Ispitivanje djelovanja inhibitora RNazeH2A na stanice karcinoma mokraćnog mjehura

Brajičić, Senka

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:974146

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Senka Brajičić

ISPITIVANJE DJELOVANJA INHIBITORA RNAZEH2A NA STANICE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentor:

doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, srpanj, 2016. godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Senka Brajičić

ISPITIVANJE DJELOVANJA INHIBITORA RNAZEH2A NA STANICE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Diplomski rad

Akademska godina: 2015./2016.

Mentor:

doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, srpanj, 2016. godine

Zahvaljujem svojoj mentorici na nesebičnoj pomoći u izradi ovog rada i ugodnoj suradnji.

Zahvaljujem obitelji na razumijevanju tijekom cijelog studija.

Sadržaj

1 UVOD 1
1.1 Karcinom mokraćnog mjehura 2
1.1.1 Čimbenici rizika 3
1.1.2 Klinička slika 5
1.1.3 Dijagnostika 5
1.1.4 Stadij bolesti 7
1.1.5 Liječenje 8
1.2 Molekularna genetika karcinoma mokraćnog mjehura i molekularni biljezi 9
1.3 RNazeH 12
1.4 Genomska nestabilnost i RNazeH 13
2 CILJ ISTRAŽIVANJA 16
3 MATERIJALI I METODE 18
3.1 Materijali 19
3.2 Postupak 20
3.3 Test citotoksične aktivnosti 21
3.4 Statistička analiza 23
4 REZULTATI 24
4.1 Stanična linija T24 25
4.2 Stanična linija RT4 29
5 RASPRAVA 33
6 ZAKLJUČAK 37
7 LITERATURA 39
8 SAŽETAK 43
9 SUMMARY 46
10 ŽIVOTOPIS 49

1 UVOD

1.1 Karcinom mokraćnog mjehura

Karcinom mokraćnog mjehura zauzima sedmo mjesto u svijetu po učestalosti karcinoma u muškaraca i sedamnaesto u žena (1). Epidemiološki podaci upućuju da je karcinom mokraćnog mjehura mnogo češći među muškarcima, pripadnicima bijele rase i starijim osobama (2). Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura iznosi 65 godina (3). U svijetu je zabilježeno oko 429,800 novih slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura i 165,100 smrtnih slučajeva u 2012. godini (4). Prema podacima Hrvatskog registra za rak iz 2010. godine incidencija karcinoma mokraćnog mjehura u Republici Hrvatskoj iznosila je 22,4 na 100.000 stanovnika (muškarci 35, žene10,5) (5). Najveća incidencija je u Europi, Sjevernoj Americi, a najmanja u Istočnoj, Srednjoj i Zapadnoj Africi (4). Smrtnost od karcinoma mokraćnog mjehura 2008. godine u Republici Hrvatskoj je bila 5,3 na 100.000 stanovnika (muškarci 10,5, žene 2,1) (5). Najveća smrtnost je u Turskoj, koja je u 2012. godini iznosila 12,8 na 100,000, što je 50 posto više od najviše smrtnosti ostatka Europe (4).

Novotvorine mokraćnog mjehura dijelimo na epitelne i neepitelne (mezenhimne). Više od 98 posto novotvorina epitelnog je podrijetla od čega 90 % pripada novotvorinama prijelaznog epitela (urotela), oko 5% novotvorinama pločastih stanica te oko 1% adenokarcinomima (6). Urotelne se novotvorine mogu razviti na svim mjestima gdje je prisutan prijelazni epitel, od bubrežnih nakapnica do uretera, mokraćnog mjehura i dvije proksimalne trećine uretre. Urotelne novotvorine često sadrže mješavinu raznih histoloških podtipova (7). Adenokarcinomi nastaju iz ostataka urahusa, periuretralnih i periprostatičnih žlijezda te iz metaplastičnog urotela ekstrofičog mjehura. Mikroskopski se ti tumori ne razlikuju od adenokarcinoma drugih organa (8). Klasifikacija tumora urinarnog sustava prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (World Health Organization - WHO) i Međunarodnom udruženju uroloških patologa (International Society of Urologic Pathology - ISUP) iz 2004.g. prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. WHO / ISUP klasifikacija tumora urinarnog sustava (2004) (9)

Urotelni tumori :
↳ **Invazivni urotelni karcinom:**
S pločastom diferencijacijom
S glandularnom diferencijacijom

Sa trofoblastičnom diferencijacijom
Gnjezdasti
Mikrocistični
Mikropapilarni
Nalik limfoepiteliomu
Nalik limfomu
Plazmacitoidni
Sarkomatoidni
Velikostanični
Nediferencirani
↳ **Neinvazivne urotelne neoplazme:**
Urotelni karcinom *in situ*
Neinvazivni papilarni urotelni karcinom, visoki gradus
Neinvazivni papilarni urotelni karcinom, niski gradus
Neinvazivna papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala
Urotelni papilom
Invertirani urotelni papilom
Tumori pločastog epitela
Glandularne neoplazme
Neuroendokrini tumori
Melanocitični tumori
Mezenhimalni tumori
Hematopoetični i limfoidni tumori
Razni tumori

1.1.1 Čimbenici rizika

Veliki broj epidemioloških studija pokazuje da je oko 2 do 3 puta veći rizik za karcinom mjehura u osoba koje su ikada bili pušači u usporedbi s nepušačima. Rizik se povećava s brojem godina pušenja i brojem cigareta. Procijenjeno je da pušenje uzrokuje oko 31% karcinoma mokraćnog mjehura u muškaraca i 14% u žena diljem svijeta (4). Duhanski

dim sadrži razne vrste karcinogena kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, za duhan specifični nitrozamini i aldehidi. Navedeni karcinogeni su sposobni započeti karcinogenezu, primarno preko čimbenika koji vežu DNA, rezultirajući mutacijama gena važnih za preživljenje kao što su KRAS, p53 i Rb. Nikotin, sastojak duhana koji izaziva ovisnost, je nesposoban započeti karcinogenezu, ali je pokazano da, vezanjem i aktiviranjem staničnih receptora, posebno nikotin-acetilkolinskog, može biti promotor rasta karcinoma i metastaza inducirajući progresiju staničnog ciklusa, epitelno-mezenhimnu tranziciju, migraciju, invaziju, angiogenezu i izbjegavanje apoptoze (10).

Drugi rizični čimbenici kao što su boje za kosu i produkti sagorijevanja također uzrokuju oštećenje DNA. Rizični čimbenik je i dugotrajna izloženost visokim razinama anorganskog arsena (2). U zemljama u razvoju, posebno Africi i Zapadnoj Aziji, kronična infekcija *Schistosomom hematobium* (parazitni crv koji uzrokuje urinarnu shistosomijazu) je povezana s većim rizikom za karcinom mjehura. Parazitni crv, koji se prenosi kontaminiranom vodom, odgovoran je za oko 50% karcinoma mokraćnog mjehura u nekim dijelovima Afrike i oko 3% karcinoma u svijetu. Karcinomi uzrokovani tim parazitom histološki su obično karcinomi skvamoznih stanica, dok su oni povezani s pušenjem karcinomi prijelaznih stanica (4). Pokazano je da kemoterapeutik ciklofosfamid, alkiliranjem DNA, i anelgetik fenacetin, preko karcinogenih metabolita, mogu uzrokovati karcinom mokraćnog mjehura. Visok rizik za karcinom mjehura uočen je u radnika izloženih aromatskim aminima, a ukupni profesionalni rizik je odgovoran za oko 10 posto karcinoma mokraćnog mjehura u industrijaliziranim zemljama (2). Radnici s metalom, strojari, prijevoznici transportne opreme i rudari čine glavni udio u profesionalno povezanim karcinomom mokraćnog mjehura u muškaraca u zapadnoj Europi (11).

Genetske studije su otkrile nekoliko polimorfizama povezanih s karcinogenezom mokraćnog mjehura u genima za popravak DNA i detoksifikaciju, kao što su NAT2, GST i OGG1 (1). NAT2 enzimi velikim dijelom reguliraju N-acetilaciju kojom se mogu detoksificirati monoarilamini, jedni od glavnih karcinogena u pušača. Tako su karcinogeni manje podložni metaboličkoj aktivaciji enzimima P-450. Manjak oba NAT2 alela se očituje sporom acetilacijom, što, smatra se, smanjuje detoksikacijsku sposobnost. Otkrića takvih polimorfizama su važna uz okolišne čimbenike rizika i etničke razlike i pomažu u predviđanju prognoze. Rezultati meta-analize upućuju na veću povezanost (30-50%) pušenja i karcinoma mokraćnog mjehura u osoba sa sporom acetilacijom u usporedbi s osobama s brzom acetilacijom (12).

Janković i sur. predlažu da bi unos tekućine, konzumiranje voća i povrća, smanjeno profesionalno izlaganje, prevencija i kontrola urinarnih infekcija trebali biti preporučeni u prevenciji karcinoma mokraćnog mjehura (2).

1.1.2 Klinička slika

Glavni simptom bolesti je bezbolno krvarenje, koje je prisutno u 85% slučajeva. Krvarenje se pojavljuje u obliku makrohematurije ili mikrohematurije. Makrohematurija je intermitentna, potpuna i često praćena krvnim ugruščima (6). Karcinom mokraćnog mjehura se javlja u oko 20% bolesnika s makrohematurijom i 5% s mikrohematurijom (13). Pojava nekih simptoma ovisi o veličini i lokalizaciji tumora. U slučaju velikog tumora može doći do učestalog mokrenja zbog smanjenog kapaciteta mjehura. Tumori lokalizirani u vratu mjehura ili oni koji zauzimaju veliki prostor u mjehuru uzrokovat će još i disuriju i urgenciju. Takvi simptomi se mogu pojaviti i u slučaju ekstenzivnog karcinoma *in situ*. Tumori koji infiltriraju ureteralno ušće mogu uzrokovati hidronefrozu koja je loš prognostički znak (14). Rijetko, u slučaju lokalno proširenog tumora, je prisutna palpabilna masa u zdjelici, edem donjih udova i opstipacija (3, 8). U uznapredovaloj bolesti se javlja gubitak na težini te, zbog prisutnih metastaza, abdominalna ili koštana bol (14).

1.1.3 Dijagnostika

Pojavom hematurije potrebno je otkloniti ili dokazati sumnju na novotvorinu mokraćnog mjehura. U tu se svrhu, uz fizikalni pregled i uobičajenu laboratorijsku obradu, obavi ultrazvučni pregled mokraćnog mjehura i trbuha, kao i intravenska urografija, jer u 1 do 2% slučajeva postoji isti proces i u gornjim dijelovima urotrakta (6). Laboratorijska obrada uključuje kompletnu krvnu sliku i biokemijske pretrage krvi, klirens kreatinina te analizu sedimenta urina (5). Potom novotvorinu potvrđujemo cistoskopijom (6). Osim hematurije, kod koje smo isključili infekciju u podlozi, indikacije za cistoskopiju su i neobjašnjivi simptomi od strane donjeg dijela urinarnog trakta te citološki nalaz urina suspektan na malignitet (5). Cistoskopija opisuje sve makroskopske značajke tumora (lokalizaciju, veličinu i izgled) i nepravilnosti sluznice (15). Kombinacija citološke pretrage urina s cistoskopijom je uspješnija od same cistoskopije pri otkrivanju karcinoma mokraćnog mjehura visokog gradusa i Tisa (tumora *in situ*). Ukoliko postoji cistoskopski vidljiva tumorska tvorba u

mokraćnom mjehuru i/ili zadebljanje stjenke mokraćnog mjehura prikazano MR-om, CT-om ili ultrazvukom te pozitivna citološka pretraga urina na maligne stanice, slijedi transuretralna resekcija mokraćnog mjehura (5). Novotvorina se ukloni u cijelosti i šalje na patohistološku analizu i time se dobiva konačna patološka potvrda dijagnoze. Prije i poslije transuretralne resekcije se u općoj ili lokalnoj anesteziji učini bimanualna palpacija mokraćnog mjehura, čime se procjenjuje lokalna proširenost i ostatna tumorska masa nakon resekcije (6). Ponovna (sekundarna) transuretralna resekcija mokraćnog mjehura ponavlja se u razdoblju od, najčešće, 4 do 6 tjedana nakon inicijalne transuretralne resekcije (5).

Patološki opis nakon transuretralne resekcije mokraćnog mjehura treba sadržavati: histološki tip i podtip tumora, stupanj zloćudnosti (diferenciranosti) tumora (»niski gradus« ili »visoki gradus«) ili stupnjevanje od GX do G4, status subepitelnoga vezivnog tkiva i mišićnog sloja sluznice te limfokapilarnu invaziju i zahvaćenost mišićnog sloja stjenke mokraćnog mjehura (5). Gradus je najvažniji prognostički znak progresija, a zatim prisutnost Tis-a (6).

Patološki opis nakon radikalne ili parcijalne cistektomije sa zdjeličnom limfadenektomijom sadržava dodatna obilježja kao što je: smještaj i veličina tumora te opis prodora tumora u okolinu, odnosno zahvaćenost perivezikalnog tkiva, organa (prostata, maternica, rodnica) te zdjelične i trbušne stjenke, zahvaćenost reznih rubova i udaljenost tumora od reznih rubova, smještaj, broj pregledanih, broj i veličinu zahvaćenih limfnih čvorova (5).

U dijagnostičku obradu je uključen i rendgenogram prsišta te CT ili MR zdjelice (5). CT-om ili MR-om nije moguće otkriti mikroskopsku invaziju u perivezikalno masno tkivo (T2 vs. T3a). Glavna svrha CT-a i MR-a je otkriti T3b stadij bolesti te viši stadij (15).

U bolesnika sa simptomima proširuje se pretraga ovisno o sumnji na sijelo metastaza te uključuje: scintigrafiju kostiju ako je alkalna fosfataza povišena ili postoji bolnost u kostima, MR ili CT mozga kod sumnje na moždane presadnice, biopsiju metastatskog čvora na vratu, FDG-PET/CT u bolesnika nakon terapije kad su druge metode nedostatne za daljnju terapijsku odluku ili ako postoji sumnja na diseminaciju bolesti koju prethodna obrada nije pokazala (5).

Oko 70 % novodijagnosticiranih slučajeva su mišićno-neinvazivni i to egzofitični papilarni tumori ograničeni u velikoj mjeri na mukozu (Ta; 70%), ili manje često na submukozu (T1; 25%), te ravne lezije visokog gradusa (Tis; 5%). Vjerojatnost progresije u mišićno-invazivni karcinom za Ta i T1 je veća od 50 %, dok je za Tis od 50 do 90 %. Tis obilježava visoka vjerojatnost povratka bolesti u sljedećih pet godina (7). Oko 40 %

invazivnih tumora nastaje progresijom iz neinvazivnih, dok se oko 60% od samog početka prezentira kao invazivni. U 30 % bolesnika s invazivnom bolešću postoje subkliničke metastaze (6).

1.1.4 Stadij bolesti

Procjena proširenosti bolesti ili stadij bolesti je važna za izbor odgovarajuće terapije te prognozu bolesti, a određuje se prema TNM-klasifikaciji (Tablica 3) (3). Određivanje stadija bolesti temelji se na bimanualnoj palpaciji (u anesteziji), patohistološkom nalazu (nakon biopsije, transuretralne resekcije ili kirurškog zahvata) te radiološkoj dijagnostici (5).

Tablica 3. TNM-klasifikacija prema American Joint Committee on Cancer (AJCC, sedmo izdanje, 2010) (5).

Primarni tumor (T)	
Tx	primarni se tumor ne može odrediti
T0	nema tumora
Ta	neinvazivni papilarni karcinom
Tis	rak in situ: »ravni tumor«
T1	tumor zahvaća subepitelno vezivno tkivo
T2	tumor zahvaća muskularis propriju
T2a	tumor zahvaća superficijalni sloj muskularis proprije (unutrašnju polovinu)
T2b	tumor zahvaća duboki sloj muskularis proprije (vanjsku polovinu)
T3	tumor zahvaća perivezikalno tkivo
T3a	mikroskopski
T3b	makroskopski (ekstravezikalna masa)
T4	tumor zahvaća nešto što slijedi: stromu prostate, seminalne vezikule, uterus, vaginu, stjenke zdjelice ili abdominalnu stjenku
T4a	tumor zahvaća stromu prostate, uterus, vaginu
T4b	tumor zahvaća stjenke zdjelice, abdominalnu stjenku
Regionalni limfni čvorovi (N) (Regionalni limfni čvorovi uključuju primarnu i sekundarnu drenažnu regiju. Svi limfni čvorovi iznad bifurkacije aorte smatraju se metastatskim limfnim čvorovima.)	

Nx	ne može se procijeniti prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	metastaza u jednome limfnom čvoru zdjelice (hipogastričnom, opturatornom, vanjskom ilijakalnom ili presakralnome limfnom čvoru)
N2	multiple metastaze u limfnim čvorovima zdjelice (hipogastričnim, opturatornim, vanjskim ilijakalnim ili presakralnim limfnim čvorovima)
N3	metastaza u limfnom čvoru područja zajedničkih ilijakalnih limfnih čvorova
Udaljene metastaze (M)	
M0	nema udaljenih metastaza
M1	prisutne su udaljene metastaze

1.1.5 Liječenje

Kako se liječenje temelji na stupnju proširenosti bolesti, razlikuje se pristup neinvazivnom i invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (3). Liječenje mišićno-neinvazivnih tumora mokraćnog mjehura podrazumijeva odstranjenje tumora te prevenciju recidiva i progresije (5).

Primarni oblik liječenja za mišoćno-neinvazivni karcinom mokraćnog mjehura je transuretralna resekcija tumora (6). Nakon resekcije urolog razmatra ponovnu resekciju te adjuvantnu intravezikalnu terapiju, ovisno o gradusu, stadiju i brojnosti lezija (16). Zbog visoke stope lokalnog povratka bolesti, potrebno je ponavljati cistoskopiju u tromjesečnim intervalima. Adjuvantno se primjenjuje imunoterapija BCG-om (Calmette-Guérinova bacila) ili kemoterapija mitomicinom C. Intravezikalana imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva (3). Terapija BCG-om je značajno uspješnija od terapije mitomicinom C u skupini bolesnika s visokim rizikom povratka bolesti (16).

Za invazivni je karcinom metoda izbora radikalna cistektomija. Radikalna cistektomija uključuje, uz uklanjanje mokraćnog mjehura, i uklanjanje prostate i sjemenskih mjehurića u muškaraca, te maternice i jajnika u žena. Također se uklanjaju zdjelični limfni čvorovi, a u određenim slučajevima i mokraćna cijev (6). U izabranih bolesnika s invazivnim rakom može se provesti konkomitantna kemoiradijacija (usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije

temeljene na cisplatini) u svrhu očuvanja mokraćnog mjehura. Bolesnici koji zbog lošeg općeg stanja ili znatnog komorbiditeta ne mogu tolerirati kemoiradioterapiju samo se zrače (3). Često se prije ili poslije kirurškog zahvata kod mišićno-invazivnog karcinoma provodi kemoterapija. Kemoterapija može produljiti preživljenje i smanjiti rizik od povratka karcinoma. Primjena kombinacije cisplatine i gemcitabina se pokazala manje toksičnom od MVAC protokola (metotreksat/vinblastin/doksorubicin/cisplatina) (17). Metastatska bolest se najčešće liječi kemoterapijom, MVAC ili GC (gemcitabin/cisplatina) protokolom (5). U slučaju prisutnosti koštanih presadnica primjenjuju se bifosfonati te palijativna radioterapija bolnih sijela. Palijativna se radioterapija može primjenjivati i radi zaustavljanja krvarenja iz mokraćnog mjehura (3).

Petogodišnje preživljenje bolesnika s neinvazivnim karcinomom mokraćnog mjehura je 90%, dok je preživljenje s invazivnim 66% (6). Praćenje bolesnika se vrši redovitim kontrolama svakih 3 do 6 mjeseci u prvoj godini, a potom jednom godišnje. Praćenje uključuje klinički pregled, ultrazvuk ili MSCT trbuha i male zdjelice, krvnu sliku, biokemijske pretrage, citološku analizu urina, analizu mokraćnog sedimenta te prema potrebi i druge pretrage (3).

1.2 Molekularna genetika karcinoma mokraćnog mjehura i molekularni biljezi

Uočava se da se tumori urotela razvijaju dvama, velikim dijelom neovisnim, putevima koji se odnose na papilarne i nepapilarne tumore. Papilarni tumori proizlaze iz ravnih hiperplastičnih promjena urotela koji se odnose na tumore niskog gradusa. Tipično su niskog gradusa i rastu kao površinske neinvazivne papilarne protruzije. Imaju visoku sklonost recidiviranju, ali praktično nikad nisu invazivni ili metastaziraju. Nepapilarni solidni tumori nastaju iz teške displazije ili karcinoma *in situ* i visokog su gradusa te invadiraju zid mokraćnog mjehura i metastaziraju u regionalne limfne čvorove i udaljena područja. Većini tumora visokog gradusa ne prethode papilarni tumori. Površinski tumori niskog gradusa u 10-15% progrediraju u invazivne tumore visokog gradusa i to tipično razvojem iz karcinoma *in situ*. U papilarnim tumorima se često susreće mutacija receptora za faktor rasta FGFR3, a rjeđe u nepapilarnim. Suprotno tome, alteracije p53/Rb/PTEN/mTor puteva se susreću u invazivnim tumorima (18).

Papilarni tumori zbog učestalog recidiviranja ostvaruju značajan trošak u kliničkom zbrinjavanju i predstavljaju javno zdravstveni problem. Mišićno-invazivni tumori velikim dijelom razviju rezistenciju na kemoterapiju i potom brzom progresijom završavaju fatalno. Stoga bi identifikacija molekularnih mehanizama u svrhu prevencije recidiva i progresije u mišićno-invazivne tumore bila od velike važnosti (18). Identifikacija specifičnih genomskih alteracija može omogućiti razvoj specifičnog terapijskog pristupa svakom pacijentu (19).

Česte genetičke i epigenetičke aberacije urotelnih karcinoma, njihova kliničko-patološka povezanost i druge značajke su prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Česte genetičke i epigentičke aberacije urotelnih karcinoma (20)

Gen	Lokacija	Uloga	Promjena	Kliničko-patološka povezanost
TP53	17p13.1	Tumor supresor	Delecija/mutacija	Visoki gradus
MDM2	12q14.3-q15	Onkogen	Amplifikacija	Visoki gradus
HRAS*	11p15	Onkogen	Aktivirane mutacije	Svi gradusi i stadiji do 15 %
FGFR3	4p16.3	Onkogen	Aktivirane mutacije	Predominantno niski gradus i stadij
E2F3	6p22	Onkogen	Amplifikacija	Invazivni visokog gradusa
CCND1	11q13	Onkogen	Amplifikacija	Svi gradusi i stadiji
CDKN2A	9p21	Tumor-supresor	Delecija/mutacija	Svi gradusi i stadiji, primarno visoki gradus
RB1	13q14.2	Tumor-supresor	Delecija/mutacija	Invazivni visokog gradusa
ERBB2	17q21-q22	Onkogen	Amplifikacija	Invazivni visokog gradusa

MYC	8q24.21	Onkogen	Amplifikacija	Invazivni visokog gradusa
PTEN	10q23.3	Tumor-supresor	Delecija/mutacija	Visoki gradus, svi stadiji
RASSF1A	3p21.3	Tumor-supresor	Metilacija	Invazivni visokog gradusa, povezan s progresijom
FHIT	3p14.2	Tumor-supresor	Delecija/metilacija	Visoki gradus, povezan s progresijom
PTCH	9q22.3	Tumor-supresor	Delecija/metilacija	Svi gradusi i stadiji
DBC1	9q32-33	Tumor-supresor	Delecija/metilacija	Svi gradusi i stadiji
TSC1	9q34	Tumor-supresor	Delecija/metilacija	Svi gradusi i stadiji

Epitelni tumori mogu tijekom progresije izgubiti epitelni fenotip i postati mezenhimni, sarkomima-slični tumori. Takve tumore karakterizira visoka agresivnost, rezistencija na terapiju i letalnost. Proces kojim se razvijaju jest nazvan epitelno-mezenhimna tranzicija, a karakterizira ih, među ostalim, i smanjena ekspresija adhezijskih molekula E-kadherina te povećana ekspresija matriks metaloproteinaza. U zadržavanju epitelnog fenotipa karcinoma mjehura pozitivnu ulogu ima i ekspresija miRNA (miR200). Sve je više dokaza da epitelno-mezenhimna transformacija ima ulogu u progresiji i metastaziranju. U metastatskim tumorima ekspresija E-kadherina obično je smanjena i smatra ga se, prema pretkliničkim studijama, metastatskim supresorom, dok je ekspresija metaloproteinaza povećana, što vodi u invaziju, migraciju i angiogenezu. K tome je pokazano da osjetljivost stanica na kemoterapiju inhibitorima receptora epidermalnog faktora rasra (EGFR) ovisi i o prisutnosti istih (epitelnih) biljega, E-kadherina i miRNA (miR200).

Postoje i druga područja zanimljiva za istraživanje progresije karcinoma kao što su matične stanice mokraćnog mjehura, epigenetičke promjene (metilacija ili acetilacija kromatina i histona) i diferencijalna ekspresija mikro RNA (18).

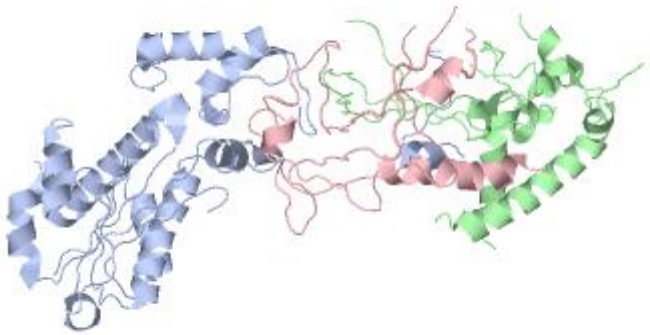
Uloga molekularnih biljega nije još uvijek jasna i nisu široko prihvaćeni u procesu kliničkog zbrinjavanja. Širok je doseg istraživanja molekularnih biljega, koji uključuje biljege proliferacije, apoptoze, tumor-supresorske gene, faktore rasta i njihove receptore, onkogene, hormonske receptore, adhezijske molekule stanica, telomeraze, hijaluronsku kiselinu, proteine povezane s mikrotubulima, E2F transkipcijski faktor, MDR proteine, COX 2, uroplakin i druge (21).

Potreba za njima u probiru, ranoj dijagnostici i praćenju postoji zbog potrebe za neinvazivnim, osjetljivijim i jeftinijim tehnikama nego što su endoskopske. Uz to, dok citologija urina pomaže u detektiranju tumora visokog gradusa, njena je osjetljivost za tumore niskog gradusa od 4% do 31%. Također, markeri biološkog i kliničkog ponašanja su nužni za bolje otkrivanje stadija, prognoze te terapijskog pristupa i praćenja odgovora na terapiju (13).

1.3 RNazeH

RNaze H su enzimi prisutni u svim živim organizmima. RNaza H pripada superobitelji retroviralnih integraza. Superobitelj retroviralnih integraza obuhvaća mnoge važne enzime koji obrađuju nukleinsku kiselinu i međusobno pokazuju veliku strukturnu sličnost te sadrže isto katalitičko središte. Glavni element katalitičkog središta je beta ploča kojoj je pripojen različit broj alfa uzvojnica koje su različito organizirane. Aktivno mjesto enzima veže dvovalentne metalne ione (predominantno Mg2+) koji su esencijalni za katalitičku aktivnost (22). Eukarioti posjeduju dva tipa ovih enzima, RNazuH1 i RNazuH2 (Slika 1), koji imaju različite biokemijske karakteristike i specifičnost za supstrate (23). RNazaH1 hidrolizira RNA-DNA hibride tako da međudjeluje s 2-OH skupinom barem četiri uzastopna ribonukleotida i time ih uspješno uklanja, dok RNazaH2 hidrolizira sve tipove hibrida. RNA-DNA hibridi se formiraju za vrijeme replikacije i transkripcije, bilo u tijeku normalnog procesa, kao što je inicijacija s Okazakijevim fragmentom, ili slučajnim hibridiziranjem DNA i RNA koja se ne spoji s postranskripcijskim aparatom (22). Mitohondrijska izoforma RNaze H1 jest esencijalna u replikaciji mitohondrijske DNA (23).

U sisavaca jest predominantna aktivnost RNaze H2 (23). RNaza H2 je heterotrimer koji se sastoji od jedne katalitičke podjedinice, RNazeH2A, te dvije nekatalitičke podjedinice, RNazeH2B i RNazeH2C. Podjedinice zajedno mogu prepoznati i ukloniti jedan ribonukleotid u DNA-DNA kompleksu. Ribonukleotid u dsDNA može biti posljedica pogreške DNA polimeraze ili nepotpunog uklanjanja Okazakijevog fragmenta tijekom replikacije (22). RNazaH2 je izraženija u stanicama koje se aktivno dijele, a ekspresija korelira sa ekspresijom proliferacijskog biljega Ki67 (23). Mutacija neke od podjedinica može rezultirati Aicardi-Goutières sindromom, genetičkim poremećajem sa simptomima sličnim *in utero* virusnoj infekciji koja pogađa živčani sustav. Takav fenotip je posljedica aktiviranja prirođenog imunog odgovora akumuliranim hibridima (24).



Slika 1. Pojednostavljeni model RNaze H2 (preuzeto sa http://www.proteopedia.org)

1.4 Genomska nestabilnost i RNazeH

Genomska nestabilnost je obilježje karcinomskih stanica (25). Neuspješni popravak DNA oštećene unutarstaničnim ili izvanjskim stresom može rezultirati genomskom nestabilnošću koja se očituje velikim kromosomskim preraspodjelama (26). Velike kromosomske preraspodjele su pronađene u mnogo različitih tumora (25). Pojavljuju se kao translokacije, inverzije, amplifikacije, intersticijske delecije, terminalne delecije s *de novo* sintetiziranim telomerama, kromosomske fuzije te aneuploidije (25, 26). Te genetske malformacije često vode do stanične smrti ili karcinogeneze (26). Do sada je otkriveno barem pet različith putova u supresiji velikih kromosomskih preraspodjela koji uključuju kontrolne točke u fazi replikacije staničnog ciklusa, rekombinacijski put poznat kao lomovima

inducirana replikacija, put koji suprimira *de novo* produljivanje telomera, putovi za remodeliranje kromatina i „mismatch“ popravak koji sprječava rekombinaciju između različitih DNA sekvenci. Oštećenu DNA prvo prepoznaju kontrolne točke S faze koje potom odašilju signal za popravak DNA. Također se može odaslati signal za ubikvitinaciju supstrata. Štetu DNA koja nije popravljena prepoznaju mitotičke kontrolne točke. Oštećena DNA potom podliježe endonukleazama i egzonukleazama, a nakon toga telomeraze dodaju telomerske sekvence na kraj slomljenih kromosoma (25).

Mutacije koje remete DNA replikaciju su značajan uzrok velikih kromosomskih preraspodjela (27). Tijekom DNA replikacije replikacijske rašlje zastaju na mjestu oštećene DNA ili na mjestima gdje se normalno javljaju replikacijske barijere (26). Ako šteta nije pravilno uklonjena, zbog zakočene replikacije, replikacijske rašlje se ruše i nastaju dvostruki lomovi DNA koji su posrednici velikih kromosomskih preraspodjela (26, 27). Studije na bakterijama i kvascu upućuju da su, uz pogrešnu replikaciju, lomovi dvostrukog lanca posljedica egzogenih štetnih čimbenika i pogrešnog popravka DNA.

Delecije gena koji sudjeluju od inicijacije transkripcije do RNA degradacije i eksporta pojačavaju nestabilnost. Istraživanje u kvasca pokazuje da pogreške u transkripciji, kao što je mutacija čimbenika uključenog u elongaciju, rezultira delecijama i nakupljanjem RNA-DNA hibrida. Pri tome povećana ekspresija RNazeH sprječava pojavu hibrida i povezanih delecija. Sličan ishod nastaje i pri nedostatku faktora prekrajanja. Pogreške u RNA biogenezi, stoga, mogu biti velika prijetnja genomskom integritetu, a RNazaH djeluje kao čuvar genoma. K tome u studiji koja je ispitivala ulogu RNazeH u supresiji RNA-DNA hibrida i genomske nestabilnosti je ustanovljeno da inaktivacija oba tipa RNazeH povećava velike kromosomske preraspodjele slično kao i najteže mutacije u biogenezi mRNA (27).

Povećana genomska nestabilnost uz kromosomske lomove nastaje u stanicama s inaktiviranom RNazomH2A ili RNazomH2B. Inaktivacijom RNazeH2 se otkrila važnost ovih enzima u razvoju embrija, gdje zbog oštećenja DNA dolazi do aktivacije p53 gena te posljedično zaustavljanja staničnog ciklusa i smanjene proliferacije stanica embrija. Također dolazi i do akumulacije ribonukleotida (23). RNazaH2 je sposobna ukloniti ribonukleotide i to upućuje na njenu uključenost u DNA replikaciju i popravak (22). Prilikom stvaranja DNA lanca DNA polimeraze mogu umjesto deoksiribonukleotida inkorporirati ribonukleotide i to svakih tisuću parova baza. Poznato je da ribonukleotidi podliježu spontanoj hidrolizi znatno više od deoksiribonukleotida. Također nakupine ribonukleotida mogu usporavati replikacijske rašlje. Usporavanje replikacijskih rašlji i hidroliza ribonukleotida na DNA lancu mogu rezultirati pucanjem DNA lanaca (23). Whaba i sur. zaključuju da su poremećena RNA

biogeneza i funkcija RNazeH važni za očuvanje genomske strukture i da predstavljaju mogući molekularni mehanizam pojave kromosomskih preraspodjela povezanih s karcinomom. Također sama genomska nestabilnost može uzrokovati promjene u transkripciji koje su potrebne za progresiju karcinoma (27).

Studija koja je tražila nove terapijske mete za karcinome upućuje da bi RNA regulirajući enzimi mogli predstavljati novu klasu enzima kao potencijalne terapijske mete. U studiji je, također, pronađena pojačana ekspresija RNazeH2A, katalitičke podjedinice RNazeH2 kompleksa, u mezenhimalnim matičnim stanicama nakon inaktivacije pRb-a i u potpuno transformiranim mezenhimalnim matičnim stanicama (koje su kroz pet koraka, uključujući korak inaktivacije pRb-a, došle do potpune transformacije). Također, pojačana se ekspresija RNazeH2A nalazi u raznim vrstama karcinoma uključujući karcinom mokraćnog mjehura, mozga (multiformni glioblastom, oligodendrogliom i oligoastocitom), dojke, glave i vrata te leukemijama (T i B staničnim akutnim limfoblastičnim leukemijama i akutnim mijeloidnim leukemijama), melanomima i seminomima. Gen za RNazuH2A je identificiran kao jedan od 2 posto gena koji pokazuju značajnu sličnost s profilima terapijskih meta karcinoma poznatog uspjeha. K tome, izbacivanje RNazeH2A pomoću tranzitne siRNA i shRNA u transformiranim mezenhimalnim matičnim stanicama je rezultiralo značajnim smanjenjem broja njihovih kolonija. Ovo je istraživanje je dokaz da RNazeH2A može imati ulogu u transformaciji stanica (28).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati pojedinačno djelovanje inhibitora RNazeH2A, pod nazivima Inhibitor A, Inhibitor B i Inhibitor C, na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura T24 i RT4. Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih stanica T24 i RT4 staničnih linija svakom pojedinačnom inhibitoru smanjiti preživljenje karcinomskih stanica, to jest broj karcinomskih stanica će biti manji u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje nisu izložene inhibitorima.

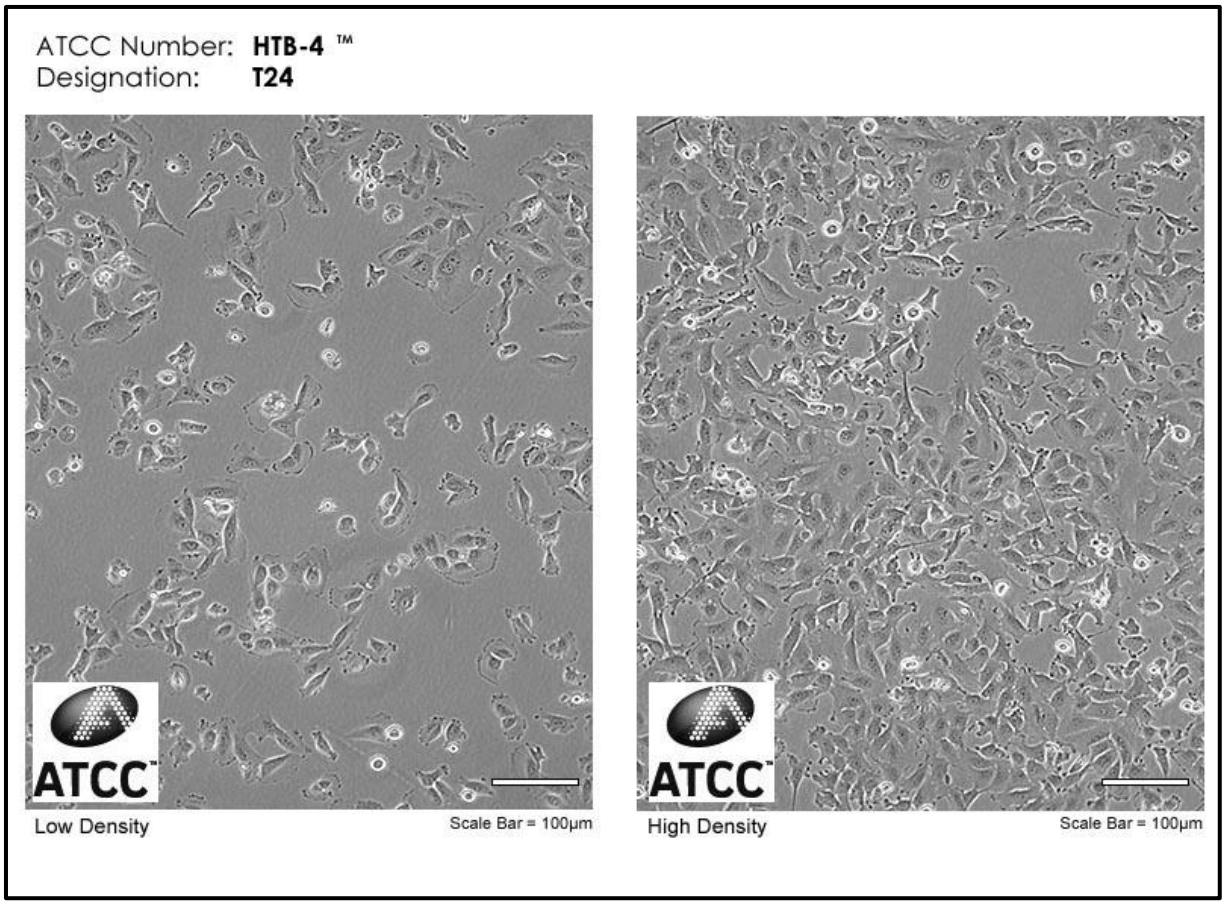
3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

U *in vitro* istraživanju ispitivanje djelovanja inhibitora se provodilo na ljudskim karcinomskim stanicama T24 (Slika 2) i RT4 stanične linije. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u Tablici 5.

Tablica 5. Obilježja T24 i RT4 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

Organizam	*Homo sapiens*, čovjek
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	Stanična linija T24: karcinom prijelaznih stanica
	Stanična linija RT4: papilom prijelaznih stanica
Genske mutacije	Stanična linija T24: HRAS, TP53
	Stanična linija RT4: CDKN2A,TSC1

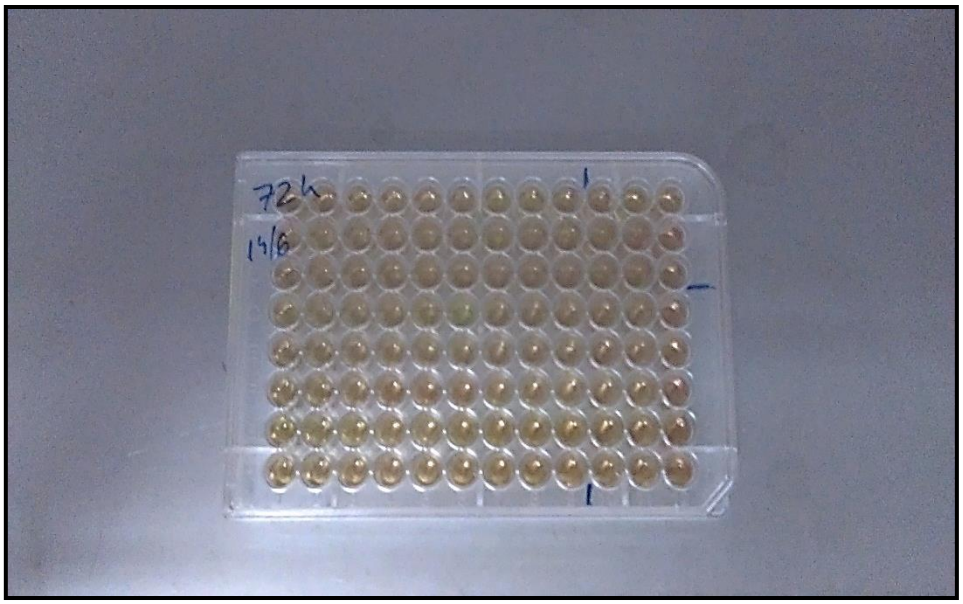


Slika 2. Karcinomske stanice T24 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

3.2 Postupak

Nakon odmrzavanja, stanične linije su uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37 °C uz 5% CO_2, u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju. Nakon inkubacije, stanice su presađene na četiri ploče od 96 jažica. U jažice je dodan DMEM medij i stanice su ostavljene da adherairaju preko noći za podlogu. (Slika 3) Prije dodavanja inhibitora, medij je ispran, a stanice su ostale adherirane za dno jažica. Inhibitori su dodani tako da je jedan inhibitor u jednoj koncentraciji dodan u tri jažice, a koncentracije inhibitora su prikazane u grafovima s rezultatima. Koncentracije inhibitora su dobivene postepenim razrjeđivanjem početne koncentracije inhibitora pomiješanog s medijem. U tri jažice, koje su predstavljale kontrolnu skupinu, nije dodan nijedan inhibitor već su ostavljene stanice u samom DMEM mediju.

Citotoksičnost inhibitora se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata, zbog čega je bilo potrebno stanice nasaditi u četiri seta jažica.

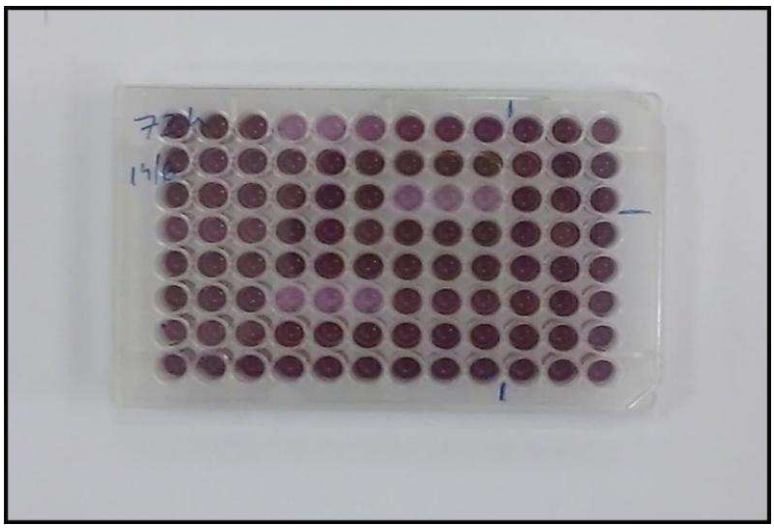


Slika 3. Karcinomske stanice presađene u 96 jažica i izložene različitim koncentracijama otopina inhibitora (prije dodavanja MTT-a).

3.3 Test citotoksične aktivnosti

Citotoksičnost je određena MTT testom. Nakon inkubacije s inhibitorima, u svaku jažicu je dodan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od inhibitora, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT (Slika 4). Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a (29). Na kraju je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija ljubičastog spoja, biljega živih stanica, za svaku jažicu posebno, uključujući i jažice s kontrolnom skupinom u kojima očekujemo najviši stupanj obojenja, kao i najveću apsorbanciju (Slika 5). Da bi se mogla očitati apsorbancija (na 570 nm) novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) (29). Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO (Slika 4). Apsorbancija za svaku koncentraciju pojedinog inhibitora je srednja vrijednost apsorbancja iz tri jažice s istom koncentracijom pojedinog inhibitora. Apsorbancije iz jažica ispitivanih skupina su

uspoređene s apsorbancijom iz jažica kontrolne skupine stanica koje nisu izložene djelovanju inhibitora.



Slika 4. Ljubičasto obojenje (biljeg živih stanica) nakon dodavanja DMSO-a (koji otapa neotopljeni ljubičasti spoj formazan) u otopinu MTT-a



Slika 5. Spektrofotometar

3.4 Statistička analiza

Nakon izmjerenih apsorbancija ispitivanih i kontrolnih skupina, izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju pojedinog inhibitora (Inhibitora A, Inhibitora B i Inhibitora C) i kontrolnih skupina. Zatim su izračunate vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju pojedinog inhibitora (Inhibitora A, Inhibitora B i Inhibitora C) nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Rezultati su izračunati u programu Microsoft Excel i prikazani su slikovno.

4 REZULTATI

Rezultati pokazuju preživljenje karcinomskih stanica T24 i RT4 stanične linije u usporedbi s kontrolama (100% preživljenje, preživljenje stanica=1) u odnosu na:

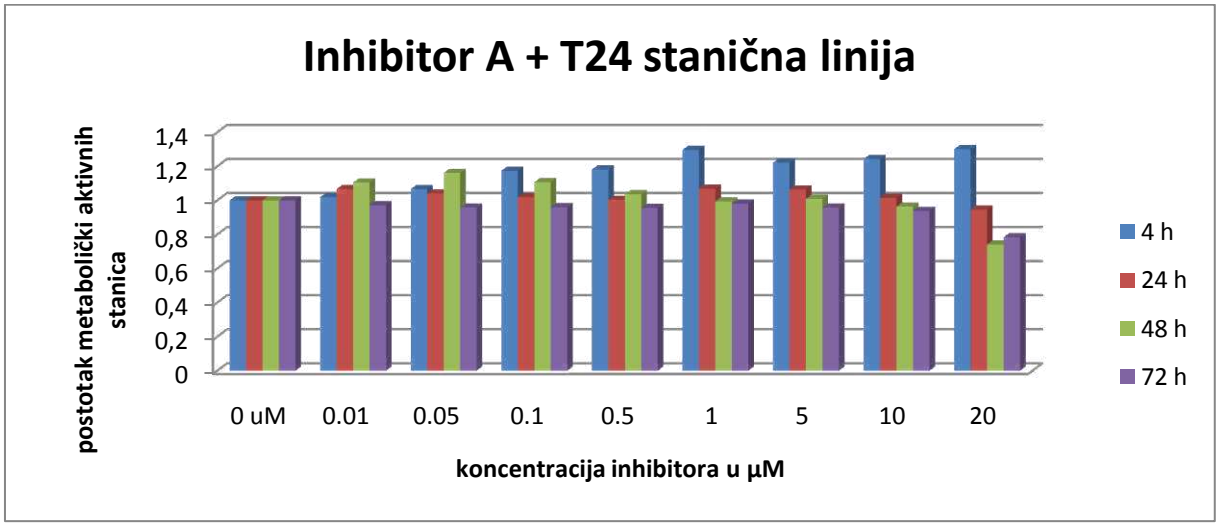
1. vrijeme izloženosti Inhibitoru A, Inhibitoru B, Inhibitoru C (4, 24, 48 i 72 sata)
2. različite koncentracije Inhibitora A, Inhibitora B i Inhibitora C.

Rezultati su prikazani zasebno za T24 I RT4 staničnu liniju.

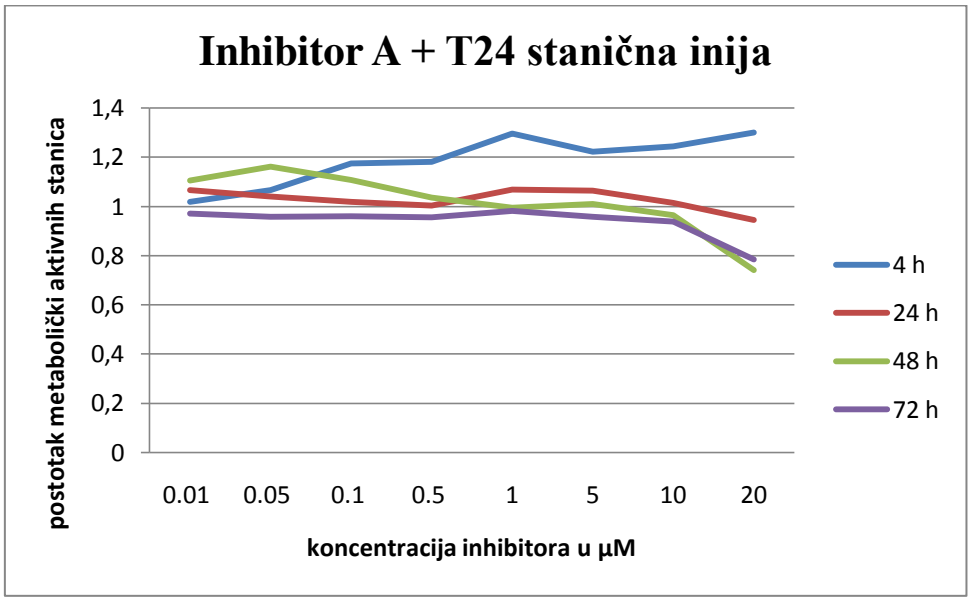
4.1 Stanična linija T24

Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli tek nakon 24 sata djelovanja Inhibitora A u najvišoj koncentraciji (20 μM) (Slika 6 i 7). Nakon 48 sati stanice pokazuju smanjeno preživljenje pri koncentracijama Inhibitora A od 1, 10 i 20 μM, dok je nakon 72 sata preživljenje smanjeno već pri najmanjoj koncentraciji inhibitora od 0.01 μM (Slika 6 i 7).

Slika 6. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru A

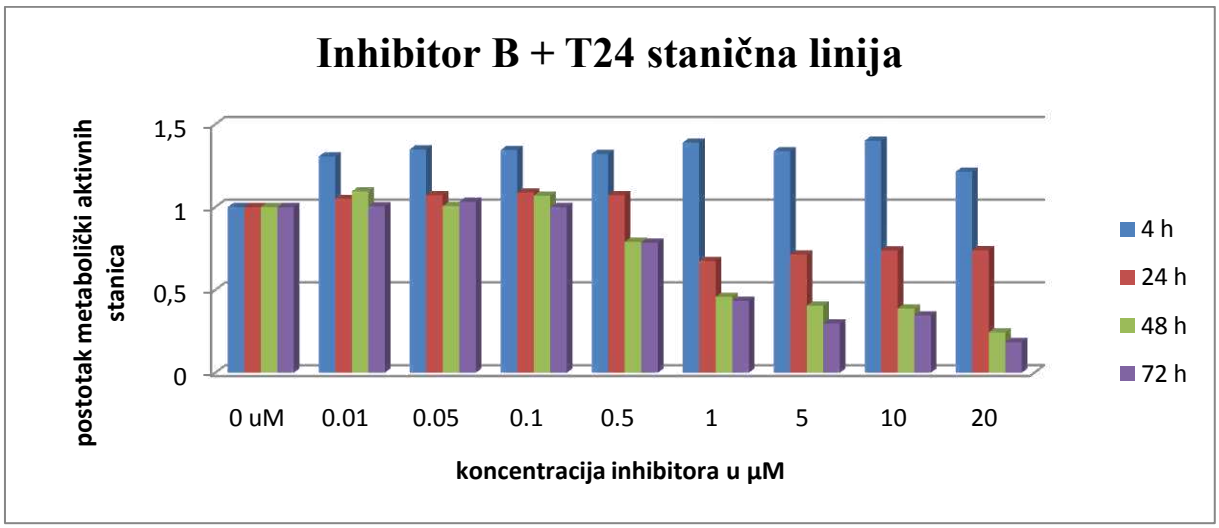


Slika 7. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru A

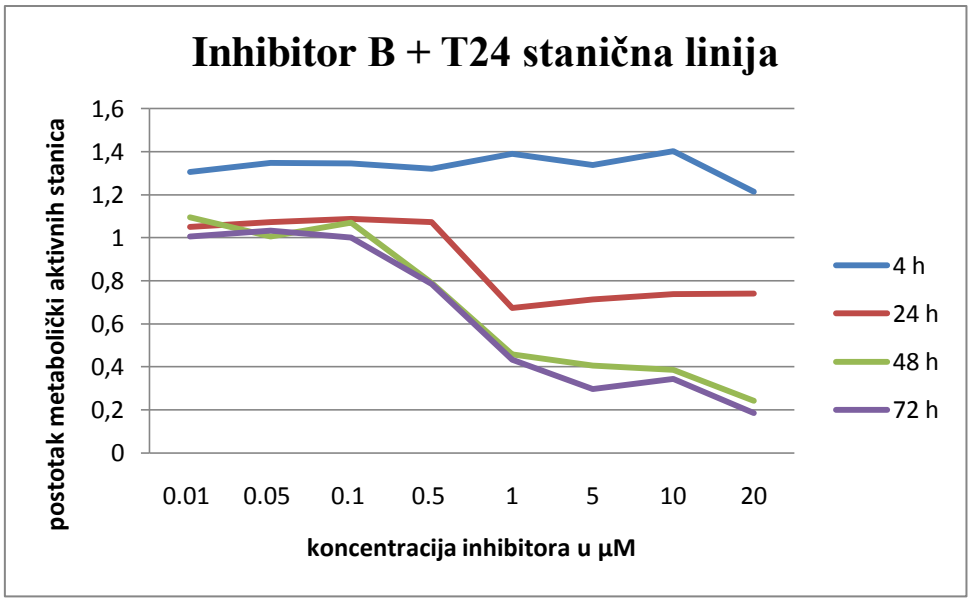


Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli tek nakon 24 sata djelovanja Inhibitora B u koncentracijama od 1 do 20 µM (Slika 8 i 9). Nakon 48 sati stanice pokazuju smanjeno preživljenje pri koncentraciji Inhibitora B od 0.5 µM koje se razmjerno smanjuje daljnjim povećanjem koncentracije (Slika 8 i 9). Sličan je učinak inhibitora i nakon 72 sata koje obilježava najmanje preživljenje stanica (Slika 8 i 9). Preživljenje karcinomskih stanica je manje nakon izlaganja Inhibitoru B nakon 24, 48 i 72 sata u odnosu na Inhibitor A.

Slika 8. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru B



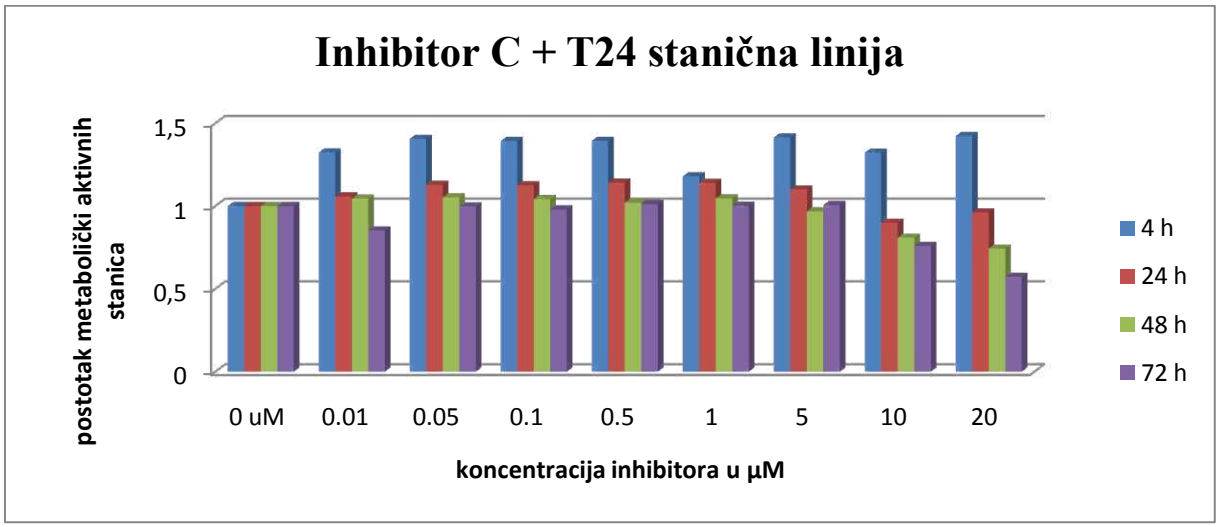
Slika 9. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru B



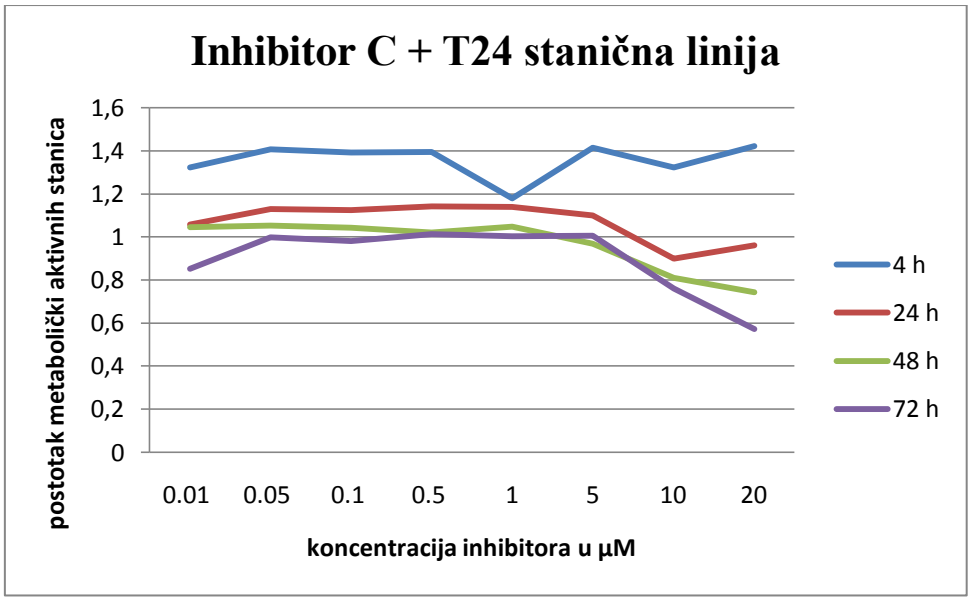
Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli tek nakon 24 sata djelovanja Inhibitora C u koncentraciji od 10 i 20 µM (Slika 10 i 11). Nakon 48 sati stanice pokazuju smanjeno preživljenje pri koncentraciji Inhibitora C od 5 µM, koje se razmjerno smanjuje daljnjim povećanjem doze (Slika10 i 11). Smanjeno preživljenje nakon 72 sata se vidi pri svim koncentracijama Inhibitora C, izuzev koncentracija

od 0.5, 1 i 5 µM, a najmanje je preživljenje pri koncentraciji od 10 i 20 µM (Grafikon 10 i 11).

Slika10. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru C



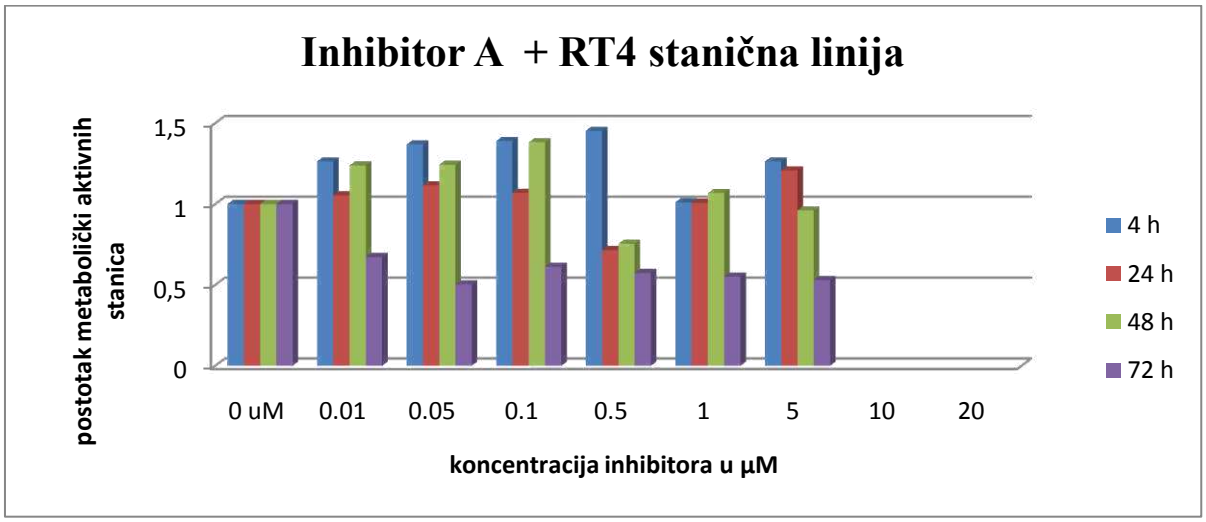
Slika 11. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru C



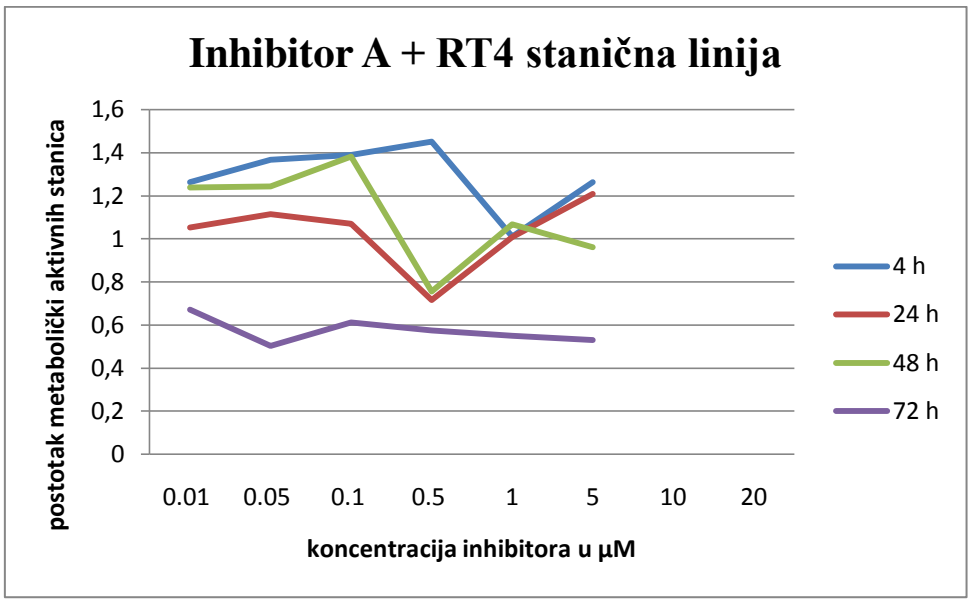
4.2 Stanična linija RT4

Karcinomske stanice RT4 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli tek nakon 24 sata djelovanja Inhibitora A samo u koncentraciji od 0.5 μM (dok pri većim konc preživljenje nije smanjeno) (Slika 12 i 13). Nakon 48 sati stanice pokazuju smanjeno preživljenje samo pri koncentracijama od 0.5 i 5 μM (dok pri većim koncentracijama nije smanjeno) Nakon 72 sata preživljenje je smanjeno već pri najmanjoj koncentraciji inhibitora od 0.01 μM (Slika 12 i 13).

Slika 12. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru A

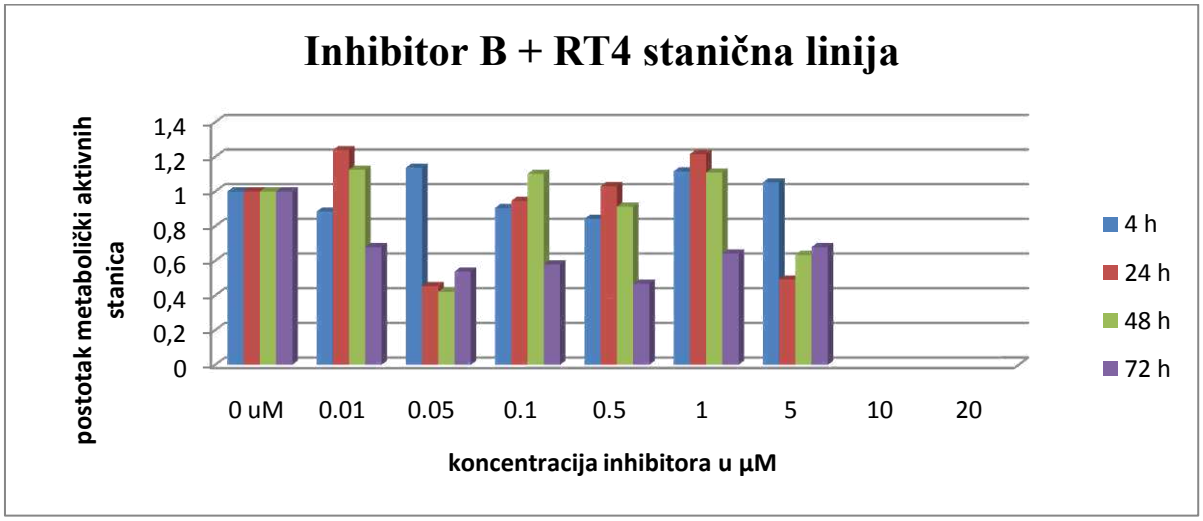


Slika13. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru A

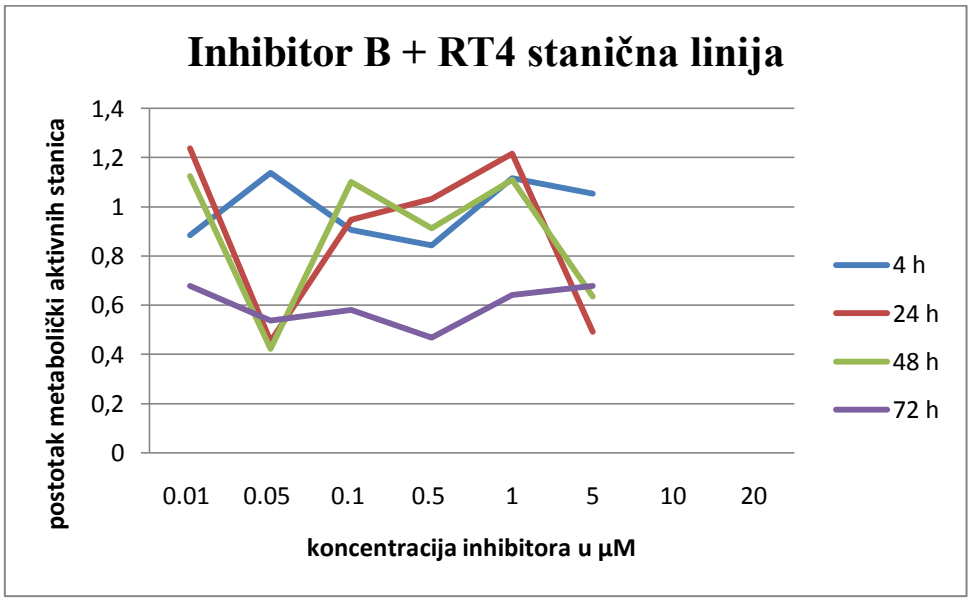


Karcinomske stanice RT4 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli nakon 4 sata djelovanja Inhibitora B pri koncentracijama od 0.01, 0.1 i 5 µM (Slika 14 i 15). Nakon 24 sata stanice pokazuju smanjeno preživljenje u koncentraciji od 0.05, 0.1 i 5 µM, a nakon 48 sati u koncentraciji od 0.05, 0.5 i 5 µM s najvećim smanjenjem pri koncentraciji od 5 µM. Nakon 72 sata preživljenje je smanjeno već pri najmanjoj koncentraciji inhibitora od 0.01 µM Ne uočava se razmjerno smanjenje preživljenja povećanjem koncentracije inhibitora (Slika 14 i 15). Preživljenje karcinomskih stanica nakon izlaganja Inhibitoru B, nakon 72 sata i u svim koncentracijama, slično je preživljenju nakon izlaganja Inhibitoru A.

Slika 14. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru B

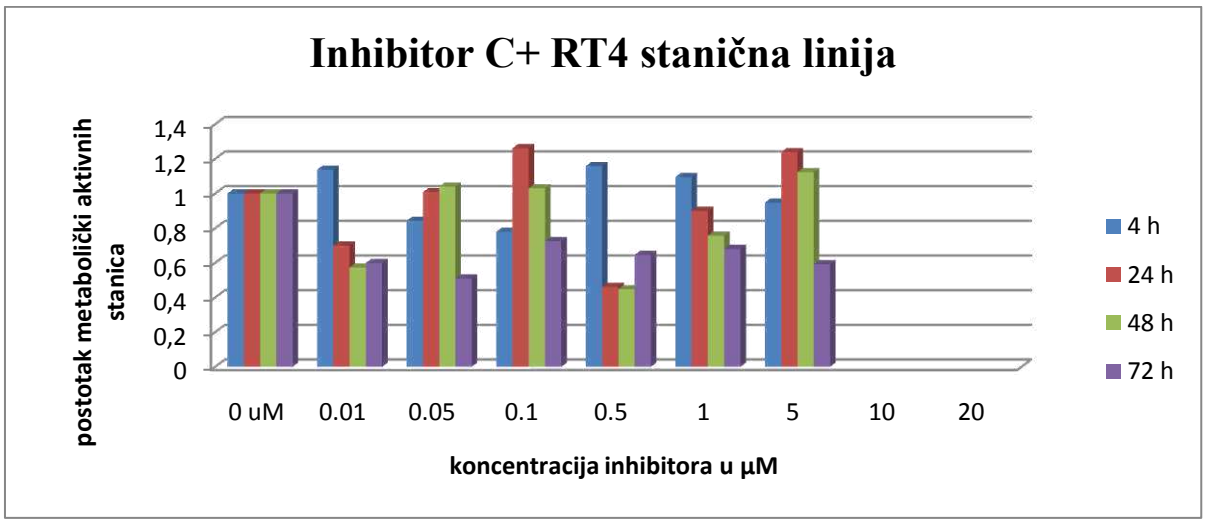


Slika 15. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru B

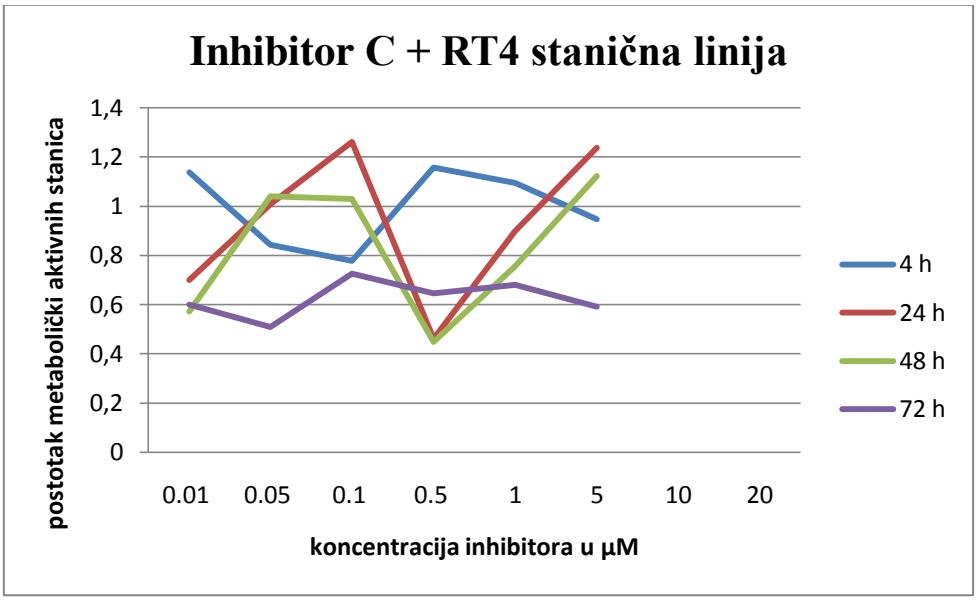


Karcinomske stanice RT4 karcinomske stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli nakon 4 sata djelovanja Inhibitora C u koncentraciji od 0.05, 0.1 i 5 µM (Slika 16 i 17). Nakon 24 i 48 sati stanice pokazuju smanjeno preživljenje u koncentraciji od 0.01, 0.5 i 1 µM (Slika 16 i 17). Smanjeno preživljenje stanica nakon 72 sata se vidi pri svim koncentracijama Inhibitora C (Slika 16 i 17).

Slika 16. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru C



Slika 17. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja Inhibitoru C



5 RASPRAVA

Karcinom mokraćnog mjehura zauzima sedmo mjesto u svijetu po učestalosti karcinoma u muškaraca i sedamnaesto u žena (1). Uočava se da se tumori urotela razvijaju dvama, velikim dijelom neovisnim, putevima koji se odnose na papilarne (neinvazivni) i nepapilarne (invazivne) tumore. Papilarni tumori zbog učestalog recidiviranja ostvaruju značajan trošak u kliničkom zbrinjavanju i predstavljaju javno zdravstveni problem. Mišićno-invazivni tumori velikim dijelom razviju rezistenciju na kemoterapiju i potom brzom progresijom završavaju fatalno. Stoga bi identifikacija molekularnih mehanizama u svrhu prevencije recidiva i progresije u mišićno-invazivne tumore bila od velike važnosti (18).

Proučavanje molekularnih biljega je od interesa zbog potrebe za neinvazivnim, osjetljivijim i jeftinijim tehnikama nego što su endoskopske u probiru, ranoj dijagnostici i praćenju karcinoma mokraćnog mjehura. Uz to, dok citologija urina pomaže u detektiranju tumora visokog gradusa, njena je osjetljivost za tumore niskog gradusa od 4% do 31%. Također, biljezi biološkog i kliničkog ponašanja su nužni za bolje otkrivanje stadija, prognoze te terapijskog pristupa i praćenja odgovora na terapiju (13).

Genomska nestabilnost je obilježje karcinomskih stanica (25). Neuspješni popravak DNA oštećene unutarstaničnim ili izvanjskim stresom može rezultirati genomskom nestabilnošću koja se očituje velikim kromosomskim preraspodjelama (26). Mutacije koje remete DNA replikaciju su značajan uzrok velikih kromosomskih preraspodijela (27).

Istraživanje u kvasca pokazuje da pogreške u RNA biogenezi mogu biti velika prijetnja genomskom integritetu, a RNazaH djeluje kao čuvar genoma. To se objašnjava time da povećana ekspresija RNazeH suzbijanjem RNA-DNA hibrida sprječava nastanak delecija i lomova prilikom pogrešaka u transkripciji, kao što je mutacija čimbenika uključenog u elongaciju i nedostatak faktora prekrajanja. Pri tome je u studiji koja je ispitivala ulogu RNazeH u supresiji RNA-DNA hibrida i genomske nestabilnosti ustanovljeno da inaktivacija oba tipa RNazeH povećava velike kromosomske preraspodjele, slično kao i najteže mutacije u biogenezi mRNA (27).

Inaktivacija RNazeH2 dovodi do nakupljanja ribonukleotida, koji mogu usporavati replikacijske rašlje ili hidrolizirati na DNA lancu, što može rezultirati pucanjem DNA lanaca (23). Također se otkrilo da je RNazaH2 izraženija u stanicama koje se aktivno dijele, a ekspresija korelira sa ekspresijom proliferacijskog biljega Ki67 (23).

Whaba i sur. zaključuju da su poremećena RNA biogeneza i funkcija RNazeH važni za očuvanje genomske strukture i da predstavljaju mogući molekularni mehanizam pojave kromosomskih preraspodjela povezanih s karcinomom. Također sama genomska nestabilnost može uzrokovati promjene u transkripciji koje su potrebne za progresiju karcinoma (27).

Identifikacija specifičnih genomskih alteracija može omogućiti razvoj specifičnog terapijskog pristupa svakom pacijentu (19). Opisane su neke nove potencijalne mete za intervencije u liječenju urotelnih tumora. Mutacije u receptoru tirozin kinaza (RTK)-RAS-RAF, fosfoinozitid 3-kinaza (PI3K)/AKT/"mammalian target of rapamycin" (mTOR) puteva i regulatora G1-S progresije staničnog ciklusa kao što je TP53 i RB1 se najčešće navode. Također, potencijalne genske terapijske mete koje se javjaju u velikom broju urotelnih tumora su su FGFR3 mutacije, PTEN delecije te FGFR1, CCND1 i MDM2 amplifikacije (19).

Studija koja je tražila nove terapijske mete za karcinome upućuje na važnost uloge RNA u genskoj ekspresiji preko RNA interferencije, formiranja heteokromatina, DNA metilacije i histonske modifikacije te da bi RNA regulirajući enzimi mogli predstavljati novu klasu enzima kao potencijalne terapijske mete. Pronđen je pojačan izražaj RNazeH2A, katalitičke podjedinice RNazeH2 kompleksa, u mezenhimalnim matičnim stanicama nakon inaktivacije pRb-a i u potpuno transformiranim mezenhimalnim matičnim stanicama (koje su kroz pet koraka, uključujući korak inaktivacije pRb-a, došle do potpune transformacije). U ljudskim fibroblastima, koji su transformirani na isti način, je također pronađen značajan pojačani izražaj RNazeH2A. Također, pojačani se izražaj RNazeH2A nalazi u raznim vrstama karcinoma uključujući karcinom mokraćnog mjehura, mozga (multiformni glioblastom, oligodendrogliom i oligoastocitom), dojke, glave i vrata te leukemijama (T i B staničnim akutnim limfoblastičnim leukemijama i akutnim mijeloidnim leukemijama), melanomima i seminomima. Gen za RNazuH2A je identificiran kao jedan od 2 posto gena koji pokazuju značajnu sličnost s profilima terapijskih meta karcinoma već poznatog uspijeha. K tome, izbacivanje RNazeH2A pomoću tranzitne siRNA i shRNA u transformiranim mezenhimnim matičnim stanicama je razultiralo značajnim smanjenjem broja njihovih kolonija. Ovo je istraživanje je dokaz da RNazaH2A može imati ulogu u transformaciji stanica (28).

Iz navednog se vidi koji su sve pozitivni ishodi koje bi donijela uspješna inhibicija RNazeH2A i posljedično smanjeno preživljenje stanica karcinoma mokraćnog mjehura. Ovo istraživanje pokazuje da *in vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 i RT4 stanične linije inhibitorima RNazeH2A, Inhibitoru A, Inhibitoru B i Inhibitoru C može dovesti do smanjenog preživljenja tih stanica. Smanjeno preživljenje nije uočeno jednako pri svim koncentracijama i u različitim vremenima izloženosti djelovanju inhibitora, a tamo gdje je pronađeno kreće se u rasponu od manje od 1% do više od 80%. Time je potvrđena hipoteza i ostvaren cilj istraživanja. Sličan pokušaj inhibiranja RNazeH2A nije pronađen. Kako je potvrđen uspjeh djelovanja inhibitora u pojedinim koncentracijama i vremenu djelovanja *in vitro*, sljedeći korak u ispitivanju terapijskog učinka ovih inhibitora na stanice karcinoma

mokraćnog mjehura je ispitivanje *in vivo* na modelu karcinoma mokraćnog mjehura u životinja

6 ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje pokazuje da *in vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 i RT4 stanične linije inhibitorima RNazeH2A, Inhibitoru A, Inhibitoru B i Inhibitoru C dovodi do smanjenog preživljenja tih stanica. Time je potvrđena hipoteza istraživanja. Smanjeno preživljenje nije pronađeno jednako pri svim koncentracijama i vremenima izloženosti djelovanju inhibitora, a tamo gdje je pronađeno kreće se u rasponu od manje od 1% do više od 80%. Smanjenje preživljenja nije uvijek bilo u razmjeru s povećanjem koncentracije inhibitora.

7 LITERATURA

1. Kakehi Y, Hirao Y, Kim WJ, Ozono S, Masumori N, Miyanaga N, et al. Bladder Cancer Working Group report. Japanese journal of clinical oncology. 2010;40 Suppl 1:i57-64..

2. Jankovic S, Radosavljevic V. Risk factors for bladder cancer. Tumori. 2007;93(1):4-12.

3. Vrdoljak E, Krajina Z, Šamija M. Klinička onkologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 146-9.

4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108.

5. Gamulin M, Ruzic IP, Grgic M, Jazvic M, Solaric M, Zahirovic D, et al. [Clinical guidelines for diagnosing, treatment and monitoring patients with bladder cancer--Croatian Oncology Society and Croatian Urology Society, Croatian Medical Association]. Lijecnicki vjesnik. 2013;135(11-12):292-7.. Klinicke upute za dijagnostiku, lijecenje i pracenje bolesnika oboljelih od raka mokracnog mjehura Hrvatskoga Onkolokog Drustva i Hrvatskoga Uroloskog Drustva Hrvatskoga Lijecnickog Zbora.

6. Šitum M, Gotovac J i sur. Urologija. Drugo, dopunjeno i izmijenjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 124-9.

7. Clark PE, Agarwal N, Biagioli MC, Eisenberger MA, Greenberg RE, Herr HW, et al. Bladder cancer. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. 2013;11(4):446-75.

8. Ćorić M, Damjanov I. Bolesti bubrega i mokraćnog sustava. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, urednici. Patologija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 694-8.

9. Roychowdhury M. Bladder. Urothelial nonneplastic lesions. WHO / ISUP classification (2004). PathologyOutlines.com, Inc.; 2016 [cited 2016].

10. Schaal C, Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. Molecular cancer research : MCR. 2014;12(1):14-23

11. Kogevinas M, 't Mannetje A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez CA, Vineis P, et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. Cancer Cause Control. 2003;14(10):907-14.

12. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, et al. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: A case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. Cancer Epidem Biomar. 2000;9(5):461-7.

13. Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, Diagnosis, and Molecular Markers. European urology. 2013;63(1):4-15.

14. Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Kleihues P, Sobin L, ur. Lyon: IARC Press; 2004. str. 94-5.

15. Witjes JA, Comperat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebret T, et al. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2013 Guidelines. European urology. 2014;65(4):778-92.

16. Burger M, Oosterlinck W, Konety B, Chang S, Gudjonsson S, Pruthi R, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. European urology. 2013;63(1):36-44.

17. Smith R, Hill-Kayser C. All About Bladder Cancer. Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania; 2016 [updated anuary 20, 2016]; Dostupno na: http://www.oncolink.org/types/article.cfm?c=588&id=9464.

18. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. Urol Oncol-Semin Ori. 2010;28(4):429-40.

19. Bellmunt J, Orsola A, Leow JJ, Wiegel T, De Santis M, Horwich A. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2014;25 Suppl 3:iii40-8.

20. Amin MB, McKenney JK, Paner GP, Hansel DE, Grignon DJ, Montironi R, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Pathology. European urology. 2013;63(1):16-35.

21. Cheng L, Davison DD, Adams J, Lopez-Beltran A, Wang LS, Montironi R, et al. Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. Crit Rev Oncol Hemat. 2014;89(1):73-111.

22. Rychlik MP, Chon H, Cerritelli SM, Klimek P, Crouch RJ, Nowotny M. Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. Molecular cell. 2010;40(4):658-70.

23. Reijns MA, Rabe B, Rigby RE, Mill P, Astell KR, Lettice LA, et al. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. Cell. 2012;149(5):1008-22.

24. Figiel M, Chon H, Cerritelli SM, Cybulska M, Crouch RJ, Nowotny M. The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutieres syndrome defects. The Journal of biological chemistry. 2011;286(12):10540-50.

25. Smith S, Hwang JY, Banerjee S, Majeed A, Gupta A, Myung K. Mutator genes for suppression of gross chromosomal rearrangements identified by a genome-wide screening in Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(24):9039-44.

26. Banerjee S, Sikdar N, Myung K. Suppression of gross chromosomal rearrangements by a new alternative replication factor C complex. Biochemical and biophysical research communications. 2007;362(3):546-9.

27. Wahba L, Amon JD, Koshland D, Vuica-Ross M. RNase H and Multiple RNA Biogenesis Factors Cooperate to Prevent RNA:DNA Hybrids from Generating Genome Instability. Molecular cell. 2011;44(6):978-88.

28. Flanagan JM, Funes JM, Henderson S, Wild L, Carey N, Boshoff C. Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets. Mol Cancer Ther. 2009;8(1):249-60.

29. Riss T, Hook B, Duellman S. Evaluation of real time cell viability assays multiplexed with other methods. Toxicol Lett. 2015;238(2):S179-S80.

8 SAŽETAK

Cilj: Ispitati pojedinačno djelovanje inhibitora RNazeH2A, pod nazivima Inhibitor A, Inhibitor B i Inhibitor C, na karcinomske stanice T24 i RT4 stanične linije. Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih stanica T24 i RT4 staničnih linija svakom pojedinačnom inhibitoru smanjiti preživljenje karcinomskih stanica, to jest broj karcinomskih stanica će biti manji u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje nisu izložene inhibitorima.

Materijali i metode: Ispitivanje djelovanja inhibitora se provodilo na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura T24 i RT4 stanične linije. Citotoksičnost inhibitora se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata MTT testom.

Rezultati: Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli:

- za oko 25 % nakon 48 i 72 sata djelovanja Inhibitora A u najvećoj koncentraciji, dok je pri drugim koncentracijama i vremenu izloženosti smanjenje postotka puno manje, a nakon 4 sata ne postoji.
- za oko 30% nakon 24 sata djelovanja Inhibitora B u četiri najviše koncentracije, a nakon 48 i 72 sata, u pet najviših koncentracija, za,najviše, oko 80 %.
- za najviše 10 % nakon 24 sata djelovanja Inhibitora C u dvije najviše koncentracije te za najviše oko 25% nakon 48 sati djelovanja Inhibitora C u tri najviše koncentracije, a nakon 72 sata za,najviše oko 40 % samo u nekim koncentracijama

Karcinomske stanice RT4 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli:

- za oko 30 % nakon 24 sata djelovanja Inhibitora A samo u jednoj koncentraciji te za, najviše oko 25 % nakon 48 sati, a nakon 72 sata pri svim koncentracijama inhibitora, za oko 30 do 50 %. Ne uočava se razmjerno smanjenje preživljenja povećanjem koncentracije inhibitora.
- za najviše oko 15 % nakon 4 sata djelovanja Inhibitora B samo u nekim koncentracijama te za najviše oko 55 % i 60 % nakon 24 i 48 sati, a nakon 72 sata u svim koncentracijama inhibitora za oko 30 do 50 %. Ne uočava se razmjerno smanjenje preživljenja povećanjem koncentracije inhibitora.
- za najviše oko 20 % nakon 4 sata djelovanja Inhibitora C samo u nekim koncentracijama te za oko 10 do 55 % nakon 24 i 48 sati samo u nekim

koncentracijama, a nakon 72 sata za oko 30 do 50 % u svim koncentracijama. Ne uočava se razmjerno smanjenje preživljenja povećanjem koncentracije inhibitora.

Zaključci:

Ovo istraživanje pokazuje da in vitro izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 i RT4 stanične linije inhibitorima RNazeH2A, Inhibitoru A, Inhibitoru B i Inhibitoru C dovodi do smanjenog preživljenja tih stanica. Smanjeno preživljenje nije pronađeno jednako u svim koncentracijama i vremenima izloženosti djelovanju inhibitora, a tamo gdje je pronađeno kreće se u rasponu od manje od 1 % do više od 80 %. Smanjenje preživljenja nije uvijek bilo u razmjeru s povećanjem koncentracije inhibitora.

9 SUMMARY

Diploma Thesis Title: Determination of the RNaseH2A inhibitors effects on bladder cancer cells

Objectives: To investigate separately effects of RNaseH2A inhibitors, called Inhibitor A, Inhibitor B and Inhibitor C, on the cancerous cells of the T24 and RT4 cell line. The assumption is that exposure of cancer cells of the T24 and RT4 cell lines to each inhibitor will reduce the survival of cancer cells, that is, the number of cancer cells will be lower than in the control group of cells that were not exposed to the inhibitor.

Material and Methods: Testing of inhibitors was carried out on bladder cancer cells of RT4 and T24 cell line. The cytotoxicity of the inhibitor was determined after 4, 24, 48 and 72 hoursby MTT assay.

Results: Cancerous cells of the T24 cell line show decreased survival compared to untreated controls:

- for about 25 % after 48 and 72 hours of the exposure to the Inhibitor A at highest concentration, while at other concentrations and time of exposure, the decrease in percentage is much weaker, and after 4 hours does not exist.
- for about 30 % after 24 hours of the exposure to the Inhibitor B at four highest concentrations, and after 48 and 72 hours at the five highest concentration for, at most, about 80 %.
- for 10 % after 24 hours of the exposure to the Inhibitor C at the two highest concentrations; for, at most, about 25 % after 48 hours at three highest concentrations, and after 72 hours for, at most, about 40 % at some concentrations.

Cancerous cells of the RT4 cell line show decreased survival compared to untreated controls:

- for about 30 % after 24 hours of the exposure to the Inhibitor A, only at one concentration; for, at most, about 25 % after 48 hours, only at some concentrations, and and after 72 hours, at all concentrations, for about 30 to 50 %. A reduction in proportion of survival by increasing the concentration of the inhibitor was not shown.
- for, at most, about 15 % after 4 hours of the exposure to the Inhibitor B activity, at some concentrations; for, at most, about 60 % after 24 hours and for 30 to 50 % after 72 hours at all concentrations of inhibitor. A reduction in proportion of survival by increasing the concentration of the inhibitor was not shown.

- for, at most about 20 % after 4 hours of the exposure to the Inhibitor C, in some concentrations; for about 10 to 55 % after 24 and 48 hours, in some concentrations, and after 72 hours for from about 30 to 50 % at all inhibitor concentrations. Here also a reduction in proportion of survival by increasing the concentration of the inhibitor was not shown.

Conclusion: This study demonstrates that *in vitro* exposure of bladder cancer cells of T24 and RT4 cell line to RNaseH2A inhibitors, Inhibitor A, Inhibitor B and Inhibitor C leads to decreased survival of these cells. Decreased survival were not found in every concentration and time of exposure to the inhibitor, and where found it was ranging from less than 1 % to over 80 %. Reduction in survival was not always in proportion to the increasing concentration of inhibitor.

10 ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Senka Brajičić
Datum rođenja: 21.11.1991.

Adresa: Don Petra Cara 36, Podstrana, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

e-mail: sbrajicic@gmail.com

Obrazovanje:

- 1998. – 2006. Osnovna škola "Josip Pupačić", Omiš, Republika Hrvastska
- 2006. – 2010. Srednja škola "Jure Kaštelan", smjer: opća gimnazija, Omiš, Republika Hrvatska
- 2010. – 2016. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, smjer: medicina

Materinski jezik

Hrvatski

Strani jezici

engleski (aktivno) i talijanski