnu razliku u ekspresiji ovog biljega u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka. Naime, *Gfap* je gotovo jednako eksprimiran u TCa čovjeka i netumorskom okolnom tkivu, dok je u TCa miša značajno eksprimiraniji u odnosu na netumorsko tkivo miša. Također, uočena je statistički značajno viša ekspresija gena *Gfap* u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka (Slika24.) .



**Slika 24. Ekspresija biljega diferencijacije glija stanica *Gfap* u TCa i netumorskom tkivu.**

Ekspresija biljega diferencijacije glija stanica gena *Gfap* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na drastičnu razliku u ekspresiji u mišjem TCa u odnosu na humani TCa ( $p=0,00010$ ). Iako u humanom TCa ne postoji razlika ekspresije gena *Gfap* u odnosu na netumorsko okolno tkivo, mišji TCa pokazuje statistički značajno višu ekspresiju u odnosu na netumorsko kontrolno tkivo ( $p= 0,00066$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

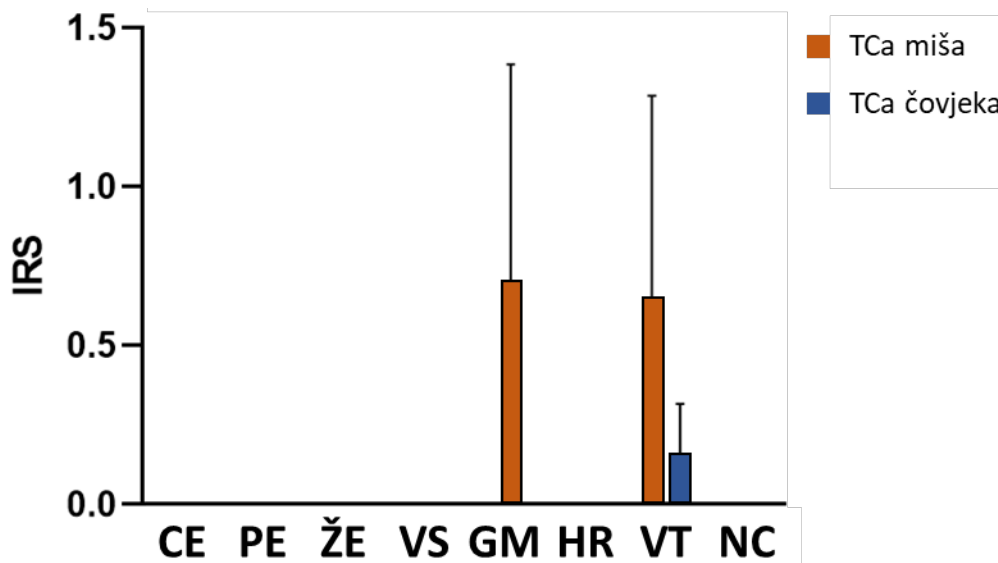
Analiza diferencijacije glijalnih stanica odnosno ekspresije gena *Gfap* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Uočeno je da *Gfap* gotovo uopće nije eksprimiran u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa ni u miša niti u čovjeka. *Gfap* je otkriven isključivo u diferenciranoj komponenti TCa i miša i čovjeka. Također, detektirana je iznimno snažna ekspresija gena *Gfap* u diferenciranoj teratomskej komponenti TCa miša u odnosu na TCa u čovjeka (Slika 25.).



**Slika 25. Ekspresija biljega diferencijacije glijalnih stanica *Gfap* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega diferencijacije glija stanica gena *Gfap* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na snažnu

glijalnu diferencijaciju isključivo u diferenciranoj teratomskoj komponenti TCa i miša i čovjeka gotovo bez ekspresije u nediferenciranim komponentama embrionalnog karcinoma. Nadalje, uočena je daleko snažnija statistički značajna ekspresija gena *Gfap* u teratomskoj komponenti TCa miša u odnosu na teratomsku komponentu TCa čovjeka ( $p=0,00096$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije proteina Gfap po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je potpuni izostanak glijalne diferencijacije u cilindričnom i pločastom epitelu, žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, hrskavici i neuralnim cijevima. Ipak, identificirana su tkiva koja pokazuju ekspresiju proteina Gfap i to ponajviše u TCa miša. Tako je ekspresija detektirana u glatkom mišiću i vezivnom tkivu u TCa miša, dok je u TCa čovjeka detektirana isključivo u vezivnom tkivu (Slika 26.).

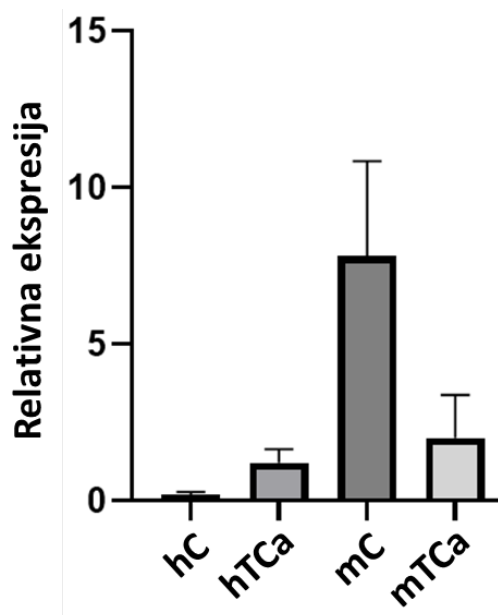


**Slika 26. Ekspresija biljega diferencijacije glijalnih stanica *Gfap* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega glijalne diferencijacije gena *Gfap* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku diferencijacijsku aktivnost gotovo u svim tkivima TCa čovjeka i TCa miša. Ekspresija proteina Gfap pronađena je isključivo u vezivnom tkivu TCa i miša i čovjeka te u glatkom mišiću samo u TCa miša. Statistički značajne

razlike nisu pronađene. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p < 0,05$ .

#### 4.5.3 Ekspresija gena *CK15* biljega epidermalne diferencijacije

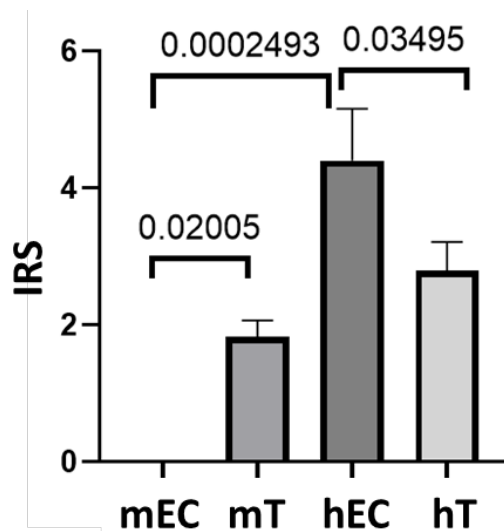
Ekspresija gena *CK15* biljeg je epidermalne diferencijacije. Molekularna analiza diferencijacije tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *CK15* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je na gotovo statistički jednak stupanj epidermalne diferencijacije u TCa miša i TCa čovjeka te odgovarajućih kontrola (Slika 27.).



**Slika 27. Ekspresija biljega epidermalne diferencijacije *CK15* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega epidermalne diferencijacije gena *CK15* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na statistički podjednaku epidermalnu diferencijaciju humanih i mišjih tkiva. Naime, nije uočena statistički značajna razlika u epidermalnoj diferencijaciji ni u kontrolnim niti u tumorskim tkivima miša u usporedbi s tkivima čovjeka. Također, nije pronađena razlika između TCa i netumorskog kontrolnog tkiva ni u miša niti u čovjeka. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo

testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p < 0,05$ .

Analiza epidermalne diferencijacije odnosno ekspresije gena *CK15* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Uočeno je da nediferencirana embrionalno karcinomska komponenta TCa miša uopće ne pokazuje epidermalnu diferencijaciju, za razliku od embrionalno karcinomske komponente u TCa čovjeka koja iznimno snažno eksprimira gen *CK15*. Nastavno, u TCa miša gen *CK15* snažnije je ekspimiran u teratomskoj, dok je u TCa čovjeka snažnije ekspimiran u embrionalno karcinomskoj komponenti (Slika 28.).

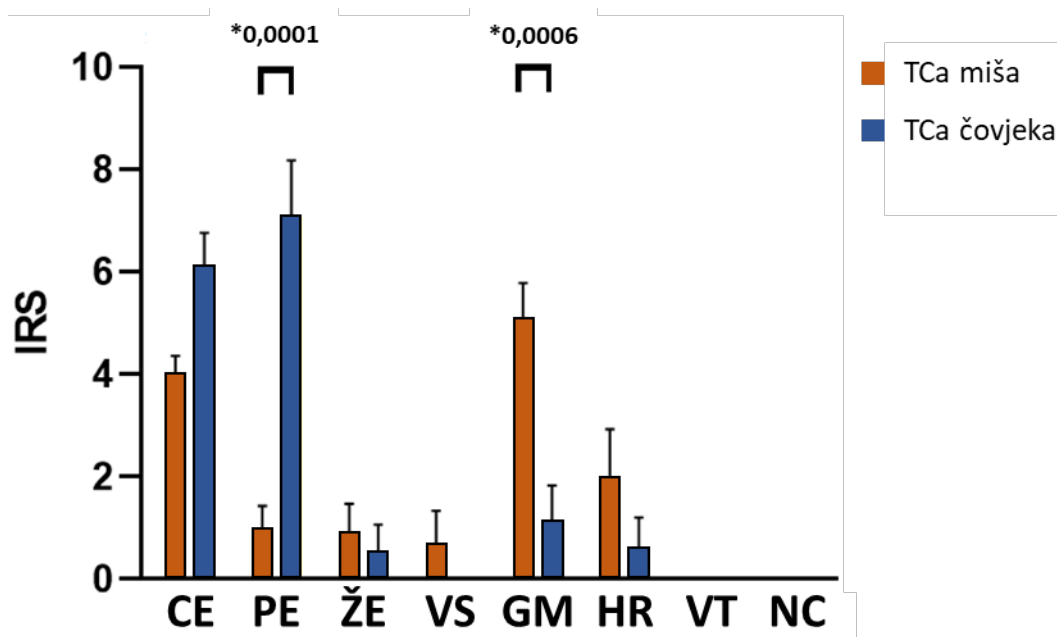


**Slika 28. Ekspresija biljega epidermalne diferencijacije *CK15* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega epidermalne diferencijacije gena *CK15* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na oprečne rezultate u tkivima miša u odnosu na tkiva čovjeka. U TCa miša nediferencirana embrionalno karcinomska komponenta ne eksprimira *CK15* te je detektirana statistički značajno viša ekspresija u diferenciranoj teratomskoj komponenti TCa miša ( $p=0,02005$ ). U čovjeka, obje komponente ekspimiraju *CK15*, ali je snažnije prisutan u nediferenciranoj komponenti. Naime, embrionalno karcinomska komponenta TCa čovjeka ima statistički značajno snažniju ekspresiju gena *CK15* u odnosu na diferenciranu teratomsku komponentu TCa čovjeka ( $p=0,03495$ ). Usporedba ekspresije



*CK15* u diferenciranim komponentama ukazuje da i mišji i ljudski TCa jednako eksprimiraju biljeg epidermalne diferencijacije u teratomskoj diferenciranoj komponenti TCa. Suprotno, stistički značajno viša ekspresija gena *CK15* pronađena je u nediferenciranoj komponenti TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,0002493$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije proteina CK15 po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu epidermalnu diferencijaciju u cilindričnom i žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, hrskavici, vezivnom tkivu i neuralnim cijevima. Ipak, identificirana su tkiva koja pokazuju različiti intenzitet epidermalne diferencijacije u usporedbi mišjeg sa humanim TCa. Tako je statistički značajno viši IIB ekspresije CK15 uočeni u pločastom epitelu u TCa čovjeka u odnosu na TCa miša, te u glatkim mišićnim stanicama u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka (Slika 29.).

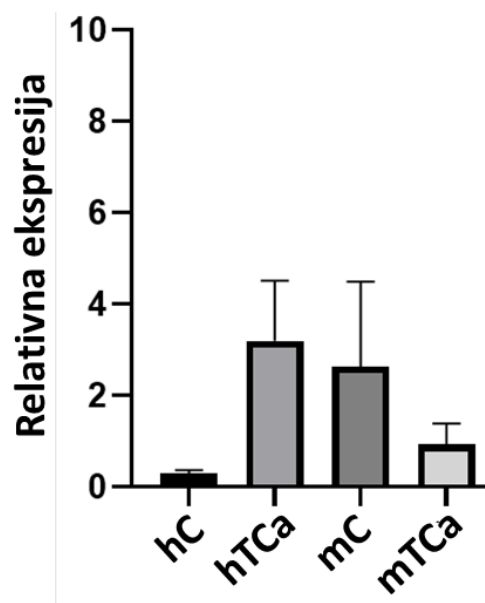


**Slika 29. Ekspresija biljega epidermalne diferencijacije *CK15* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega epidermalne diferencijacije gena *CK15* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku diferencijacijsku aktivnost u većini tkiva TCa čovjeka i TCa miša. Statistički značajno snažnija

epidermalna diferencijacija pronađena je jedino u pločastom epitelu u TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,0001$ ), odnosno u glatkom mišiću TCa miša u odnosu na TCa čovjeka ( $p=0,0006$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

#### 4.5.4 Ekspresija gena *Nestin* biljega diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica

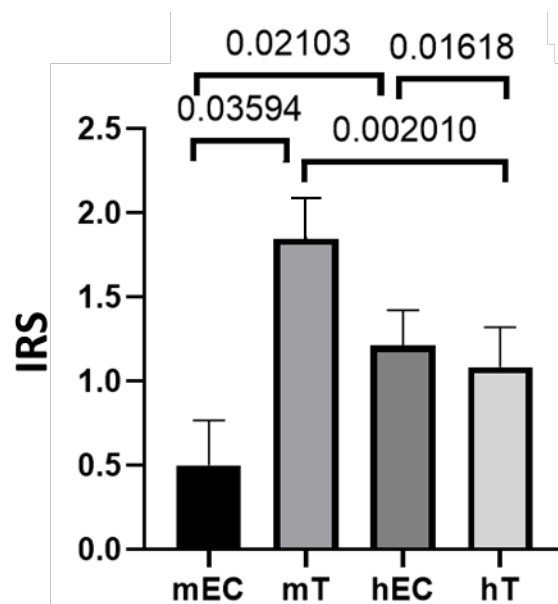
Ekspresija gena *Nestin* potiče diferencijaciju u smjeru neuroektodermalnih matičnih stanica. Molekularna analiza diferencijacije tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *Nestin* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je na gotovo jednaku zastupljenost neuroektodermalnih matičnih stanica u TCa miša i TCa čovjeka. Naime, iako su uočene razlike u trendovima ekspresije, nije detektirana statistički značajna razlika u ekspresiji gena *Nestin* na proteinskoj razini (Slika 30.).



**Slika 30. Ekspresija biljega diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica *Nestin* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega ektodermalnih matičnih stanica gena *Nestin* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na gotovo podjednaku diferencijaciju humanih i mišjih tkiva. Naime, nije uočena statistički značajna razlika u zastupljenosti neuroektodermalnih matičnih stanica ni u kontrolnim niti u tumorskim tkivima miša

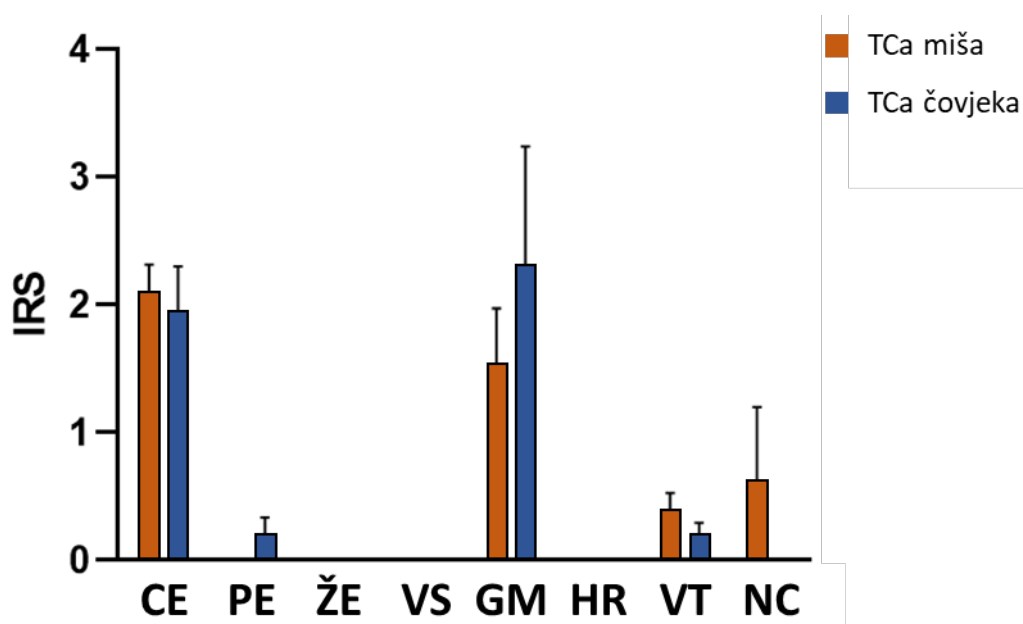
u usporedbi s tkivima čovjeka. Uočeni su trendovi ekspresije koji statistički nisu značajni. Naime, ekspresija gena *Nestin* viša je u tkivu TCa čovjeka u odnosu na okolno netumorsko tkivo, dok je kod miša ekspresija snažnija u netumorskom tkivu nego u TCa. Također, ekspresija gena *Nestin* snažnija je u TCa čovjeka nego u TCa miša, iako razlika nije statistički značajna. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p < 0,05$ .

Analiza diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica odnosno ekspresije gena *Nestin* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Statistički značajna razlika pokazana je pri usporedbi IIB vrijednosti svih analiziranih tkiva međusobno. U TCa miša gen *Nestin* statistički je značajnije eksprimiran u diferenciranoj teratomskoj komponenti u usporedbi sa nediferenciranom embrionalno karcinomskom komponentom. U TCa čovjeka upravo je obrnuto. Nadalje, gen *Nestin* statistički je značajno eksprimiraniji u nediferenciranoj komponenti TCa čovjeka u odnosu na miša, dok je u diferenciranoj komponenti TCa statistički značajnije eksprimiran u TCa miša u odnosu na čovjeka. Ukratko, gen *Nestin* pokazuje potpuno oprečan profil ekspresije u usporedbi diferencirane i nediferencirane komponente TCa čovjeka i miša (Slika 31.).



**Slika 31. Ekspresija biljega diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica *Nestin* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega neuroektodermalne diferencijacije gena *Nestin* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na prisutnu diferencijaciju neuroektodermalnih matičnih stanica i u TCa miša i u TCa čovjeka. Ipak, ekspresijski obrasci potpuno su oprečni. Tako je u TCa miša gen *Nestin* statistički značajnije eksprimiran u diferenciranoj teratomskoj komponenti TCa ( $p=0,03594$ ), dok je u TCa čovjeka statistički značajnije eksprimiran u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti ( $p=0,01618$ ). Nadalje, gen *Nestin* snažnije je eksprimiran u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,02103$ ), dok je u diferenciranoj teratomskoj komponenti značajnije eksprimiran u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka ( $p=0,002010$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

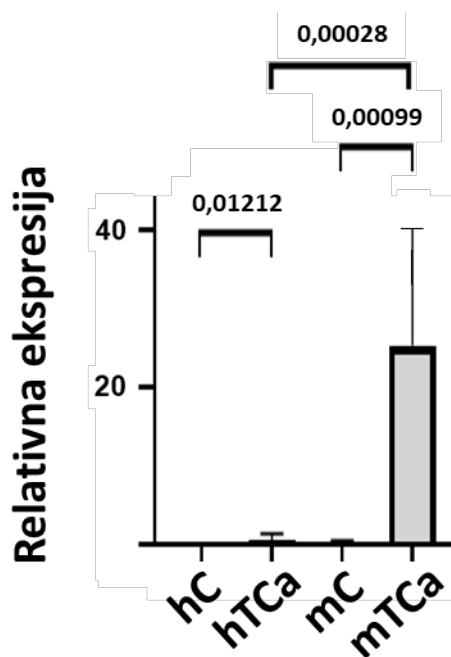
Detaljnija analiza ekspresije proteina Nestin po različitim tkivima diferencirane teratomske komponente mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu neuroektodermalnu diferencijaciju u svim analiziranim tkivima bez detektirane statistički značajne razlike (Slika 32.).



**Slika 32. Ekspresija biljega diferencijacije neuroektodermalnih matičnih stanica *Nestin* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega neuroektodermalne diferencijacije gena *Nestin* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku diferencijacijsku aktivnost u diferenciranim teratomskim komponentama TCa čovjeka i TCa miša. Statističke značajnosti u razlici ekspresije proteina Nestin nisu pronađene ni u jednom analiziranom tkivu. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p < 0,05$ .

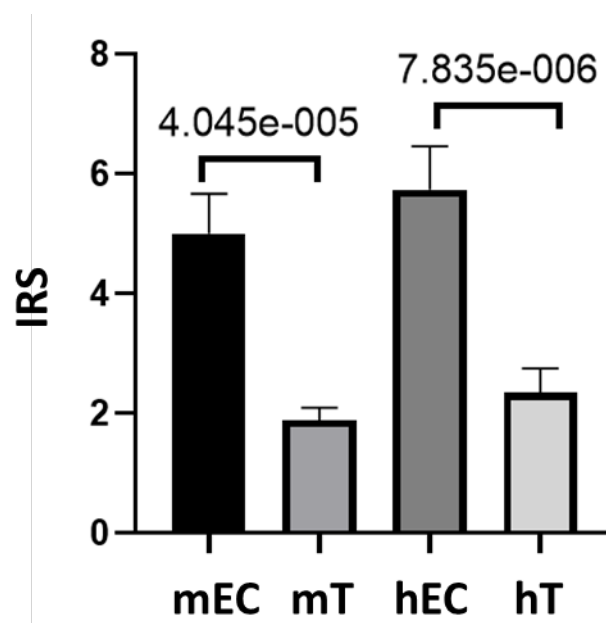
#### 4.5.5 Ekspresija gena *Hnf4a* biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica

Ekspresija gena *Hnf4a* potiče diferencijaciju endodermalnih matičnih stanica. Molekularna analiza diferencijacije tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *Hnf4a* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je na statistički značajne razlike u stupnju endodermalne diferencijacije tkiva TCa i miša i čovjeka u odnosu na netumorske kontrole. Ipak, detektirana je i statistički značajno snažnija ekspresija gena *Hnf4a* u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka (Slika 33.).



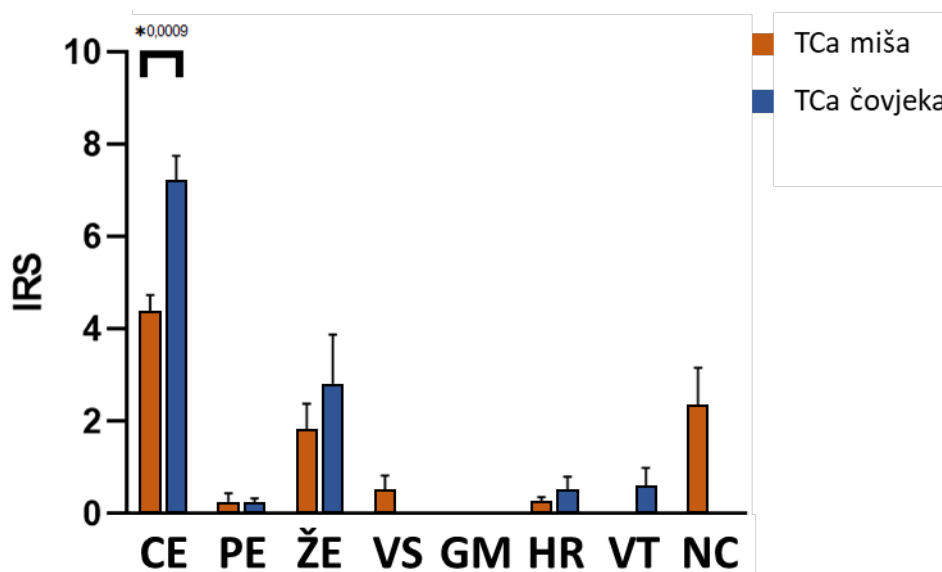
**Slika 33. Ekspresija biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica *Hnf4a* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega endodermalne diferencijacije gena *Hnf4a* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na iznimno nisku i gotovo podjednaku endodermalnu diferencijaciju humanog i mišjeg netumorskog kontrolnog tkiva. Tkiva TCa pokazuju statistički značajno snažniju ekspresiju gena *Hnf4a* u tkivima TCa u odnosu na netumorska kontrolna tkiva i u čovjeka ( $p=0,01212$ ) i u miša ( $p=0,00099$ ). Ipak, uočena je statistički značajno snažnija endodermalna diferencijacija u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka ( $p=0,00028$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Analiza diferencijacije endodermalnih matičnih stanica odnosno ekspresije gena *Hnf4a* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Statistički značajna razlika pokazana je pri usporedbi IIB vrijednosti *Hnf4a* u EC i T komponentama i humanog i mišjeg TCa, ukazujući na jednaku diferencijacijsku aktivnost po komponentama. Također nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *Hnf4a* između diferencirane teratomske i nediferencirane embrionalno karcinomske komponente TCa miša u odnosu na TCa čovjeka (Slika 34.).



**Slika 34. Ekspresija biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica *Hnf4a* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica gena *Hnf4a* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na jednaku diferencijacijsku aktivnost u tkivima TCa i miša i čovjeka. Naime, u odnosu na netumorsko kontrolno tkivo pronađena je statistički značajno snažnija endodermalna diferencijacija u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa miša ( $p=4.045e-005$ ) i TCa čovjeka ( $p=7.835e-006$ ) u odnosu na netumorska kontrolna tkiva. Nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *Hnf4a* u nediferenciranoj komponenti TCa miša u odnosu na TCa čovjeka. Također, nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *Hnf4a* u diferenciranoj komponenti TCa miša u odnosu na TCa čovjeka. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije proteina Hnf4a po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu endodermalnu diferencijaciju u pločastom epitelu, žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, glatkim mišićnim stanicama, hrskavici, vezivnom tkivu i neuralnim cijevima. Statistički značajna razlika u ekspresiji gena *Hnf4a* pronađena je jedino u cilindričnom epitelu (Slika 35.).



**Slika 35. Ekspresija biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica *Hnf4a* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega diferencijacije endodermalnih matičnih stanica gena *Hnf4a* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednaku diferencijacijsku aktivnost u gotovo svim tkivima diferencirane teratomske komponente TCa čovjeka i TCa miša. Statistički značajno snažnija endodermalna diferencijacija pronađena je jedino u cilindričnom epitelu u TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=0,0009$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

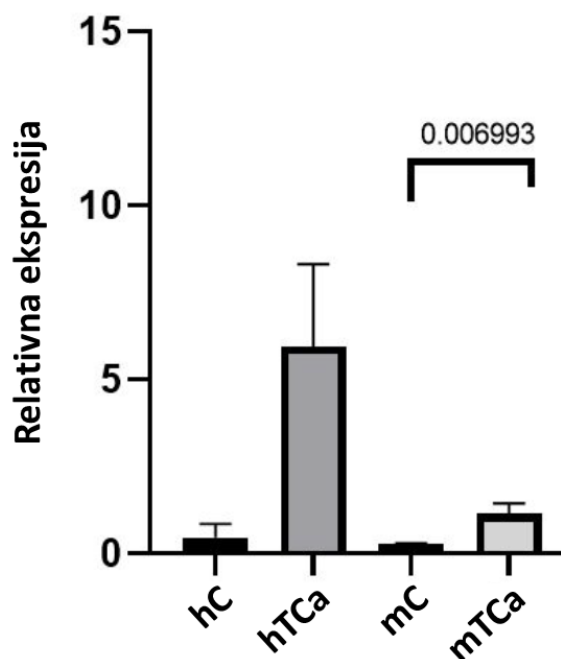
#### **4.6 Molekularna analiza prisutnosti tumorskih matičnih stanica u tkivu TCa**

Embrionalne matične stanice eksprimiraju gene jezgre matičnosti, *Nanog*, *Oct 3/4* i *Sox2* (u miša) odnosno *Sox17* (u čovjeka). Navedeni geni jezgre matičnosti omogućuju maksimalnu matičnost stanica odnosno pluripotentnost. Stoga su snažno eksprimirani na proteinskoj razini u embrionalnim matičnim stanicama i matičnim stanicama embrionalnog karcinoma odnosno nediferenciranoj komponenti TCa. U ovom istraživanju analizirani su geni *Nanog* i *Oct3/4*, budući da se u miša i čovjeka razlikuju eksprimirani geni iz obitelji *Sox*.

##### *4.6.1 Ekspresija gena matičnosti Nanog*

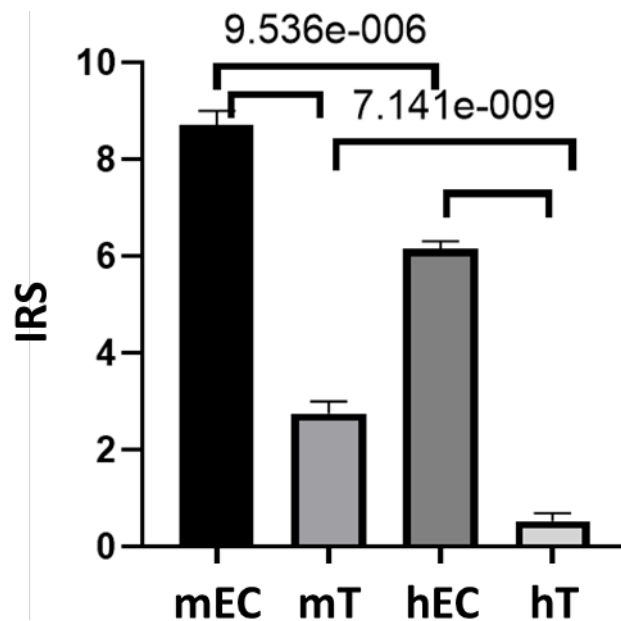
Ekspresija gena matičnosti *Nanog* osigurava pluripotentnost tumorskim stanicama. Molekularna analiza matičnosti tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *Nanog* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je na jednak obrazac povišene matičnosti stanica u TCa u odnosu na kontrolna netumorska tkiva i u čovjeka i u miša. Dodatno, iako slabije izražena nego u čovjeka, ekspresija gena *Nanog* statistički je značajno viša u TCa miša u odnosu na kontrolno netumorsko tkivo miša (Slika 36.).





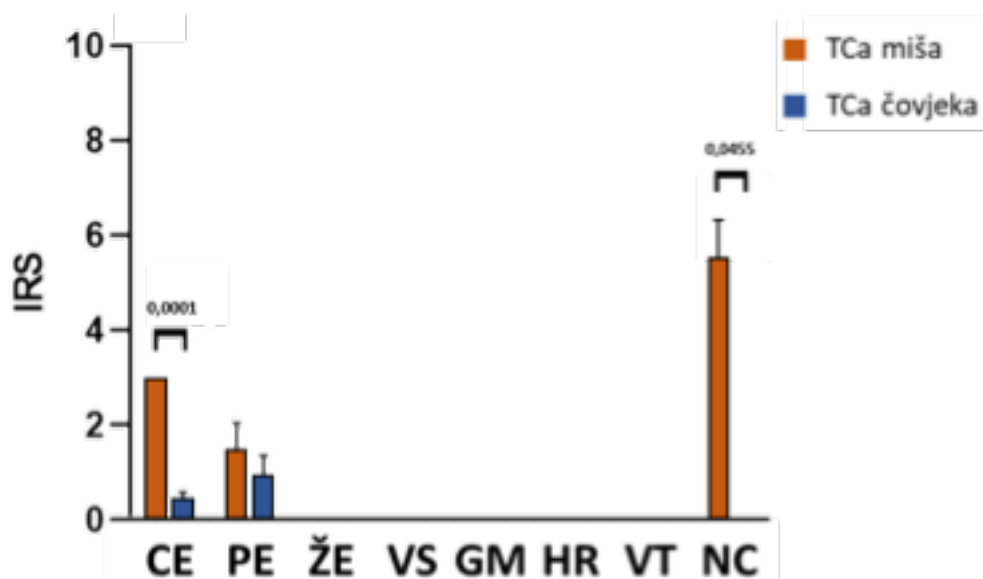
**Slika 36. Ekspresija biljega matičnosti stanica *Nanog* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega matičnosti stanica gena *Nanog* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na snažniju ekspresiju biljega matičnosti u tkivima TCa u odnosu na kontrolna netumorska tkiva i u miša i u čovjeka. Iako je u TCa snažnije izražen, ekspresija gena matičnosti *Nanog* statistički je značajno viša tek u TCa miša u odnosu na kontrolno tkivo ( $p=0,006993$ ). Ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena matičnosti *Nanog* u TCa miša u odnosu na TCa čovjeka, kao ni u usporedbi kontrolnih tkiva. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTcA: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTcA: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Analiza ekspresije gena matičnosti *Nanog* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfometrijskom analizom IHC preparata. Uočen je jednaki obrazac ekspresije u komponentama TCa i u čovjeka i u miša, iako postoje statistički značajne razlike u visini ekspresije. Tako je statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Nanog* u nediferenciranim embrionalno karcinomskim stanicama u odnosu na diferencirane teratomske komponente TCa i u miša i u čovjeka. Nadalje, razina ekspresije gena matičnosti *Nanog* statistički je značajno viša u tkivima čovjeka u odnosu na tkiva miša (Slika 37.).



**Slika 37. Ekspresija biljega matičnosti stanica *Nanog* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega matičnosti stanica gena *Nanog* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na jednak obrazac ekspresije i u tkivima čovjeka i u tkivima miša. Naime, u odnosu na diferencirano tkivo teratomske komponente pronađena je statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Nanog* u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa miša i TCa čovjeka. Nadalje, uočena je statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Nanog* u mišjim tkivima u odnosu na tkiva čovjeka, kako u diferenciranoj teratomske komponenti ( $p=7.141e-009$ ) tako i u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti ( $p=9.536e-006$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

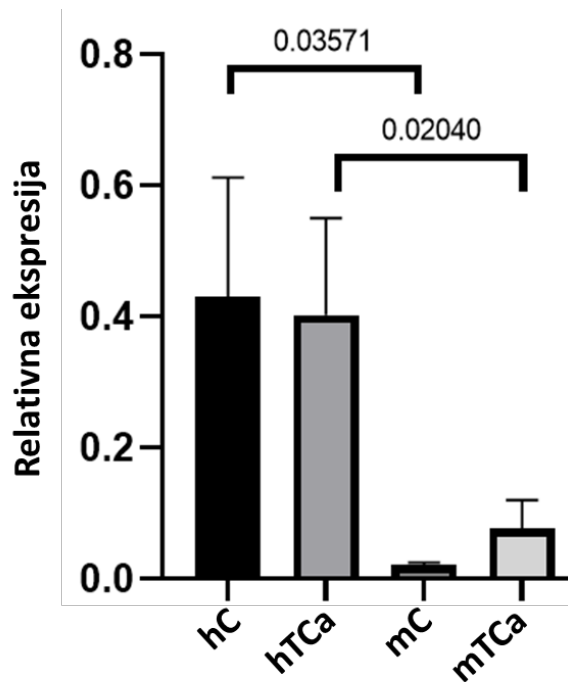
Detaljnija analiza ekspresije gena matičnosti *Nanog* po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličan stupanj matičnosti u pločastom epitelu, žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, glatkim mišićnim stanicama, hrskavici i vezivnom tkivu. Snažnija ekspresija gena matičnosti *Nanog* uočena je jedino u cilindričnom epitelu i neuralnim cijevima TCa miša u odnosu na TCa čovjeka (Slika 38.).



**Slika 38. Ekspresija biljega matičnosti stanica *Nanog* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega matičnosti stanica gena *Nanog* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na podjednak stupanj matičnosti tkiva u gotovo svim tkivima diferencirane teratomske komponente TCa čovjeka i TCa miša. Statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Nanog* pronađena je jedino u cilindričnom epitelu ( $p=0,0001$ ) i neuralnim cijevima ( $p=0,0455$ ) TCa miša u odnosu na TCa čovjeka. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

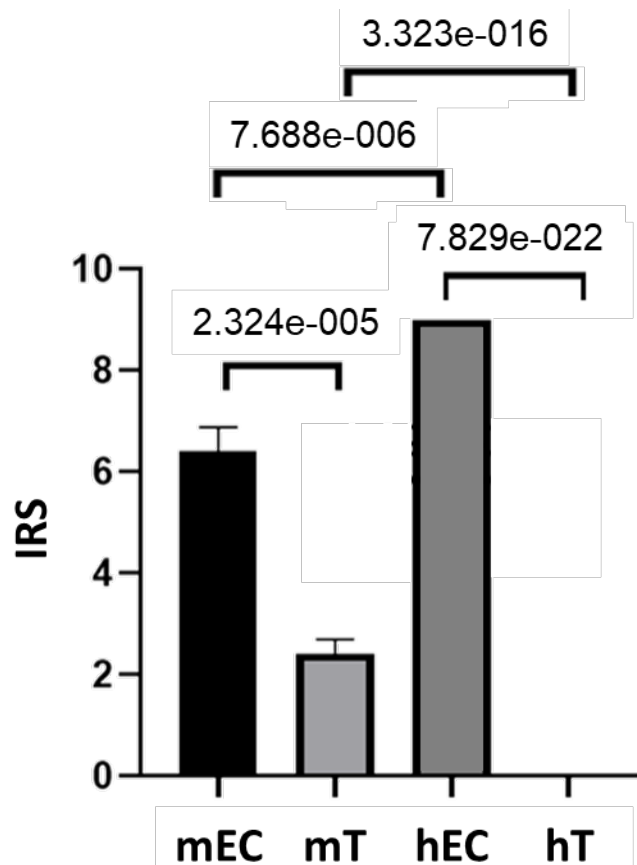
#### 4.6.2 Ekspresija gena matičnosti *Oct3/4*

Ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* osigurava pluripotentnost tumorskim stanicama. Molekularna analiza matičnosti tkiva provedena metodom Western blottinga odnosno određivanjem ukupne ekspresije gena *Oct3/4* u cjelokupnom tkivu TCa, ukazala je statistički značajno snažniju ekspresiju u tkivima čovjeka u odnosu na tkiva miša. Ekspresija u tkivima TCa i kontrolnim tkivima pokazala je jednaku ekspresiju i u miša i u čovjeka (Slika 39.).



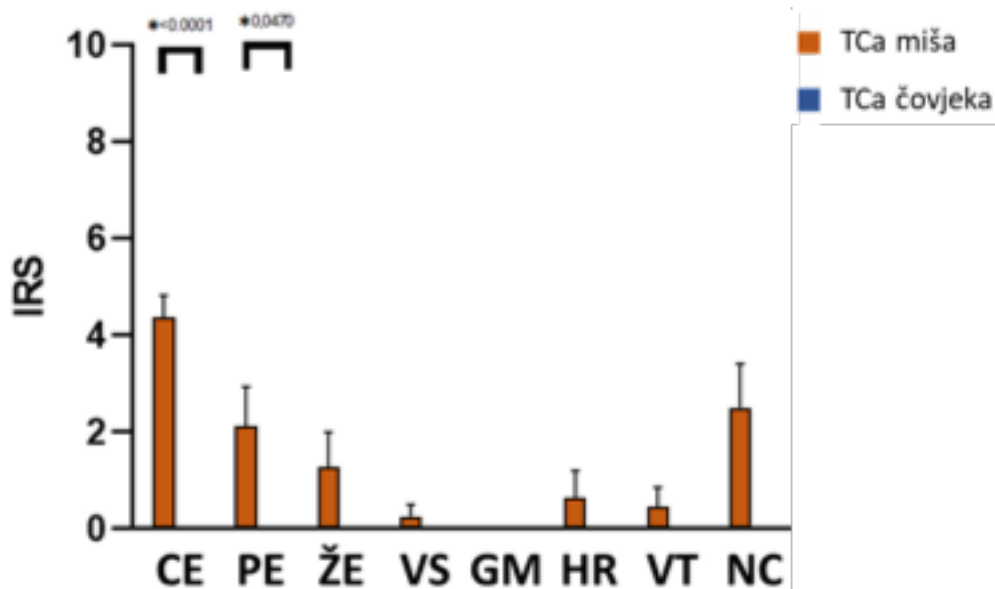
**Slika 39. Ekspresija biljega matičnosti stanica *Oct3/4* u TCa i netumorskom tkivu.** Ekspresija biljega matičnosti stanica gena *Oct3/4* na proteinskoj razini analizirana metodom Western blottinga ukazuje na snažniju ekspresiju biljega matičnosti u tkivima čovjeka u odnosu na tkiva miša i to i u kontrolnom netumorskom tkivu ( $p=0,03571$ ) i u tkivu TCa ( $p=0,02040$ ). Nisu dobivene statistički značajne razlike u ekspresiji gena matičnosti *Oct3/4* u usporedbi okolnog netumorskog tkiva i TCa ni u čovjeka ni u miša. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti dobivenih denzitometrijskom analizom membrana. hC: kontrolno netumorsko okolno tkivo testisa čovjeka; hTCa: humani TCa; mC: kontrolno netumorsko tkivo testisa miša; mTCa: TCa miša. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Analiza ekspresije gena matičnosti *Oct3/4* na proteinskoj razini unutar pojedine komponente TCa učinjena je morfolometrijskom analizom IHC preparata. Uočen je jednak obrazac statistički značajno snažnije ekspresije u nediferenciranim komponentama TCa u odnosu na diferencirane i u čovjeka i u miša, iako postoje statistički značajne razlike u visini ekspresije. Tako je statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa čovjeka, dok je u diferenciranoj teratomskoj komponenti statistički značajno snažnija u TCa miša (Slika 40.).



**Slika 40. Ekspresija biljega matičnosti stanica *Oct3/4* u diferenciranoj i nediferenciranoj komponenti TCa.** Ekspresija biljega matičnosti stanica gena *Oct3/4* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na jednak obrazac ekspresije i u tkivima čovjeka i u tkivima miša. Naime, u odnosu na diferencirano tkivo teratomske komponente pronađena je statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa miša ( $p=2.324e-005$ ) i TCa čovjeka ( $p=7.829e-022$ ). Nadalje, uočena je statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* u nediferenciranoj embrionalno karcinomskoj komponenti TCa čovjeka u odnosu na TCa miša ( $p=7.688e-006$ ), dok je statistički značajno snažnija ekspresija pronađena u diferenciranoj teratomske komponenti TCa miša u odnosu na TCa čovjeka ( $p=3.323e-016$ ). Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. mEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa miša; mT: diferencirana komponenta teratoma u TCa miša; hEC: nediferencirana komponenta embrionalnog karcinoma u TCa čovjeka; hT: diferencirana komponenta teratoma u TCa čovjeka. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

Detaljnija analiza ekspresije gena matičnosti *Oct3/4* po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličan stupanj matičnosti u žljezdanom epitelu, vrčastim stanicama, glatkim mišićnim stanicama, hrskavici, vezivnom tkivu i neuralnim cijevima, iako je ekspresija detektirana primarno u mišjem tkivu. Statistički značajno viša ekspresija gena *Oct3/4* uočena je jedino u cilindričnom i pločastom epitelu TCa miša u odnosu na TCa čovjeka (Slika 41.).



**Slika 41. Ekspresija biljega matičnosti stanica *Oct3/4* u različitim diferenciranim tkivima TCa.** Ekspresija biljega matičnosti stanica gena *Oct3/4* na proteinskoj razini analizirana metodom morfometrije signala dobivenog IHC, ukazuje na statistički podjednak stupanj matičnosti tkiva u gotovo svim tkivima diferencirane teratomske komponente TCa čovjeka i TCa miša, sa višom ekspresijom u miša. Statistički značajno snažnija ekspresija gena matičnosti *Oct3/4* pronađena je jedino u cilindričnom ( $p=0,0001$ ) i pločastom epitelu ( $p=0,0470$ ) TCa miša u odnosu na TCa čovjeka. Prikazane su srednje vrijednosti i SEM vrijednosti IIB-a. CE: cilindrični epitel; PE: pločasti epitel; ŽE: žljezdano tkivo; VS: vrčaste stanice; GM: glatki mišić; HR: hrskavica; VT: vezivno tkivo; NC: neuralne cijevi. Korišten je Mann-Whitney U test i prikazane su p vrijednosti  $p<0,05$ .

## 5. RASPRAVA

Tumori testisa najčešća su neoplastična bolest kod mladih muškaraca koja se gotovo u potpunosti javlja u dobi između 15. i 40. godine života. Komparativno s ostalim onkološkim oboljenjima čovjeka, tumori testisa spadaju u rijetke tumore i predstavljaju oko 1% tumora odraslih te 5% uroloških tumora. U 2020. godini Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) zabilježila je 74.458 novih slučajeva u svijetu. Učestalost se uvelike razlikuje diljem svijeta, u rasponu od 3 do 12 novih slučajeva na 100.000 muškaraca godišnje u zapadnim društvima (103).

TZST, kao daleko najučestaliji oblik tumora testisa, iznimno su zanimljivo područje istraživanja zbog sve veće učestalosti te specifičnih epidemioloških, ali i bioloških karakteristika. Porast incidencije zabilježen je diljem svijeta. Tako je i hrvatska populacija pod snažnim opterećenjem porasta incidencije tumora testisa (3).

Usprkos činjenici da se javljaju poglavito u populaciji europskoga podrijetla te usprkos zabilježenom snažnom porastu incidencije upravo u zapadnom razvijenom svijetu, faktori rizika kao i biološki inicijatori kancerogeneze nisu još identificirani. Kriptorhizam je jedini jednoglasno priznati faktor rizika za razvoj tumora testisa i to 3,7-7,5 puta u usporedbi s općom muškom populacijom (103). Ipak, ostaje otvoreno pitanje je li kriptorhizam rizični faktor za razvoj tumora testisa ili tek jedan od tri oblika istog poremećaja zajedno s hipospadijom i upravo tumorom testisa. Taj se sindrom danas prepoznaje pod nazivom sindrom testikularne disgeneze (105).

Zbog specifične dobne distribucije i zahvaćanja gotovo isključivo populacije europskog podrijetla, genetički poremećaji dugo su vremena smatrani kao osnovni uzrok razvoja tumora testisa. Međutim, najnovija istraživanja molekularne biologije i molekularne epidemiologije, posebice temeljenima na podacima dobivenima u okviru inicijative *Human Cancer Atlas*, dokazali su da tumori testisa imaju iznimno malo i iznimno rijetko ijednu gensku mutaciju (106). Stoga, iako postoji čitav niz istraživanja koja navode genske mutacije u različitim tipovima tumora testisa čovjeka, kako je uostalom navedeno i u dijelu uvoda ove disertacije, danas su sve glasniji zaključci da tumori testisa uopće nisu primarno genetički uvjetovana bolest, već da se genske mutacije pojavljuju kao „putnici“ na putu razvoja tumora testisa.

Uistinu, ponovno postaju aktualne davno postavljene hipoteze epigenetičkog podrijetla tumora testisa. Zasjejene erom dekodiranja humanog genoma i nastojanja da se sve neoplastične bolesti objasne mutacijom određenog ili određenih gena, proteklih 30-ak godina epigenetičke su hipoteze inicijacije tumora testisa bile pomalo stavljene po strani. Tome je pridonio i razvoj etičkih načela dobrobiti životinja u istraživanjima koji su u početku promovirali napuštanje animalnih modela bolesti te favorizirali *in vitro* istraživanja. Međutim, *in vitro* istraživanja imaju jednaku manu kao i istraživanja na humanim tkivima tumora testisa dobivenima od pacijenata. I jedan i drugi model temelje se na istraživanju razvoja tumora testisa na stanicama već razvijenog tumora testisa.

Epigenetičke hipoteze razvoja tumora testisa pretpostavljaju da osnovni biološki induktor razvoja tumora testisa nije neka genska mutacija, već poremećaj u regulaciji ekspresije gena tijekom razvoja testisa koji posljedično kodira buduće pacijente za razvoj tumora u kasnijoj fazi života. Postoji čitav niz istraživanja koji ukazuju na to, od molekularnog profiliranja *single cell* tehnologijom do pomalo arhaičnih *in vivo* eksperimenata transplantacije matičnih stanica tumora testisa u blastocistu s posljedičnim razvojem potpuno vijabilnog kimernog organizma bez rizika za razvoj tumora (115, 116). Upravo ova arhaična *in vivo* istraživanja možda najbolje ukazuju na to da su tumori testisa vjerojatno epigenetička bolest poremećaja ekspresije gena uvjetovana poremećenim odgovorom na specifične zahtjeve okoliša. Međutim, jasno je da bez adekvatnog animalnog modela tumora testisa nećemo moći nikada razjasniti biologiju razvoja tih tumora kao i identificirati faktore okoliša koji pokreću pogrešan epigenetički odgovor i posljedično molekularno kodiranje razvoja bolesti.

Iako postoji mnogo animalnih modela za istraživanje TZST-a, većina njih ne zadovoljava u potpunosti kriterije dobrog istraživačkog modela. Jedan od glavnih izazova je da se u takvim modelima najčešće razvija benigna diferencirana forma TZST-a odnosno teratom. Istraživanja na tim modelima u potpunosti zanemaruju činjenicu da su tumori testisa gotovo uvijek građeni i od populacija stanica nižeg stupnja diferencijacije čak do razine istovjetnosti sa embrionalnim matičnim stanicama. Uistinu, dokazano je da na molekularnoj razini, najnediferenciranija komponenta TZST odnosno stanice embrionalnog karcinoma djeluju kao tumorske matične stanice istovjetne po ekspresijskom profilu embrionalnim matičnim stanicama (117).



Naime, idealan animalni model za proučavanje tumora testisa definira se kao onaj koji je što sličniji malignom i metastatskom obliku bolesti uz prisutnost maksimalno diferenciranog tkiva koji vuče podrijetlo od svih triju zametnih listića (Lyndaker i sur., 2021.).

Jedan od primjera takvog animalnog modela je supkutani TC PDX model koji se koristi za proučavanje molekularne aktivnosti i reakcija na kemoterapiju. Ovo je mišji model koji je formiran supkutanom implantacijom uzorka tumora ljudskog testisa u miša (de Vries et al., 2020.). Iako model miša ovisi o odabranom tkivu koje je odabrano za implantaciju, nakon nekoliko pasaža model pokazuje podudarne rezultate u ekspresiji gena i terapijskom odgovoru s istim ljudskim uzorcima tumora testisa iz kojih potječe izvorni uzorak. Usprkos velikom doprinosu ovog animalnog modela posebice u istraživanju novih terapija, jasno je da ovaj model predstavlja od samog početka model već razvijenog tumora testisa te nije prikladan za istraživanje razvoja posebice molekularne osnove razvoja tumora testisa.

Stevens i suradnici uspjeli su odabranim uzgojem miševa dobiti jedinke kod kojih je učestalost razvoja TCa bila povećana (STEVENS, 1958; Stevens & Little, 1954). Ukratko, stvorili su soj miševa koji je dobro modelirao razvoj tumora testisa u čovjeka, ali sa daleko većom učestalošću. Kasnije istraživanje ovog modela pokazalo je da se tumori testisa razvijaju zbog nasljedne Ter mutacije u populaciji soja. Dakle, iako se činilo kako se tumori u tom soju javljaju spontano te predstavljaju dobar animalni model razvoja tumora testisa u čovjeka, danas znamo da je riječ o genetički uvjetovanom razvoju tumora koji može biti dobar model isključivo za proučavanje razvoja familijarnih tumora testisa. Nažalost familijarni oblik gotovo je zanemariv u ljudskoj populaciji.

Nešto kasnije ustanovljeni su sojevi miševa kod kojih su geni *Kras* i *Pten* bili mutirani. Danas su ti sojevi miševa poznati kao gPAK miševi, a pokazali su se kao dobar model i za istraživanje TCa.

U drugoj polovici prošlog stoljeća razvijen je još jedan animalni model tumora testisa i to na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Postavili su ga Škreb, Solter i Damjanov u okviru istraživanja embrionalnog razvojnog potencijala te regulacije embriogeneze u sisavaca. Transplantacijom zametnog cilindra miša soja C3H pod čahuru bubrega singenične životinje, razvijala se retransplantabilna tumorska masa građena od dobro diferenciranih tkiva svih

triju zametnih listića izmiješana s populacijom potpuno nediferenciranih stanica sličnih zametnim matičnim stanicama. Ukratko, razvio se teratokarcinom, u to doba zvani maligni teratom (15). Tumor istih karakteristika dobiven je istom tehnikom transplantacije pod čahuru testisa singenične životinje, ali je uspješnost zahvata i transformacije tkiva bila drastično niža, pa je model napušten.

Usljedila su istraživanja ovog animalnog modela eksperimentalnog teratokarcinoma miša, koja su dokazala njegovu istovjetnost s teratokarcinomom testisa u čovjeka (107). Valja naglasiti da ovaj animalni model tumora testisa u potpunosti zaobilazi zamku promjene sekvence DNA odnosno genske mutacije. Ovaj model temelji se isključivo na poremećenoj ekspresiji gena odnosno poremećaju epigenetičke regulacije ekspresije gena koja za posljedicu ima upravo razvoj i diferencirane teratomske i nediferencirane embrionalno karcinomske komponente u jedinstvenoj tumorskoj masi teratokarcinoma. Međutim, sva istraživanja su provedena gotovo u potpunosti na morfološkoj odnosno histološkoj razini.

U doba molekularne biologije i molekularne medicine, a posebice zbog snažnog razvoja epigenetičke tehnologije koja se danas bazira isključivo na molekularnom profiliranju tkiva, opravdanost korištenja ovog modela u daljnjim istraživanjima postaje upitna. Naime, ovo je prvo istraživanje koje na molekularnoj razini testira istovjetnost humanog teratokarcinoma i ovog animalnog modela, čime se pokušalo dati odgovor i na pitanje opravdanosti daljnjeg korištenja životinja u ovom modelu, a za istraživanja na molekularnoj razini. Ovo pitanje opravdanosti se sve češće postavlja u istraživanjima tumora testisa na animalnim modelima (108).

Kako je navedeno, ovo je prvo molekularno profiliranje eksperimentalnog teratokarcinoma u miša te usporedba s molekularnim profilom teratokarcinoma u čovjeka. Stoga, nažalost, u ovom trenutku ne postoji literatura s kojom smo mogli direktno komparirati i diskutirati rezultate dobivene ovim istraživanjem.

Snažna proliferacija svakako je svojstvo većine neoplastičnih tumora (109). Visoka proliferacija opisana je i u teratokarcinomu čovjeka (113). U ovom istraživanju, rezultati morfometrije ukazuju da obrazac proliferacije u diferenciranoj u odnosu na nediferenciranu komponentu teratokarcinoma miša odgovara obrascu identificiranom u teratokarcinomu čovjeka. Nadalje, rezultati Western blottinga pokazuju jednak proliferacijski status teratokarcinoma čovjeka i miša u odnosu na

odgovarajuće netumorske kontrole. Detaljnija analiza ekspresije gena *Pcna* po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu proliferacijsku aktivnost u diferenciranoj komponenti. Sve navedeno ukazuje da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša odlično modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu proliferacije.

Pored snažne proliferacije, oslabljena apoptotička aktivnost također je prominentno svojstvo većine neoplastičnih tumora (109). Oslabljena apoptotička aktivnost opisana je i u teratokarcinomu čovjeka te je čak i povezana s oblicima tumora otpornima na kemoterapiju (110). U ovom istraživanju uočen je sličan obrazac apoptotičke aktivnosti u mišjem modelu i teratokarcinomu čovjeka. Ipak, uočena je značajno snažnija apoptotička aktivnost u teratokarcinomu čovjeka, posebice nediferenciranoj komponenti. Ovaj fenomen može se objasniti činjenicom da se animalni model zasniva na transplantaciji zametka koji se nalazi u fiziološkom apoptotičkom arestu (111). Tome u prilog ide činjenica da diferencirana komponenta mišjeg teratokarcinoma koja se molekularno značajno reprogramirala u odnosu na ishodišni transplantirani zametak, pokazuje značajno intenzivniju apoptotičku aktivnost od nediferencirane komponente. Nadalje, diferencirana komponenta mišjeg teratokarcinoma pokazuje jednak intenzitet apoptoze kao i diferencirana komponenta u teratokarcinomu čovjeka. Detaljnija analiza ekspresije gena *Kaspaza-3* po različitim tkivima mišjeg i humanog TCa ukazala je na sličnu apoptotičku aktivnost u diferenciranoj komponenti. Iz navedenog možemo zaključiti da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša donekle modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu apoptoze.

Histološka analiza diferenciranih stanica i tkiva u teratomskoj komponenti mišjeg i humanog TCa ukazala je na jednake diferencijacijske kapacitete. Naime, i u miša i u čovjeka pronađeni su derivati svih triju zametnih listića. Navedeno se očekuje te proizlazi iz same definicije teratokarcinoma (112). Ipak, uočena je razlika u zastupljenosti struktura ektodermalnog i mezodermalnog podrijetla bez, čini se, većeg utjecaja na razvoj teratokarcinoma. Sukladno rezultatima, očekivano možemo zaključiti da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša uspješno modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu diferencijacije na histološkoj razini.

Analiza diferencijacije na molekularnoj razini pokazala je mnoge sličnosti animalnog modela eksperimentalnog teratokarcinoma miša i čovjeka. Ipak, uočene su i poneke značajne razlike.

Tako primjerice animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša odlično modelira glijalnu diferencijaciju i u odnosu na netumorsko tkivo, na izraženost po komponentama i izraženost po diferenciranim tkivima. Neuronska i aksonska diferencijacija na molekularnoj razini pokazuje isti trend u animalnom modelu eksperimentalnog teratokarcinoma miša i teratokarcinoma čovjeka u usporedbi s netumorskim kontrolama. Ista je izraženost pronađena i po diferenciranim tkivima. Ipak, različit je intenzitet po komponentama. Analiza prisutnosti biljega neuroektodermalnih matičnih stanica pokazuje najsnažnije razlike između animalnog modela eksperimentalnog teratokarcinoma miša i teratokarcinoma čovjeka s obrnutim trendom prema netumorskim tkivima ali i komponentama teratokarcinoma. Ekspresija biljega neuroektodermalnih matičnih stanica jednaka je u diferenciranim tkivima. Sličan zaključak proizlazi i iz rezultata analize epidermalne diferencijacije na molekularnoj razini, gdje su opisani obrnuti obrasci diferencijacije u teratokarcinomima u usporedbi za netumorskim kontrolama, te suprotni obrasci po komponentama. Ponovno je opisan isti obrazac epidermalne diferencijacije po diferenciranim tkivima. Analiza endodermalne diferencijacije na molekularnoj razini pokazuje ponovno da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša odlično modelira diferencijaciju u odnosu na netumorsko tkivo, na izraženost po komponentama i izraženost po diferenciranim tkivima. Iz svega navedenog može se zaključiti da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša dobro modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu diferencijacije na molekularnoj razini uz potreban oprez prema određenim obrascima i linijama diferencijacije.

Geni jezgre matičnosti iznimno su važni za održavanje populacije nediferenciranih embrionalno karcinomskih stanica teratokarcinoma koje predstavljaju tumorske matične stanice (114). Prisutnost nediferenciranih embrionalno karcinomskih stanica u teratokarcinomu definirana je samom definicijom teratokarcinoma (112). *Oct3/4* i *Nanog* već se koriste kao proteinski biljezi za identifikaciju embrionalno karcinomskih stanica u tumorima testisa čovjeka u rutinskom dijagnostičkom protokolu. Ovo istraživanje dokazalo je da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša odlično modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu ekspresije gena jezgre matičnosti *Nanog* i *Oct3/4*.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz statističke obrade te kontekstualizacije rezultata dobivenih ovim istraživanjem može se zaključiti da:

1. Animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša odlično modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu analize proliferacije na molekularnoj razini.
2. Animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša donekle modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu analize apoptoze na molekularnoj razini.
3. Animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša uspješno modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu diferencijacije na histološkoj razini.
4. Animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša dobro modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu diferencijacije na molekularnoj razini uz potreban oprez prema određenim obrascima i linijama diferencijacije.
5. Animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša odlično modelira teratokarcinom čovjeka u kontekstu ekspresije gena jezgre matičnosti *Nanog* i *Oct3/4*.

Iz rezultata ovog istraživanja jasno proizlazi zaključak da animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša vjerno modelira teratokarcinom čovjeka ne samo na morfološkoj razini već i na molekularno biološkoj razini ekspresije biljega proliferacije, apoptoze, diferencijacije i matičnosti. Pored navedenog, valja naglasiti da ovaj animalni model ne uključuje genske mutacije već je kancerogeneza isključivo pod utjecajem epigenetičkih deregulacija genske ekspresije.

Iz svega navedenog proizlazi da je animalni model eksperimentalnog teratokarcinoma miša pogodan za potrebe istraživanja razvoja teratokarcinoma čovjeka na molekularnoj razini, te da je njegova upotreba u znanstvenim istraživanjima opravdana.

## 7. LITERATURA

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010 Mar;46(4):765–81.
2. Purdue MP, Devesa SS, Sigurdson AJ, McGlynn KA. International patterns and trends in testis cancer incidence. *Int J cancer*. 2005 Jul;115(5):822–7.
3. Sincic N, Kulis T, Znaor A, Bray F. Time trends in testicular cancer in Croatia 1983–2007: Rapid increases in incidence, no declines in mortality. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2012;36(1):11–5.
4. Mikuz G. Update on the pathology of testicular tumors. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2015 Feb;37(1):75–85.
5. Bustamante-Marín X, Garness JA, Capel B. Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2–4):201–10.
6. Khandige S, Shanbhogue V V, Chakrabarty S, Kapettu S. Methylation markers: a potential force driving cancer diagnostics forward. *Oncol Res*. 2011;19(3–4):105–10.
7. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, Sultana R, Labreche K, Dudakia D, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6(1):5973.
8. De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2010/08/31. 2010 Oct;20(10):609–17.
9. Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M, Aréchaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. *Cancer Biol Ther*. 2010 Sep;10(6):529–36.
10. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res*. 2012;2(2):153–67.
11. Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*. 2008 Jul;642(1–2):1–13.
12. Kristensen DG, Skakkebak NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2–4):309–17.
13. Cheon D-J, Orsulic S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:95–119.

14. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014;6(2):114–8.
15. Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine Growth of Mouse Egg-cylinders results in Malignant Teratoma. *Nature* [Internet]. 1970;227:726–34.
16. Damjanov I, Solter D. Animal model of human disease: teratoma and teratocarcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. 1976 Apr;83(1):241–4.
17. Chieffi P. Recent advances in molecular and cell biology of testicular germ-cell tumors. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;312:79–100.
18. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. 376–384 p.
19. Sadler T. Langmanova medicinska embriologija. Deseto izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 242–248 p.
20. Elzinga-Tinke JE, Dohle GR, Looijenga LH. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for preinvasive diagnosis. *Asian J Androl* [Internet]. 2015;17(3):381–93.
21. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, et al. Testicular cancer. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(1).
22. McGlynn KA, Cook MB. Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. *Future Oncol* [Internet]. 2009 Nov;5(9):1389–402.
23. Litchfield K, Levy M, Orlando G, Loveday C, Law PJ, Migliorini G, et al. Identification of 19 new risk loci and potential regulatory mechanisms influencing susceptibility to testicular germ cell tumor. *Nat Genet*. 2017 Jul;49(7):1133–40.
24. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Bilten br. 40. Zagreb; 2018.
25. Winter C, Albers P. Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jan;7(1):43–53.
26. Stanec M, Vrdoljak D, Turić M. Kirurška onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. 294–302 p.
27. Heidenreich A, Vorreuther R, Neubauer S, Zumbe J, Engelmann UH. Paternity in Patients with Bilateral Testicular Germ Cell Tumors. *Eur Urol* [Internet]. 1997;31:246–8.
28. Ehrlich Y, Margel D, Lubin MA, Baniel J. Advances in the treatment of testicular cancer.

Transl Androl Urol [Internet]. 2015 Jun;4(3):381–90.

29. Rajpert-De Meyts E, McGlynn KA, Okamoto K, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10029):1762–74.
30. Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, et al. Guidelines on Testicular Cancer: 2015 Update. *Eur Urol*. 2015 Dec;68(6):1054–68.
31. Rajpert-De Meyts E, McGlynn KA, Okamoto K, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. *Lancet* (London, England). 2016 Apr;387(10029):1762–74.
32. Singla N, Labin JT, Ghandour RA, Kaffenberger S, Amatruda JF, Bagrodia A. Genetics of testicular germ cell tumors. *Curr Opin Urol*. 2019 Jul;29(4):344–9.
33. Oosterhuis JW, Castedo SM, de Jong B, Cornelisse CJ, Dam A, Sleijfer DT, et al. Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. *Lab Invest*. 1989 Jan;60(1):14–21.
34. Woldu SL, Amatruda JF, Bagrodia A. Testicular germ cell tumor genomics. *Curr Opin Urol* [Internet]. 2017 Jan;27(1):41–7.
35. Chovanec M, Cheng L. Molecular characterization of testicular germ cell tumors: Chasing the underlying pathways. *Futur Oncol*. 2019;15(3):227–9.
36. Baraban EG, Cooper K. Pathogenesis of Testicular Germ Cell Neoplasia: A Conceptual Approach. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2019;26(4).
37. Shen H, Shih J, Hollern DP, Wang L, Bowlby R, Tickoo SK, et al. Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. *Cell Rep*. 2018;23(11):3392–406.
38. National Cancer Institute. The Cancer Genome Atlas [Internet].
39. Bagrodia A, Lee BH, Lee W, Cha EK, Sfakianos JP, Iyer G, et al. Genetic Determinants of Cisplatin Resistance in Patients With Advanced Germ Cell Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Nov;34(33):4000–7.
40. Labin JT, Bagrodia A, Woldu S, Amatruda JF. New insights into germ cell tumor genomics. *Andrology*. 2019;7(4):507–15.
41. Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, et al. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res*. 1993 Aug;53(15):3574–8.
42. Batool A, Karimi N, Wu XN, Chen SR, Liu YX. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(9):1713–27.
43. Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, Hurlimann J, Kurt AM, Metthez G, et al. Germ cell



- tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am J Pathol*. 1996 Oct;149(4):1221–8.
44. Heidenreich A, Schenkman NS, Sesterhenn IA, Mostofi KF, Moul JW, Srivastava S, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of the p53 tumour suppressor gene and the bcl-2 oncogene in primary testicular germ cell tumours. *APMIS* [Internet]. 1998 Jan 1;106(1□6):90–100.
  45. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, et al. A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell* [Internet]. 2006;124(6):1169–81.
  46. Koster R, Timmer-Bosscha H, Bischoff R, Gietema JA, de Jong S. Disruption of the MDM2-p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway. *Cell Death Dis*. 2011 Apr;2(4):e148.
  47. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov* [Internet]. 2012 May 1;2(5):401 LP – 404.
  48. Tollefsbol T. *Handbook of Epigenetics*. 1st ed. Elsevier; 2011. 638 p.
  49. Cheng X, Hashimoto H, Horton JR, Zhang X. Chapter 2 - Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals. In: Tollefsbol TBT-H of E, editor. San Diego: Academic Press; 2011. p. 9–24.
  50. Armstrong L. *Epigenetics*. Garland Science; 2014.
  51. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012;13(7):484–92.
  52. Moarefi AH, Chédin F. ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated de novo DNA methylation. *J Mol Biol*. 2011 Jun;409(5):758–72.
  53. Greenberg MVC, Bourc’his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20(10):590–607.
  54. Rando OJ. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2012/03/20. 2012 Apr;22(2):148–55.
  55. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan;403(6765):41–5.

56. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science* (80- ) [Internet]. 2001 Aug 10;293(5532):1074 LP – 1080.
57. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964 May;51(5):786–94.
58. Allfrey VG, Mirsky AE. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science*. 1964 May;144(3618):559.
59. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb;128(4):693–705.
60. Herceg Z, Murr R. Chapter 3 - Mechanisms of Histone Modifications. In: Tollefsbol TBT-H of E, editor. San Diego: Academic Press; 2011. p. 25–45.
61. Karch KR, Denizio JE, Black BE, Garcia BA. Identification and interrogation of combinatorial histone modifications. *Front Genet*. 2013 Dec;4:264.
62. Zhao Y, Garcia BA. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 Sep 1;7(9):a025064–a025064.
63. Collins LJ, Schönfeld B, Chen XS. Chapter 4 - The Epigenetics of Non-coding RNA. In: Tollefsbol TBT-H of E, editor. San Diego: Academic Press; 2011. p. 49–61.
64. Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, Rossant J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev*. 1987 Dec;1(10):1039–46.
65. Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*. 1987 Mar;99(3):371–82.
66. Buljubašić R, Buljubašić M, Bojanac AK, Ulamec M, Vlahović M, Ježek D, et al. Epigenetics and testicular germ cell tumors. *Gene*. 2018 Jun;661:22–33.
67. Nielsen H, Nielsen M, Skakkebak NE. The fine structure of a possible carcinoma-in-situ in the seminiferous tubules in the testis of four infertile men. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A Pathol* [Internet]. 1974 May 1;82A(2):235–48.
68. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomäki P, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors.

- Oncogene. 2002;21(24):3909–16.
69. Dobrovic A, Kristensen LS. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition. *Int J Biochem & cell Biol* [Internet]. 2009 Jan;41(1):34—39.
  70. Mirabello L, Savage SA, Korde L, Gadalla SM, Greene MH. LINE-1 methylation is inherited in familial testicular cancer kindreds. *BMC Med Genet* [Internet]. 2010 May;11:77.
  71. Omisanjo OA, Biermann K, Hartmann S, Heukamp LC, Sonnack V, Hild A, et al. DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem Cell Biol*. 2007 Feb;127(2):175–81.
  72. Yamada S, Kohu K, Ishii T, Ishidoya S, Hiramatsu M, Kanto S, et al. Gene expression profiling identifies a set of transcripts that are up-regulated in human testicular seminoma. *DNA Res an Int J rapid Publ reports genes genomes*. 2004 Oct;11(5):335–44.
  73. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Kanai Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology*. 2012 May;60(6B):E12-8.
  74. Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnol F, Lobaccaro J-MA, Volle DH. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2012 Nov 29;3:150.
  75. Nettersheim D, Biermann K, Gillis AJM, Steger K, Looijenga LHJ, Schorle H. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics* [Internet]. 2011/01/01. 2011 Jan;6(1):114–22.
  76. De Jong J, Weeda S, Gillis AJM, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Differential methylation of the OCT3/4 upstream region in primary human testicular germ cell tumors. *Oncol Rep*. 2007 Jul;18(1):127–32.
  77. Almstrup K, Nielsen JE, Mlynarska O, Jansen MT, Jørgensen A, Skakkebaek NE, et al. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br J Cancer*. 2010 Oct;103(8):1269–76.
  78. Eckert D, Biermann K, Nettersheim D, Gillis AJM, Steger K, Jäck H-M, et al. Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. *BMC Dev Biol*. 2008 Nov;8:106.

79. Cheung H-H, Davis AJ, Lee T-L, Pang AL, Nagrani S, Rennert OM, et al. Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy. *Oncogene*. 2011 Aug;30(31):3404–15.
80. Ferreira HJ, Heyn H, Garcia del Muro X, Vidal A, Larriba S, Muñoz C, et al. Epigenetic loss of the PIWI/piRNA machinery in human testicular tumorigenesis. *Epigenetics* [Internet]. 2013/11/18. 2014 Jan;9(1):113–8.
81. Gainetdinov I V, Skvortsova Y V, Kondratieva SA, Klimov A, Tryakin AA, Azhikina TL. Assessment of piRNA biogenesis and function in testicular germ cell tumors and their precursor germ cell neoplasia in situ. *BMC Cancer*. 2018 Jan;18(1):20.
82. Hotaling JM, Walsh TJ. Male infertility: a risk factor for testicular cancer. *Nat Rev Urol*. 2009 Oct;6(10):550–6.
83. Peng X, Zeng X, Peng S, Deng D, Zhang J. The association risk of male subfertility and testicular cancer: a systematic review. *PLoS One* [Internet]. 2009/05/18. 2009;4(5):e5591–e5591.
84. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93–105.
85. Sharma P, Dhillon J, Agarwal G, Zargar-Shoshtari K, Sexton WJ. Disparities in Interpretation of Primary Testicular Germ Cell Tumor Pathology. *Am J Clin Pathol*. 2015 Aug;144(2):289–94.
86. Murray MJ, Coleman N. Can circulating microRNAs solve clinical dilemmas in testicular germ cell malignancy? *Nat Rev Urol* [Internet]. 2019;16(9):505–6.
87. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG Island Hypermethylation of Cell-Free Circulating Serum DNA in Patients With Testicular Cancer. *J Urol* [Internet]. 2009;182(1):324–9.
88. Costa AL, Moreira-Barbosa C, Lobo J, Vilela-Salgueiro B, Cantante M, Guimarães R, et al. DNA methylation profiling as a tool for testicular germ cell tumors subtyping. *Epigenomics*. 2018;10(12):1511–23.
89. Spiller CM, Gillis AJM, Burnet G, Stoop H, Koopman P, Bowles J, et al. Cripto: Expression, epigenetic regulation and potential diagnostic use in testicular germ cell tumors. *Mol Oncol* [Internet]. 2015/11/18. 2016 Apr;10(4):526–37.

90. Spiller CM, Lobo J, Boellaard WPA, Gillis AJM, Bowles J, Looijenga LHJ. Cripto and MIR-371A-3P are serum biomarkers of testicular germ cell tumors and are detected in seminal plasma from azoospermic males. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):1–18.
91. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y. XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. *Lancet (London, England)*. 2004 Jan;363(9402):40–2.
92. Lobo J, Nunes SP, Gillis AJM, Barros-Silva D, Miranda-Gonçalves V, van den Berg A, et al. XIST-promoter demethylation as tissue biomarker for testicular germ cell tumors and spermatogenesis quality. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9).
93. Stevens LC. A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Jan;50(1):235–42.
94. Stevens LC, Varnum DS. The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Dev Biol [Internet]*. 1974;37(2):369–80.
95. Eppig JJ, Kozak LP, Eicher EM, Stevens LC. Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the flIBt meiotic division. *Nature*. 1977;269(5628):517–8.
96. Berry C. The Human Teratomas. Vol. 36, *Journal of Clinical Pathology*. 1983. 1204–1204 p.
97. Stevens LC. Teratocarcinogenesis and spontaneous parthenogenesis in mice. ... *Symp Soc Dev Biol Symp*. 1975;(33):93–106.
98. Stevens LC. The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol*. 1968 Nov;20(3):329–41.
99. Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol*. 1970 Mar;21(3):364–82.
100. Damjanov I. From stem cells to germ cell tumors and back. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2004;88:39–44.
101. Bulić-Jakus F, Ulamec M, Vlahović M, Sinčić N, Katusić A, Jurić-Lekić G, et al. Of mice and men: teratomas and teratocarcinomas. *Coll Antropol [Internet]*. 2006 Dec;30(4):921—924.
102. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3585–9.
103. Giona S. The Epidemiology of Testicular Cancer. U: Barber N i Ali A, ur. *Urologic Cancers*. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022, str. 107-16.

104. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680-5.
105. Skakkebaek E N. Testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res*. 2003;60 Suppl 3:49
106. Raos D, Krasic J, Masic S, Abramovic I, Coric M, Kruslin B i sur. In Search of TGCT Biomarkers: A Comprehensive In Silico and Histopathological Analysis. *Dis Markers* 2020 Nov 6;2020:8841880
107. Damjanov I, Solter D, Škreb N. Teratocarcinogenesis as related to the age of embryos grafted under the kidney capsule. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 1971;167(3):288-290
108. Poulsen KH, Jørgensen A. Role of Nodal signalling in testis development and initiation of testicular cancer. *Reproduction* 2019 Aug;158(2):R67-R77
109. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
110. Koster R , Pietro A, Timmer-Bosscha H, Gibcus JH, Berg A, Suurmeijer AJ i sur. Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest* 2010;120(10):3594-605.
111. Singh AP, Foley J, Rubino M, Boyle M , Tandon A, Shah R i sur. Brg1 Enables Rapid Growth of the Early Embryo by Suppressing Genes That Regulate Apoptosis and Cell Growth Arrest. *Mol Cell Biol* 2016 Jul 14;36(15):1990-2010.
112. Damjanov I, Solter D, Škreb N. Teratocarcinogenesis as related to the age of embryos grafted under the kidney capsule. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 1971;167(3):288-290.
113. Chen R, Li H, Li Y, Fazli L, Gleave M1, Nappi L i sur. Loss of Nuclear Functions of HOXA10 Is Associated With Testicular Cancer Proliferation. *Front Oncol*.2018;8:594.
114. Blomberg Jensen M, Jørgensen A, Nielsen JE, Steinmeyer A, Leffers H, Juul A i sur. Vitamin D metabolism and effects on pluripotency genes and cell differentiation in testicular germ cell tumors in vitro and in vivo. *Neoplasia*.2012;14(10):952-63.
115. Okamoto K, Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors. *Int J Urol*.2012;19(6):504-1
116. Hernandez-Vargas H, Sincic N, Ouzounova M, Herceg Z. Epigenetic signatures in stem cells and cancer stem cells. *Epigenomics*2009;1(2):261-80

117. Andrews P W, Matin M M, Bahrami A R, Damjanov I, Gokhale P, Draper J S. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 2005 ;33(Pt 6):1526-30.

## **Životopis**

Maja Buljubašić rođena je 24.04.1981. g u Zagrebu. Nakon završene Opće gimnazije u Zagrebu studirala je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu na kojem je diplomirala 2006. te je iste godine stekla zvanje doktora medicine. Nakon toga je odradila staž u Kliničkoj bolnici Dubrava. Tijekom 2009. godine radila je kao liječnik primarne zdravstvene zaštite u ordinaciji obiteljske medicine te je krajem iste godine počela raditi u Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć u Zagrebu kao liječnik u kolima hitne pomoći. 2009. je izabrana u suradničko zvanje asistenta kao naslovno zvanje na Katedri za anatomiju i fiziologiju pri Zdravstvenom veleučilištu. 2009. je upisala poslijediplomski studij na PMF-u Sveučilišta u Zagrebu.

Početak 2010. godine zaposlena je u DZZ-Istok kao liječnik u ordinaciji obiteljske medicine te je krajem iste godine upućena na specijalizaciju iz obiteljske medicine. 2013. je izabrana u zvanje predavača na Katedri za anatomiju i fiziologiju na Zdravstvenom veleučilištu. 2015. je završila specijalizaciju i stekla zvanje specijalista obiteljske medicine. Od 2016. godine je suradnik u nastavi Katedre za obiteljsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Sudjelovala je na mnogobrojnim stručnim edukacijama u zemlji i inozemstvu, te svakodnevno sudjeluje u praktičnoj nastavi studenata i specijalizanata. Aktivno sudjeluje u znanstvenom radu kao doktorand Centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru kojega je koautor niza stručnih i znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima te sažetaka predstavljenih na nacionalnim i međunarodnim kongresima.