Izražaj markera autofagije i nekroptoze u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura miša

Tokalić, Ružica

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:171:276000

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

Ružica Tokalić

Izražaj markera autofagije i nekroptoze u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura miša

Diplomski rad

Akademska godina: 2015/2016

Mentor:

Prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

U Splitu, lipanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ružica Tokalić

Izražaj markera autofagije i nekroptoze u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura miša

Diplomski rad

Akademska godina: 2015/2016

Mentor:

Prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

U Splitu, lipanj 2016.

Kazalo

1.	**UVOD**	**1**
1.1.	Anatomija i histologija mokraćnog mjehura	2
1.2.	Patologija i klasifikacija tumora mokraćnog mjehura	2
1.3.	Epidemiologija i javnozdravstveni značaj tumora mokraćnog mjehura	3
1.4.	Dijagnostika i terapija	4
1.5	Modeli tumora mokraćnog mjehura	5
1.6	Autofagija	6
1.6.1	Beclin 1	8
1.6.2	Atg5	9
1.6.3	LC3A	9
1.6.4	p62	10
1.7	Nekroptoza	10
1.7.1	Ripk3f	12
2.	**HIPOTEZA**	**13**
3.	**MATERIJALI I METODE**	**15**
3.1	Uzorci	16
3.2	Postupak izolacije RNA iz tkiva i sinteza cDNA	16
3.3	Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	17
3.4	Obrada podataka	18
4.	**REZULTATI**	**19**
5.	**RASPRAVA**	**25**
6.	**ZAKLJUČCI**	**28**
7.	**LITERATURA**	**30**

8. SAŽETAK..... 40

9. SUMMARY..... 42

10. ŽIVOTOPIS..... 44

Popis kratica

ATG-5	Eng. autophagy related gene 5; gen vezan uz autofagiju 5
BBN	N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin
BCG	Bacillus Calmette–Guérin
BECN1	Gen za Beclin 1
CT	Eng. computed tomography; kompjuterizirana tomografija
DNA	Eng. Deoxyribonucleic acid; deoksiribonukleinska kiselina
MM	Mokraćni mjehur
MR	Magnetska rezonanca
RIP	Eng. receptor interacting protein; protein koji komunicira s receptorom
RNA	Eng. Ribonucleic acid; ribonukleinska kiselina
RT-PCR	Eng. Real time – polymerase chain reaction; lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu
TNF-α	Eng. Tumor necrosis factor α; Čimbenik nekroze tumora α
TRAIL	Eng. TNF-related apoptosis-inducing ligand; ligand koji inducira apoptozu povezanu sa čimbenicima nekroze tumora
TUR	Transuretralna endoskopska resekcija

1. UVOD

1.1 Anatomija i histologija mokraćnog mjehura

Mokraćni mjehur (lat. *vesica urinaria*; MM) je šuplji mišićni organ smješten u subperitonealnom vezivnom prostoru male zdjelice (1). Anatomski se dijeli na bazu (lat. *fundus vesicae*), vrat (lat. *cervix vesicae*), tijelo (lat. *corpus vesicae*) i vrh (lat. *apex vesicae*) (2). Karakterizira ga mogućnost promjene volumena te služi kao privremeni rezervoar urina, a njegov položaj, oblik i veličina ovise o količini urina koju sadrži (3). Volumen mokraćnoga mjehura je oko 500 mL, a nagon na mokrenje se javlja pri 300 mL (1). Položaj ovisi i o dobi i spolu, pa je tako u žena smješten ispred prednje stijenke rodnice, a u muškaraca ga od rektuma odvaja rektovezikalna udubina i ispod toga sjemenski mjehurići i sjemenovod (2). U novorođenčadi i djece do 6 godina u cijelosti je smješten u trbušnoj šupljini u praznom stanju, a kasnije se spušta u malu zdjelicu (3).

U mokraćnom mjehuru postoji ekstrinzični i intrinzični živčani sustav. Simpatičke niti dolaze iz segmenata Th11-L2. Parasimpatičke niti ekstrinzičnog sustava dolaze iz segmenata S2-S4 i djeluju konstrikcijski na *musculus detrusor*, potičući tako mokrenje (1).

Mikroskopski, stijenka mokraćnog mjehura ima tri sloja. To su adventicija, sloj mišića i sluznica. Neki autori navode da stijenka ima četiri dijela i dijele sluznicu na mukozu i submukozu. Adventicija je rahlo tkivo koje je djelomično pokriveno peritonejem. Mišićni sloj je dobro razvijen, a mišićna vlakna idu u svim smjerovima, sve dok se ne približe vratu mokraćnog mjehura, gdje se jasno razlikuju 3 sloja. Sluznica ima brojne nabore koji omogućavaju maksimalnu rastegljivost uz uštedu prostora (2, 4). Epitel mokraćnog mjehura je prijelazni i naziva se urotel. Prijelazni epitel prekriva većinu stijenki mokraćnog sustava, od bubrega do proksimalnih dijelova mokraćne cijevi. U mlohavom stanju sastoji se od 5 ili 6 slojeva stanica, a kada je epitel rastegnut, ima samo 3-4 sloja stanica. Karakterizaju ga površinske stanice u obliku debelih ploča, koje katkad zovu stanicama nalik kišobranu. Takve stanice čine osmotsku barijeru i služe zaštiti ostalog tkiva od hipertoničnog i mogućeg toksičnog djelovanja urina. Isto tako, takav epitel omogućava i rastezanje mjehura kada količina urina u mokraćnom mjehuru poraste (4).

1.2 Patologija i klasifikacija tumora mokraćnog mjehura

Tumori mokraćnoga mjehura značajan su uzrok morbiditeta i mortaliteta te se, prema tome, ubrajaju među najvažnije novotvorine ljudskog tijela (5). Maligni tumori mokraćnoga

mjehura nastaju neoplastičnom transformacijom urotela u više od 90% slučajeva, pa se makroskopski uglavnom klasificiraju kao urotelni karcinomi ili karcinomi prijelaznog epitela (5). Ostali tipovi karcinoma mokraćnog mjehura uključuju skvamozni i adenokarcinom (6).

Procjena stupnja proširenosti karcinoma MM temelji se na TNM (eng. *tumor, lymph nodes, metastasis*) klasifikaciji Američkoga udruženja za rak (*American Joint Committee on Cancer*, AJCC). Prognoza karcinoma MM ovisi o kliničkim, histološkim i molekularnim parametrima. Određivanje kliničkog stadija uključuje bimanualnu palpaciju tumora nakon transuretralne endoskopske resekcije i slikovnu dijagnostiku (CT, MR) za procjenu proširenosti tumora izvan mokraćnog mjehura. Zahvaćenost limfnih čvorova ima značajnu prognostičku vrijednost u procjeni rizika recidiva tumora i ukupnog preživljenja pacijenata. Molekularni parametri od važnosti u prognozi ishoda karcinoma MM uključeni su u regulaciju staničnog ciklusa, stanični rast i angiogenezu. Neinvazivni tumori često imaju promjene na kromosomu 9, posebice deleciju kratkog kraka, dok su tumori visokog stupnja zloćudnosti povezani sa gubitkom heterozigotnosti kromosoma 17, 14, 5 i 3 (7).

1.3 Epidemiologija i javnozdravstveni značaj tumora mokraćnog mjehura

Karcinom MM je značajan javnozdravstveni problem, s visokom prevalencijom, smrtnošću, utjecajem na kvalitetu života za oboljele i njihove obitelji te visokim troškovima liječenja (8). Prema preliminarnim podacima Registra za rak, u Republici Hrvatskoj 2014. godine, karcinom mokraćnog mjehura je 5. najčešći tumor u muškaraca i zauzima 7% svih novodijagnosticiranih slučajeva zloćudnih tumora (9). U svijetu, karcinom MM nalazi se na 7. mjestu u muškaraca i na 17. mjestu po učestalosti u žena. Svake godine, karcinom MM se novodijagnosticira u otprilike 110 500 muškaraca i 70 000 žena, a od njega umire 38 200 u Europskoj uniji i 17 000 u SAD-u godišnje (10). Zloćudni tumor MM jedna je od češćih malignih bolesti i generira visoke troškove liječenja. Procjenjuje se kako je u SAD-u 2010. godine potrošeno 4 milijarde dolara na liječenje raka MM, a ti bi troškovi do 2020. godine mogli narasti na 5 milijardi dolara (11).

Pušenje je prepoznato kao najvažniji rizični čimbenik i zaslužno je za oko 50% tumora MM (12). Također, čini se da je prestanak pušenja povezan s boljim ishodima u liječenju karcinoma MM (13). Ipak, svijest o uzročnoj povezanosti pušenja i karcinoma MM još uvijek ne postoji, čak ni među samim pacijentima liječenim od karcinoma MM (14). Osim

pušenja, značajan čimbenik rizika u nastanku karcinoma MM je i izloženost različitim kemikalijama na radnom mjestu, primjerice - aromatskim aminima, policikličkim i kloriranim ugljikovodicima. Smatra se da je 20% svih karcinoma MM uzrokovano takvom izloženošću, najčešće prilikom rada u industrijskim postrojenjima obrade boja, metala i nafte (10). Okolišni čimbenici također su važni, naročito na područjima pogođenima industrijskim zagađenjem (15). Od ijatrogenih čimbenika, povećan rizik za razvoj karcinoma MM uzrokuje terapija ciklofosfamidom, ifosfamidom i radioterapija zdjelice (16). Na području Afrike i Srednjeg istoka značajan čimbenik rizika je urogenitalna shistosomijaza (17). Osim navedenih, čini se da je i zaseban čimbenik rizika u muškaraca i pretilost, odnosno metabolički sindrom (18). U porastu je i prepoznavanje utjecaja genetskih čimbenika na razvoj tog karcinoma (10).

1.4 Dijagnostika i terapija

Glavni simptom karcinoma MM je nalaz krvi u urinu koji je rezultat bezbolnog krvarenja iz mokraćnog mjehura, te je prisutno u 85% bolesnika. Krvarenje može biti vidljivo golim okom (makrohematurija), ili potvrđeno laboratorijskim nalazom urina (mikrohematurija). Osim hematurije, mogu postojati i poremećaji mokrenja kao što su disurije, polakisurije i urgencije (19). Znakovi lokalnog širenja tumora su hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Kod metastatske bolesti javljaju se simptomi povezani uz sijela presadnica. Karcinom MM najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća, i u kosti.

Bolesnicima s hematurijom potrebno je napraviti intravensku urografiju i cistoskopiju (20). Cistoskopija je zlatni standard u dijagnostici tumora MM (21). Korištenjem različitih fluorescentnih spojeva tijekom cistoskopije može se dodatno povećati njena dijagnostička vrijednost (22). Citološki pregled urina pomoć je u dijagnostici, a istraživanja pokazuju kako ima visoku specifičnost, ali ograničenu osjetljivost (23). Zadnjih je godina došlo do razvoja različitih molekularnih dijagnostičkih tehnika koje su nešto osjetljivije od citološkog pregleda urina, ali još nisu uključene u uobičajene dijagnostičke preporuke raka MM (24). Osim navedenih, u dijagnostici raka MM koriste se i različite tehnike slikovne dijagnostike (ultrazvuk, CT, intravenska urografija) (25). Za procjenu proširenosti bolesti koriste se MSCT ili MR trbuha i male zdjelice te rendgenska snimka pluća (20).

Primarni oblik liječenja površinskog raka MM je transuretralna endoskopska resekcija (TUR) (20). TUR je ujedno i dijagnostička metoda, s ciljem otkrivanja karcinoma *in situ* (19). Ponavljanje postupka je indicirano radi optimalne kontrole bolesti (26), a u terapiji se uspješno koristi i intravezikalna instilacija Bacillus Calmette–Guérin (BCG) cjepiva jer značajno smanjuje recidiv bolesti i njenu progresiju (19, 27). Čini se da terapija BCG-om djeluje potičući nespecifične elemente imunosnog sustava, a terapija BCG-om djeluje i u bolesnika s visokim gradusom bolesti (28). Nakon TUR-e moguće je primijeniti i jednu dozu kemoterapeutika, npr. doksorubicin (20). Ukoliko se primijeni unutar 24 sata od TUR-a, intravezikalna primjena smanjuje ponovno javljanje tumora (29). Intravezikalna imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva, a zajednička primjena dovodi do dodatnog poboljšanja ishoda liječenja (30).

Metoda izbora u liječenju mišićno invazivnog tumora urotela, kao i adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma jest radikalna cistektomija (19). Svi su invazivni karcinomi mokraćnog mjehura visokog stupnja zloćudnosti (20). Primjena cisplatine prije operacije doprinosi preživljenju (31, 32). U naročito motiviranih bolesnika, moguće je pokušati s trimodalnom terapijom (TUR uz kemoterapiju i radioterapiju) radi očuvanja funkcije MM (33).

1.5 Modeli tumora mokraćnog mjehura

Razvoj novih lijekova u istraživanju tumora MM nužan je i zahtijeva i *in vivo* i *in vitro* pristup (34). Tijekom zadnjih desetljeća razvijen je niz genetski izmijenjenih mišjih modela karcinoma MM, s različitim delecijama ili mutacijama ključnih supresorskih gena ili onkogena. Tradicionalno su razvijeni mišji modeli karcinoma MM koristili ili ortotopski pristup ili kemijsku karcinogenezu. Kasnije su razvijeni i genetski modificirani miševi s ciljem imitiranja humanih tumora na molekularnoj razini.

Ortotopski pristup u razvoju miša s karcinomom MM je ili implantacija stanica ljudskog karcinoma MM u imunodeficijentnog miša (ksenograft) ili implantacija mišjih stanica tumora MM imunokompromitiranom mišu istog soja (singenični model). Dvije stanične linije tumora MM koje se najčešće koriste su MB49 stanična linija s mutacijom K-ras gena i MBT-2 stanična linija s mutacijom p53 gena. Nedostatak ksenograftnog modela je

nemogućnost procjene imunološkog odgovora u imunodeficijentnog domaćina, dok je kod singeničnog modela problem u varijabilnoj učestalosti uspješne implantacije (35).

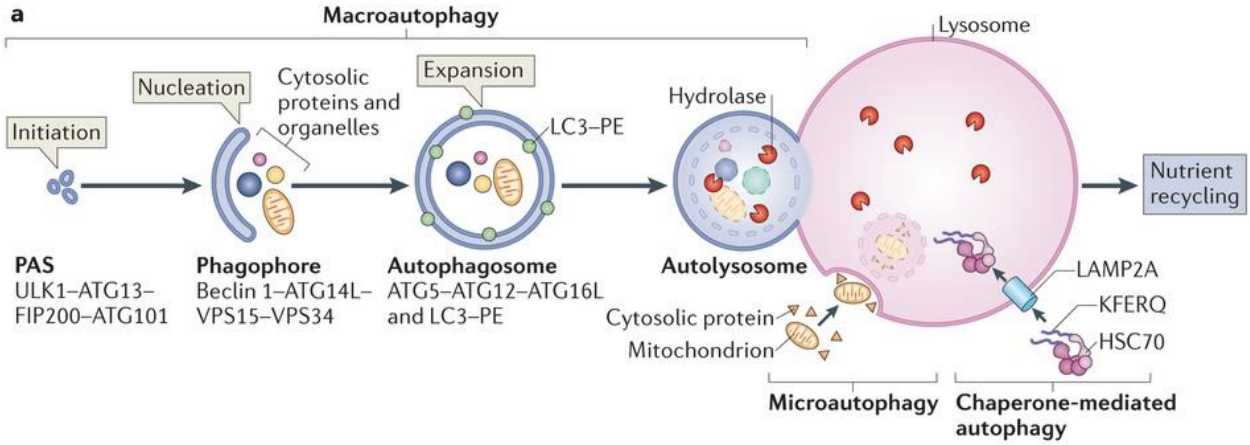
Najčešće korišteni kemijski karcinogeni su N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin (BBN), N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]formaldehid (FANFT) i N-metil-N-nitrosiureja (MNU). Ukupna doza ovih karcinogena ima veći učinak kada se primjenjuje višestrukim doziranjem tijekom nekog vremenskog perioda (35). BBN se primjenjuje u vodi za piće, a unatoč sustavnom djelovanju, čini se da su stanice urotela naročito osjetljive. BBN je naročito važan u istraživanju raka MM jer je sličan karcinogenima iz duhanskog dima, koji su već spomenuti kao važan čimbenik u razvoju raka MM u ljudi. Ovisno o modelu, spektar poremećaja koje uzrokuje BBN je širok, ali veoma sličan poremećajima koji postoje u ljudi. BBN djeluje mutageno na gene kao što su p53, RAS i H19, i brojne druge (36). Atipija stanica i invazivnost nastalih tumora izravno ovise o dozi karcinogena (37).

Genetski promijenjeni miševi omogućuju istraživanje onih staničnih mehanizama čija je abnormalnost uočena u stanicama humanih karcinoma MM. Kao takvi, omogućuju istraživanje jedne ili više mutacija i međuutjecaj onkogena i/ili tumor-supresora. Brojni su genetski modificirani modeli raka MM (ovisno o načinu uzrokovanja mutacije, ili cilja takve manipulacije) a glavni im je nedostatak manja stanična heterogenost u usporedbi s ljudskim stanicama tumora, nemogućnost imitiranja etiologije u ljudi, odnosno zanemarivanje činjenice da je karcinogeneza u ljudi složen proces s višestrukim mutacijama (35).

1.6 Autofagija

Autofagija (grč. *auto;* sam + *phagos;* jesti) označava stanični proces kojim se makromolekule, proteinske nakupine te čitave stanične organele, uklanjaju i razgrađuju uz nastajanje vezikula. Taj proces degradacije važan je u normalnom staničnom razvoju, recikliranju citoplazmatskog sadržaja i održavanju homeostaze, no igra i vrlo bitnu ulogu u odgovoru stanice na stres, poput izgladnjivanja i infekcije (38). Autofagija potiče proces biološkog starenja stanice, prezentaciju antigena, štiti od genomske nestabilnosti i prevenira nekrozu, što je čini ključnom u prevenciji neurodegeneracije, autoimunih bolesti, infekcija i razvoja tumora (39). Sve to je čini citoprotektivnim mehanizmom. Međutim, dokazano je da su uz neke oblike stanične smrti prisutne autofagijske vakuole, što je dovelo do razvoja pojma "autofagijske stanične smrti", koja se ubraja u tip 2 stanične smrti, nasuprot apoptozi

kao tipu 1. Autofagija je svakako povezana sa signalnim putovima stanične smrti, apoptoze i nekroze, no način na koji se ti putovi izmjenjuju i sljubljuju ovisi o tipu stanica i smrtonosno stimulirajućem čimbeniku (40, 41). Autofagija može biti selektivna, kada stanice razgrađuju ostarjele i nefunkcionalne organele, i neselektivna, što je češće u fazama izgladnjivanja stanice (38).



Slika 1. Autofagija je proces koji se sastoji od nekoliko koraka: inicijacije, nukleacije, širenja u cjeloviti vezikul i konačne razgradnje odabranih tvari. U svakom od tih koraka djeluju brojni proteini. U nastanku fagofora sudjeluje protein Beclin-1. U formiranju autofagosoma sudjeluje protein Atg5, na način da omogući elongaciju fagofora i formiranje autofagosoma. Spajanjem s lizosomom dolazi do aktivacije različitih staničnih proteaza i drugih enzima koje polimerne spojeve razgrađuju do njihovih monomera. (Preuzeto sa: http://www.nature.com/nrm/journal/v16/n8/fig_tab/nrm4024_F1.html)

Tri su definirane vrste autofagije: makroautofagija, mikroautofagija te autofagija posredovana šaperonima. Iako morfološki različite, sve dostavljaju materijal za razgradnju lizosomima. Najproučeniji oblik je makroautofagija, u procesu koje nastaje autofagosom, neovisni vezikul s dvostrukom membranom (42). Različiti podražaji induciraju aktivaciju slijeda signalnih molekula koje potaknu širenje membranske strukture u fagofor, ravnu organelu nalik Golgijevoj cisterni. On odijeli materijal za razgradnju od citoplazme i okruži ga u cjeloviti autofagosom. Fuzija autofagosoma s lizosomom omogućava katalizu sadržaja. Monomerne molekule nastale razgradnjom, poput aminokiselina, izbacuju se natrag u citosol, dostupne za ponovnu uporabu (43). Odakle je točno membranska struktura od koje nastaje

fagofor, nije najjasnije, a neka istraživanja pokazuju da njeni izvori mogu biti dijelovi mitohondrija ili endoplazmatskog retikuluma (44, 45).

Trenutno razumijevanje doprinosa autofagije patogenezi različitih bolesti posljednjih je godina obogaćeno podrobnim molekularnim opisom autofagijskih puteva, njihove regulacije i novoprepoznatih fizioloških uloga (46). Uloga autofagije u ranim i kasnijim fazama razvoja karcinoma razlikuje se. U ranim fazama karcinogeneze, autofagija ima važnu funkciju onesposobljavanja karcinomske indukcije genetske nestabilnosti i aberantnih proteinskih agregata kao i promicanja antitumorskog imunosnog odgovora. U već formiranim malignim tumorima, autofagija štiti od metaboličkog stresa uzrokovanog nedostatkom hranjivih tvari i brzom proliferacijom tumorskih stanica (47). Na taj način može tumorskim stanicama omogućiti preživljavanje u metabolički stresnom okolišu ili u odgovoru na antitumorsku terapiju (48). Djeluje li autofagija poticajno ili suprimirajuće na malignu proliferaciju, složen je problem, te ovisi o kontekstu. Tako je pokazano kako supresija autofagije u prisutnosti tumor supresora p53 inhibira tumorski rast, dok u odsutnosti p53, suprimirana autofagija više nema inhibitornog učinka (49).

Doprinos poremećene autofagije razvoju karcinoma jasno je vidljiv na primjeru gena za Beclin-1 (BECN1) na kromosomu 17q21, koji je monoalelno izbrisan u 40 do 75% slučajeva raka dojke, jajnika i raka prostate (50). Osim toga, aberantna ekspresija BECN1 u tumora je povezana s lošijom prognozom i agresivnijim ponašanjem tumora (51-53).

1.6.1 Beclin 1

Beclin 1 je poznati regulator autofagije. Iako sam nema enzimsku aktivnost, regulira proizvodnju fosfatidilinozitol-3-fosfata i, sukladno tome, daljnju regrutaciju Atg proteina potrebnih za formaciju autofagosoma (54). Otkriven je krajem 90-ih godina, u direktnoj interakciji s antiapoptotičkim proteinom B-staničnog limfoma-2 (Bcl-2) te je sukladno tome imenovan kao „*Bcl-2-interacting myosinlike coiled-coil protein*“ - Beclin 1 (55). Protein je mase 60 kDa, sadrži Bcl-2 homolognu domenu (BH3), domenu zavojite uzvojnice (CCD) te evolucijski konzerviranu domenu (ECD) (54). Iako je Beclin 1-fosfatidilinozitol-3-kinazni kompleks razreda 3 (Beclin 1-PtdIns3KC3) glavni pokretač većine autofagijskih odgovora, pojedini okidači autofagije (rezervatrol, metil-4-fenilpiridin, GX15-070/obatoclax) pokreću autofagiju neovisno o Beclinu 1 (56-58). Beclin 1 nije isključivo protein autofagije - ima multifunkcionalnu ulogu, sudjelujući u endocitozi, fagocitozi i kontroli citokineze. Svi ti procesi uključuju neki oblik vezikularne formacije i transporta (54). Njegovu važnost u

razvoju pokazalo je istraživanje Beclin 1 *knock-out* miševa, koji su umirali rano u fazi embriogeneze (59). Dio je i jedne od veza spojnica autofagije i apoptoze, točnije njene kontrole, u obliku aktivnosti Bcl-2. Bcl-2 ometa interakciju Beclina 1 i PI-3 kinaze Vsp34 i tako blokira njegovu aktivnost u početnim procesima autofagije (60, 61).

Poremećena funkcija Beclina 1, osim u karcinomima, pronađena je i u drugim patofiziološkim stanjima organizma, poput neurodegenerativnih bolesti, cistične fibroze i infektivnih bakterijskih i virusnih bolesti (54).

1.6.2 Atg5

Proces autofagije ovisi o takozvanim Atg proteinima (eng. *autophagy related protein*), kojih je do sada opisano oko 30 (62). Jedan od njih, Atg5, dio je sustava koji omogućuje elongaciju fagofora i tako formiranje autofagosoma (42). Dva konjugacijska sustava nalik ubikvitinskima, Atg5-Atg12 i LC3-PE, sudjeluju u tom procesu. Enzim nalik ubikvitinskom E1, Atg7, aktivira Atg 12. Tako aktiviran, on se prebacuje na enzim Atg10 i konačno spaja sa Atg5. Taj sustav se naposljetku spaja s Atg16L na membrani fagofora (63). Nakon stvaranja autofagosoma, kompleks Atg5-Atg12 se otpušta s membrane, što ga čini nepouzdanim markerom autofagije (64).

U *knock-out* miševa smrt nastupa u neonatalnom razdoblju, što se pripisuje disfunkcionalnoj lipofagiji u jetri, posebnom obliku autofagije u kojem se razgrađuju kapljice masti (65-67). Atg5 je nužan i u održavanju i diferencijaciji matičnih stanica u odraslih (68). Ima ulogu i u aktivaciji apoptoze. Kalpain, proteza ovisna o kalciju, razgradi Atg5, a jedan od nastalih fragmenata prelazi u mitohondrij i aktivira apoptotski put (69). Atg5 sudjeluje i u mitotičkoj katastrofi. Dokazano je kako oštećenje DNA uzrokovano nekim lijekovima, poput cisplatine i etopozida, inducira ekspresiju Atg5, koji zatim u jezgri pokreće procese mitotičke katastrofe (70). Uloga Atg5 u tumorogenezi do sada je dokazana u tumorima jetre i kože (71, 72). U oba organa, tumorigeneza je pospješena inaktivacijom Atg5, dok je u tumorima pluća njegova uloga još uvijek dvojbena (73).

1.6.3 LC3A

LC3A, protein povezan sa mikrotubulima, laki lanac 1, osnovni je dio autofagijske vakuole i pouzdani marker autofagije. Homolog je kvaščevom Atg8 (74). Postoji u dva oblika – citosolni LC3A-I i membranski LC3A-II (75). Istraživanja pokazuju kako je LC3A od ključnog značaja u tumorigenezi. Njegova epigenetska inaktivacija dokazana je u tumorima

jednjaka (76). U tumorima jajnika povezan je sa hipoksijom i lošijom prognozom, dok je u kolorektalnom tumoru njegovo nakupljanje znak dobre prognoze (74, 77).

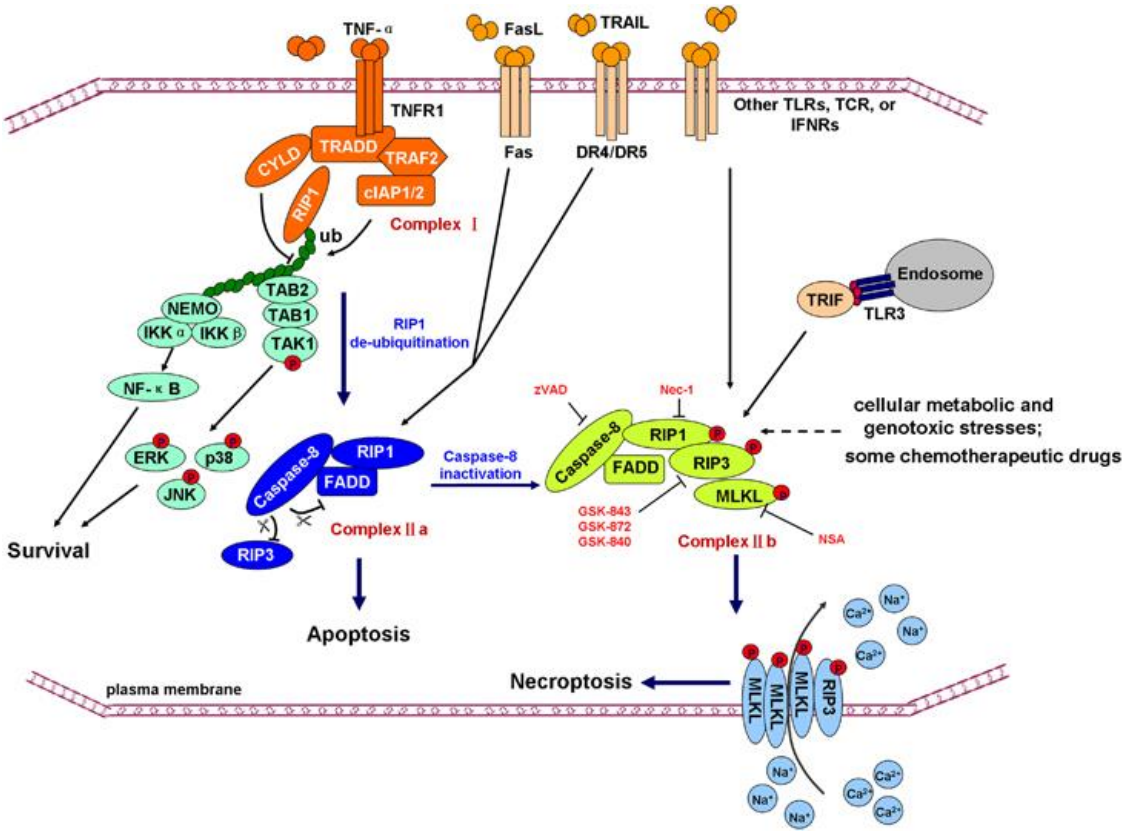
1.6.4 p62

P62 je višenamjenski protein koji potiče razgradnju poliubikvitiniranih proteinskih nakupina preko interakcije s LC3 proteinom na autofagosomu (39). Signalno je čvorište različitih unutarstaničnih procesa i sudjeluje u oksidativnom stresu (78). p62 razgrađuje se autofagijom, pa je oštećenje aufagijskog puta povezano s masivnim nakupljanjem p62 i posljedičnim stvaranjem ubikvitiniranih proteinskih nakupina (78). Čini se kako p62 također sudjeluje i u autofagiji različitih organela (79). Uloga p62 nije do kraja razjašnjena i postoje različite hipoteze o njegovom utjecaju na tumorigenezu (71). Mutacije p62 povezane su s Pagetovom bolešću, gdje takva mutacija remeti uobičajenu homeostazu kostiju zbog pretjerane aktivacije osteoklasta (80). *Knock-out* miševi bez p62 proteina su rezistentni na Ras potaknutu tumorigenezu karcinoma pluća, a istraživanja ekspresije p62 u stanicama ljudskih karcinoma pluća ukazala su i na učestalo povećanje izražaja tog proteina u adenokarcinomima i karcinomima pločastog epitela (39, 79).

1.7 Nekroptoza

Do stanične smrti može doći na nekoliko načina koji se razlikuju svojim morfološkim i biokemijskim svojstvima. Uključuju smrt putem autofagije, mitotičku katastrofu i one najproučenije, apoptozu i nekrozu (40). Donedavno se smatralo kako je nekroza nasumični i pasivni proces, no istraživanja su dovela do identifikacije reguliranog oblika nekroze, nazvanog nekroptozom (81). Nekroptoza služi kao mehanizam stanične smrti u odgovoru na iznimni stres i blokiranu apoptozu, a može se inducirati upalnim citokinima i kemoterapeuticima (82). Nekroptotične stanice morfološki nalikuju nekrotičnima – stanične organele, citoplazma i membrana rano nabubre i gubi se unutarstanični sadržaj (83). Permeabilizacija membrane dovodi do otpuštanja takozvanih *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs), molekula povezanih s oštećenjem, koje služe kao okidač snažnom imunosnom odgovoru i upali (84, 85). To je u suprotnosti sa imunosno „tišom“ apoptozom. I nekroptoza i apoptoza su inducirane istim putovima, molekulama poput tumor nekrotizirajućeg čimbenika - alfa (TNF-α), Fas liganda iz iste TNF obitelji citokina te TRAIL-a, liganda nalik TNF-u. No za razliku od apoptoze, nekroptoza ne ovisi o kaspazama.

Ima svoj zasebni signalni put koji uključuje serin-treonin kinaze RIP1 i RIP3 te protein nalik kinazi, MLKL (83).



Slika 2. Nekroptotički put može pokrenuti TNF-α preko TNF receptora, *Toll-like* receptora, T-staničnih i interferonskih receptora, kao i stanični metabolički i genomički stres te neki kemouterapeutici. RIP1-RIP3-MLKL kompleks, ili nekrosom, je ključni medijator nekroptotskog puta. Spaja receptore stanične smrti i izvršiteljne molekule i događaje. (Preuzeto s: http://www.nature.com/cdd/journal/v23/n5/fig_tab/cdd20168f1.html#figure-title)

Stimulacijom TNF receptora pokreće se put u kojem se RIP1 i RIP3 vežu, fosforiliraju i postaju nekrosom (86). Nekrosom fosforilira MLKL, koji se zatim polimerizira i translocira na membranu, gdje pokreće ulaz kalcija u stanicu i čini ključni aktivator daljnjeg slijeda nekroptoze (87).

U pokrenutom procesu stanične smrti, kaspaza 8 cijepa RIP1 i tako onemogućava nekroptozu. Kada je kaspaza 8 blokirana, bilo genetskim metodama (*knock-out*), zasebnim inhibitorima ili proteinima u odgovoru na virusnu infekciju, proces stanične smrti preusmjeri

se na nekroptotski put (88). Učinak kaspaze 8 može blokirati i dovoljno visoka razina RIP3 kinaze, što se događa pri oštećenju tkiva (89).

Tumorska rezistencija na kemoterapeutike rastući je problem, a jedan od ključnih čimbenika rezistencije je disfunkcija apoptoze. Kako se učinak velikog broja kemoterapeutika osniva na poticanju apoptoze tumorskih stanica, alternativni put smrti – nekroptoza – pruža nove opcije u potencijalnoj terapiji tumora (90, 91). Dosadašnja su istraživanja upućivala kako bi aktivacija ovog puta smrti bila korisna u tumorskoj terapiji, no posljednja saznanja upućuju na ponešto drugačiju sliku. Nekroptoza potiče upalnu proizvodnju citokina i tako održava tumorski rast više no što promovira smrt tumorskih stanica. Potiče i njihovu rezistenciju na terapiju zračenjem, a visoke razine fosforiliranog MLKL povezane su sa lošijom prognozom i preživljenjem pacijenata (92, 93).

1.7.1 RIP3

RIP3, *receptor interacting protein 3,* kinaza je iz serin treoninske obitelji. Nalazi se pretežno u citoplazmi, a kodira ju gen na 14. kromosomu (94). Čini ključni dio nekroptotskog puta formirajući nekrosom zajedno sa RIP1, te zatim aktivirajući MLKL koji inducira remećenje membranske ravnoteže (89). Do sada se smatralo kako je interakcija RIP1 i RIP3 nužna za nekroptozu, no dokazano je kako RIP3 može pokrenuti nekroptozu i neovisno o RIP1 (95). Štoviše, razina aktivnosti RIP3 jedan je od čimbenika o kojima ovisi hoće li se aktivirati nekroptotski ili apoptotski put stanične smrti (96). RIP3 ima ulogu u virusnoj infekciji organizma, sepsi, ishemijskoj reperfuziji, makularnoj denegeneraciji, alkoholnom hepatitisu i neurodegenerativnim bolestima (85, 97, 98). Ekspresija RIP3 u mnogim je tumorima snižena metilacijom, što te tumore čini otpornijima na pronekrotičke stimulanse. U nekim od tih tumora ekspresija RIP3 se mogla ponovno uspostaviti djelovanjem hipometilirajućih sredstava, poput decitabina (99). Povišena ekspresija RIP3 tumore dojke čini osjetljivijima na kemoterapeutike, a u karcinomima jednjaka RIP3 je neophodan za odgovor na terapiju cisplatinom (82, 100).

2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka provedenog istraživanja je da su procesi autofagije i nekroptoze aktivniji tijekom razvoja zloćudnih tumora mokraćnog mjehura kao dio antitumorskih odgovora organizma.

Očekuje se povećani izražaj osnovnih gena-markera autofagije i nekroptoze u zloćudno promijenjenom tkivu mokraćnog mjehura. Provedeno istraživanje testiralo je postavljenu hipotezu mjereći aktivnost gena: p62, Beclin 1, LC3A, Atg5 i Ripk3f.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorci

Za istraživanje su korišteni uzorci tkiva mokraćnog mjehura miševa C57BL/6J divljeg tipa (eng. wild type, wt) starih 6 do 8 tjedana. Podijeljeni su u 3 eksperimentalne skupine. Dvije skupine podvrgnute su akutnom odnosno kroničnom tretmanu kemikalijom N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozamin (BBN) u vodi za piće sa svrhom indukcije tumora mokraćnog mjehura. Akutna skupina bila je izložena 0,05% BBN-u tijekom 2 tjedna, dok je skupina kroničnih miševa BBN-u (0,05%) bila izložena 12 tjedana. Kontrolna skupina nije bila izložena BBN-u, bila je ujednačene dobi od 6 do 8 tjedana starosti i boravila je u istim uvjetima kao i miševi tretirani BBN-om. Životinje izložene akutnom tretmanu žrtvovane su 2 tjedna, a one izložene kroničnom tretmanu 20 tjedana nakon početka tretmana. Neposredno nakon žrtvovanja, mokraćni mjehur miša podijeljen je na dva jednaka dijela, od kojih je jedan korišten za izolaciju bioloških molekula (RNA, DNA i proteini), a drugi dio za histološku analizu kojom je potvrđena indukcija tumora BBN-om. Tkiva su netom po uzorkovanju smrznuta u tekućem dušiku do izolacije bioloških molekula.

Izražaj gena za autofagiju analiziran je u kontrolnoj skupini (N=7) i eksperimentalnoj akutnoj skupini (N=7). Izražaj gena za nekroptozu analiziran je u kontrolnoj skupini (N=10), eksperimentalnoj akutnoj (N=11) i eksperimentalnoj kroničnoj skupini (N=11).

Miševi korišteni u ovom istraživanju uzgajani su, anestezirani i žrtvovani prema europskim i hrvatskim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu, a provedeno je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta u Splitu.

3.2 Postupak izolacije RNA iz tkiva i sinteza cDNA

Ukupna RNA, DNA i proteini iz tkiva izolirani su korištenjem *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. 1 µg dobivene mRNA u 20 µL smjese preveden je u komplementarnu DNA (cDNA) koristeći *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Smjesa cDNA je razrijeđena 10 puta, u 200 µL uzorka. Iz te smjese je kasnije uzorkovano po 3 µL za svaku jažicu PCR ploče. Izolirana DNA pohranjena je na -20°C, a RNA i proteini na -80°C do daljnje obrade.

Svaka jažica na ploči koja ide u RT-PCR aparat (7500 Real Time PCR System-Applied Biosystems Foster City, CA, SAD) sadržavala je uzorak od ukupno 15 µL, od kojih je 12 µL MIX-a i 3 µL uzorka cDNA. MIX se sastojao od 3 µL RNaza/DNaza free vode, 7,5 µL SYBR Green boje, te po 0,75µL forward i 0,75 µL reverse početnice za svaki pojedinačni uzorak cDNA.

3.3 Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Lančana reakcija polimerazom *(engl. Polymerase Chain Reaction, PCR)* je laboratorijska metoda koja omogućava višestruko umnažanje određenog DNA fragmenta iz jako male količine početnog materijala, stvarajući eksponencijalno rastući broj kopija. PCR program se sastoji od 3 koraka. U prvom se uzorak zagrijava na 95°C kako bi došlo do denaturacije dvolančane DNA. Zatim se jednolančana DNA hibridizira s početnicama ili primerima – komplementarnim oligonukleotidnim lancima, u forward i reverse obliku. U trećem koraku se početnice produljuju uz pomoć enzima Taq polimeraze, koja je otporna na visoke temperature. Stvara se novi lanac prema kalupu jednolančane DNA.

Navedeno čini jedan ciklus PCR-a, na kraju kojeg se broj DNA kopija udvostruči. Za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA, što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo vrlo male količine tkiva. Tijekom PCR reakcije ponovi se 25-45 puta, pri čemu se željeni dio DNA umnoži do milijardu puta.

Kvantitativni PCR, qRT-PCR, od eng. *real time PCR*, ili lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, počiva na vezanju asimetrične cijaninske boje *SYBR Green* na dvostruku uzvojnicu DNA. Boja je vezana za prigušivač (Q - quencher) te emitira fluorescenciju tek kad se odvoji od njega, tj. veže za novonastalu dvolančanu DNA. Prilikom svakog ciklusa, kada dolazi do umnožavanja dijela cDNA gena od interesa, dolazi i do proporcionalnog pojačanja fluorescencijskog signala koje je uzrokovano vezivanjem boje na nastalu dvostruku uzvojnicu. Količina fluorescencije razmjerna je količini novonastale DNA, pa mjerenjem signala fluorescencije mjerimo nastali DNA produkt. Rezultati qRT-PCR-a se očitavaju na krivulji umnažanja. Ta krivulja pokazuje porast intenziteta fluorescencije (laserski detektirano) u odnosu na broj PCR ciklusa. U tu krivulju se postavlja detekcijski prag koji, nakon što ga intenzitet fluoresciranja prijeđe, ukazuje na sigurnu pojavu umnažanja kopija DNA. Ciklus u kojem je taj prag prijeđen se naziva Ct tj. pragovni ciklus (engl. *cycle*

threshold). Što je ciklus u kojemu se prijeđe prag niži, veća je količina DNA u određenom uzorku (i obrnuto).

3.4 Obrada podataka

Rezultati kvantitativne PCR reakcije u stvarnom vremenu predstavljaju Ct vrijednosti koje definiraju ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadani prag detekcije. Ct vrijednost predstavlja izražaj testiranih gena u tkivu mokraćnog mjehura i obrnuto je proporcionalna izražaju testiranih gena u uzorku. Mjerene su relativne promjene izražaja ciljanih gena (p62, Beclin 1, LC3A, Atg5, Ripk3f) u tkivu mokraćnih mjehura miševa kontrolne i izložene skupine, a kao standard izražaja korišten je izražaj gena za aktin. Relativne vrijednosti promjena ciljnog gena u odnosu na kontrolni, za tumorsko i zdravo tkivo dobivene su po formuli 2^ (Ct standarda - Ct ciljanog gena).

Provjera normalnosti distribucije uzoraka napravljena je Shapiro Wilk testom. Uzorci normalne distribucije (p62, Beclin 1, LC3A te Ripk3f) zatim su podvrgnuti studentovom t-testu, a uzorak koji nije prošao test normalne distribucije (Atg5) podvrgnut je Mann-Whitneyevom testu. Vrijednost od $p<0,05$ smatrana je statistički značajnom. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Izračun relativnih promjena izražaja ciljnih gena napravljen je u programu Microsoft Office Excell 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Statistička obrada napravljena je u programu SPSS 15.0 (IBM, Armonk, North Castle, New York, SAD).

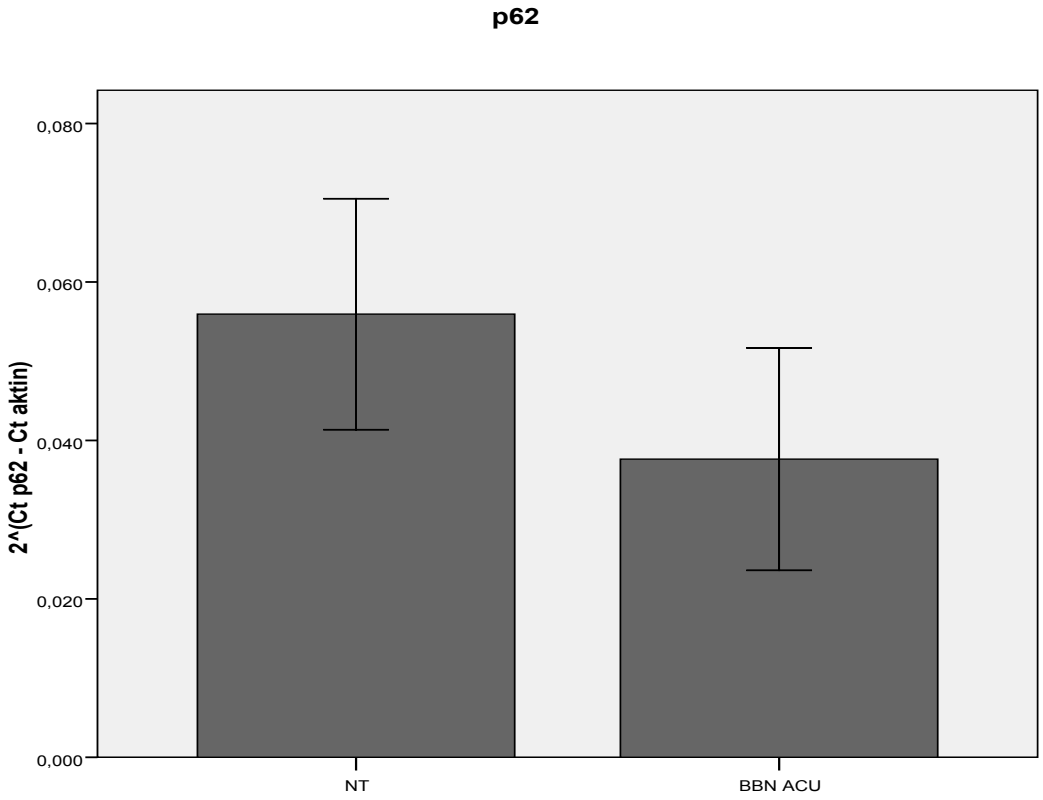
4. REZULTATI

Analiza promjene ciljnih gena

Analizom Ct vrijednosti pojedinih gena (p62, Beclin 1, LC3A, Atg5, Ripk3f) i njihovom usporedbom s Ct vrijednošću gena za standardizaciju izražaja (aktin) dobivene su relativne vrijednosti promjene izražaja ciljanih gena u tumorskom tkivu naspram zdravog tkiva mokraćnog mjehura miševa.

P62

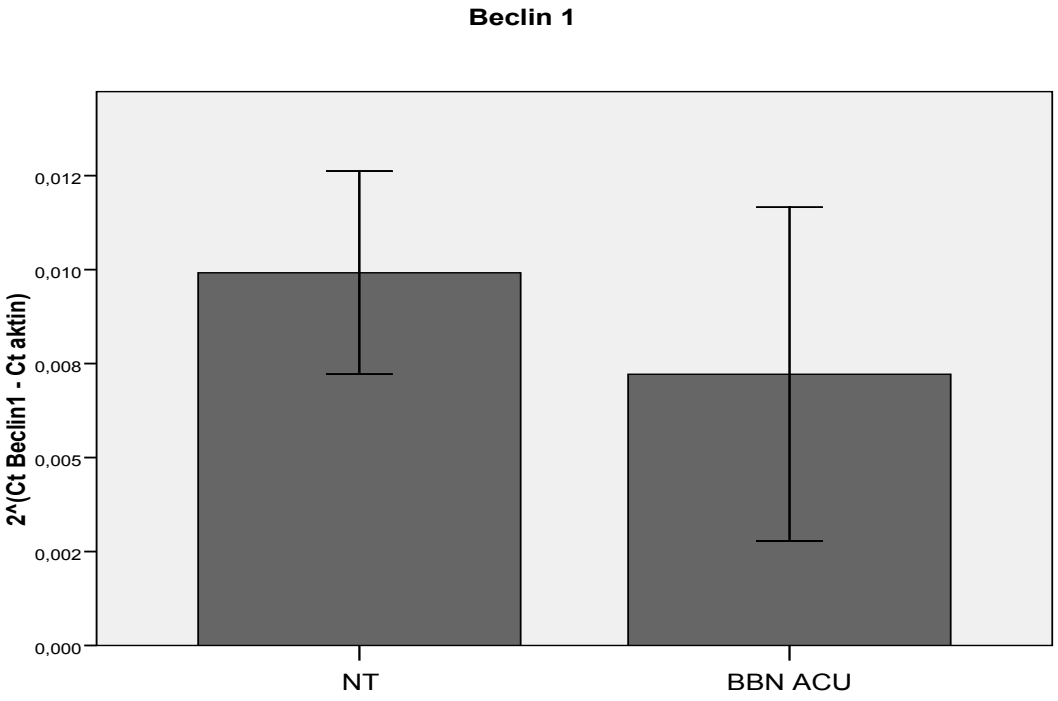
Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju gena p62 u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miševa (p= 0,7474).



Slika 3. Izražaj gena za p62 u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. Nema statistički značajne razlike (p= 0,7474) između tumorskog i normalnog tkiva. Legenda: NT – kontrolna skupina, BBN ACU – eksperimentalna skupina izložena BBN-u u trajanju od 2 tjedna.

Beclin 1

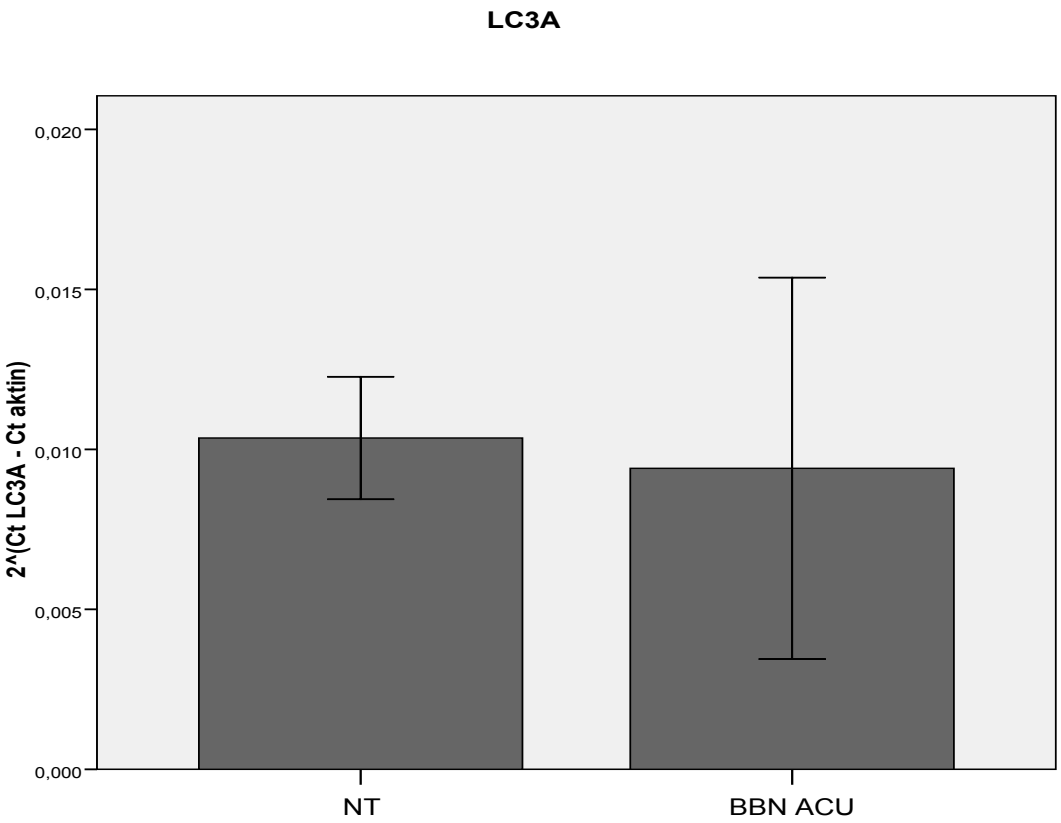
Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju gena Beclin 1 u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miševa (p= 0,5798).



Slika 4. Izražaj gena za Beclin 1 u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. Nema statistički značajne razlike (p= 0,5798) između tumorskog i normalnog tkiva. Legenda: NT – kontrolna skupina, BBN ACU – eksperimentalna skupina izložena BBN-u u trajanju od 2 tjedna.

LC3A

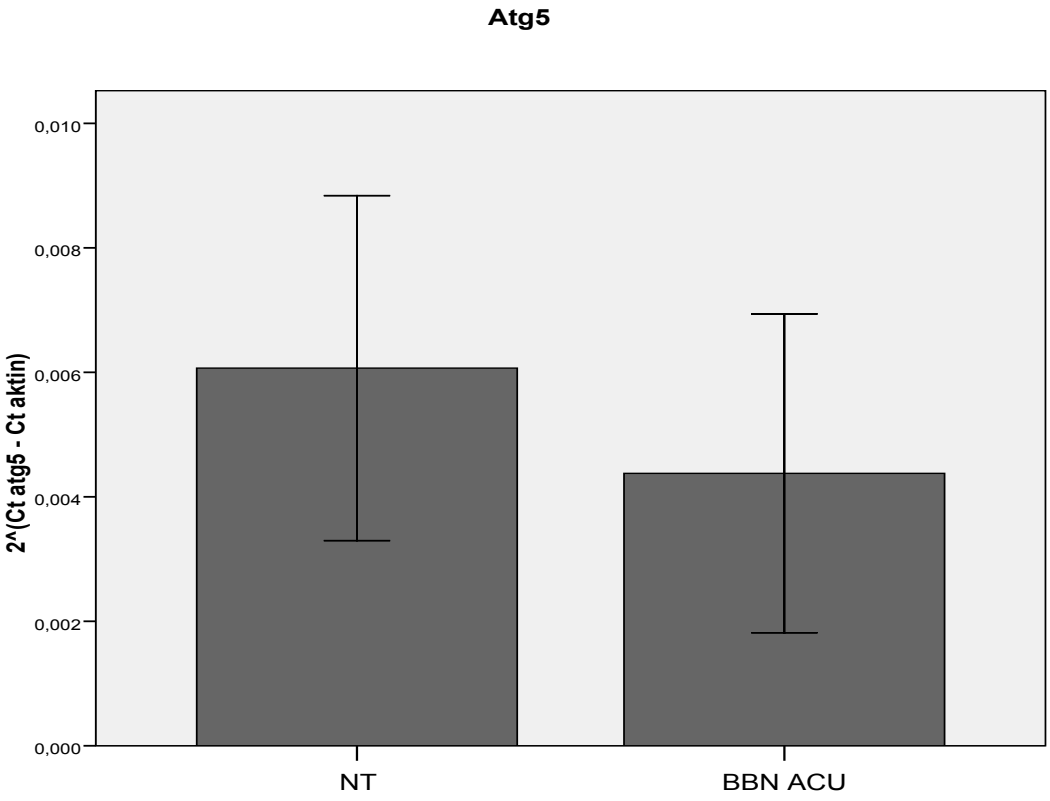
Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju gena za LC3A u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miševa (p= 0,581).



Slika 5. Izražaj gena za LC3A u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. Nema statistički značajne razlike (p= 0,581) između tumorskog i normalnog tkiva. Legenda: NT – kontrolna skupina, BBN ACU – eksperimentalna skupina izložena BBN-u u trajanju od 2 tjedna.

Atg5

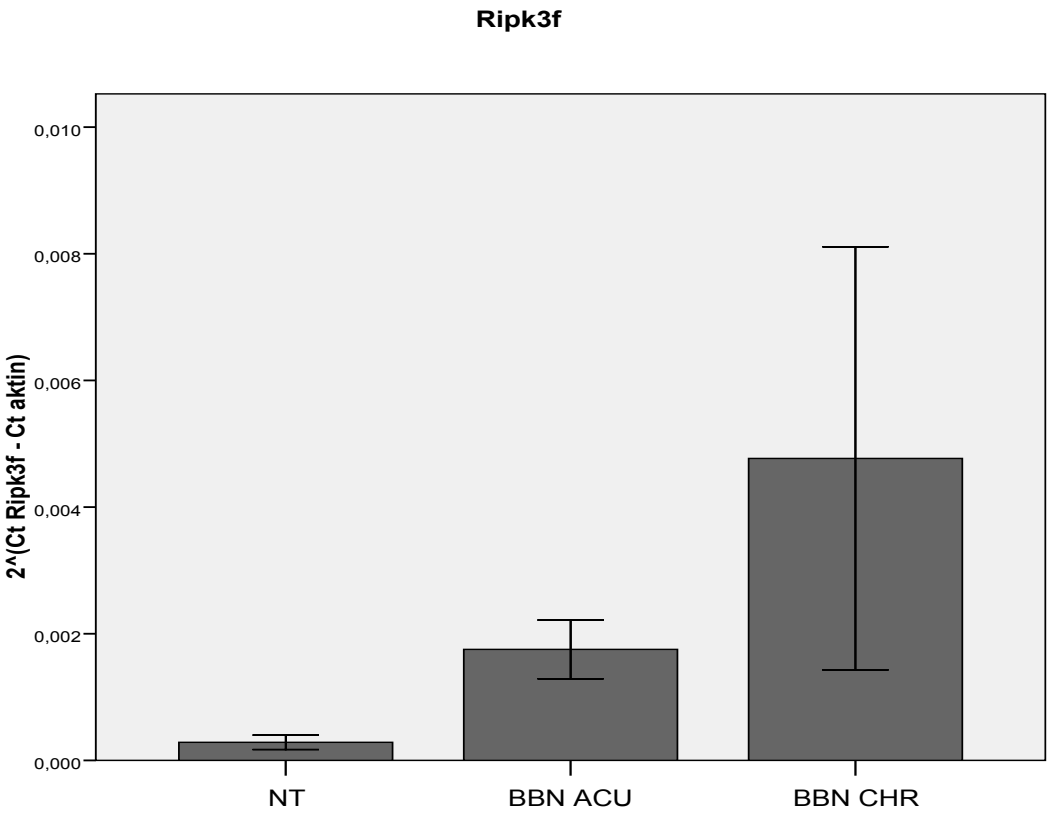
Nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju gena za Atg5 u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miševa (p= 0,8048).



Slika 6. Izražaj gena za Atg5 u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. Nema statistički značajne razlike (p= 0,8048) između tumorskog i normalnog tkiva. Legenda: NT – kontrolna skupina, BBN ACU – eksperimentalna skupina izložena BBN-u u trajanju od 2 tjedna.

Ripk3f

Utvrđena je značajna statistička razlika u izražaju gena za Ripk3f u u usporedbi kontrolne i akutne skupine (p< 0,0001) i u usporedbi kontrolne i kronične skupine (p< 0,001). Promjena izražaja gena (eng. *fold change*) za Ripk3f u akutnoj skupini se povećala 7 puta, a u kroničnoj 20 puta.



Slika 7. Porast izražaja gena za Ripk3f u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. Značajna statistička razlika u usporedbi kontrolne i akutne skupine ($p < 0,0001$) i u usporedbi kontrolne i kronične skupine ($p < 0,001$). Legenda: NT – kontrolna skupina, BBN ACU – eksperimentalna skupina izložena BBN-u u trajanju od 2 tjedna, BBN CHR – eksperimentalna skupina izložena BBN-u u trajanju od 12 tjedana.

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja u kojima su analizirane razlike u izražaju gena u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo pokazali su da ne postoji statistički značajan porast izražaja gena za autofagiju - p62, Beclin 1, LC3A i Atg5, dok je gen za nekroptozu, Ripk3f, imao statistički značajan porast izražaja gena u tumorskom tkivu akutne skupine miševa. Kako bi utvrdili nastavlja li se taj trend porasta tijekom kasnijih stadija razvoja tumora i u miševa kronično izloženih BBN-u, analizirani su njihovi uzorci i utvrđeno je kako i u kroničnoj skupini postoji statistički značajan porast izražaja gena za Ripk3f u odnosu na kontrolnu skupinu. Promjena izražaja gena *(*eng. *fold change)* za Ripk3f u akutnoj skupini je 7 puta veća, a u kroničnoj 20 puta veća u odnosu na kontrolnu skupinu.

Autofagija je proces kojim stanice kontrolirano recikliraju vlastiti citoplazmatski sadržaj. Hoće li autofagija djelovati tumorsupresorski ili prokarcinogeno, ovisi o brojnim čimbenicima. U ranim fazama tumorigeneze, autofagija ima važnu funkciju onesposobljavanja genetske nestabilnosti i uklanjanja aberantnih proteinskih agregata kao i promicanja antitumorskog imunosnog odgovora. U već formiranim malignim tumorima, štiti od metaboličkog stresa uzrokovanog nedostatkom hranjivih tvari. No unatoč tome, pokazano je kako u hipoksičnim uvjetima potpomaže ranu invaziju i izraženu displaziju adenokarcinoma kolona, a povišen izražaj autofagijskih gena povezan je s lošijom prognozom (51, 74). Isto tako, u melanomima je dokazano i povećanje i smanjenje izražaja gena za Beclin 1. Oni sa izrazitim povećanjem izražaja gena imali su raniju pojavu presadnica i lošiju prognozu, te su bili povezani sa tumorima u hipoksičnim i kiselim uvjetima (101). Agresivnost, hipoksija i lošija prognoza zajednički su čimbenici tumora sa povišenim izražajem gena za autofagiju (53, 102, 103). U tumorima mokraćnog mjehura čimbenici inducirani hipoksijom javljaju se u kasnijim fazama mišićno invazivnih tumora (104), kao i porast izražaja gena za autofagiju (105). Ovo istraživanje koristilo je BBN-om posredovanu indukciju tumora mokraćnog mjehura. Nije pronađeno statistički značajno povećanje izražaja gena autofagije (p62, Beclin 1, LC3A, Atg5) nakon 2 tjedna izloženosti. Karcinogen BBN izaziva tumorigenezu ovisno o dozi i vremenu izlaganja, te je potreban dulji i intenzivniji tretman kako bi inducirao razvoj mišićno invazivnog tumora visokog gradusa (36), u kojem bi mogli očekivati povećanje izražaja gena za autofagiju. Buduća istraživanja bi mogla uključiti veći broj uzoraka sa invazivnijim oblicima tumora, no sadašnji rezultati ukazuju da stanična smrt posredovana autofagijom nema veći značaj pri umiranju zloćudnih stanica mokraćnog mjehura.

Nekroptoza je proupalni mehanizam regulirane stanične smrti i, kao takav, potencijalna meta antitumorske terapije. Dokazano je kako je Ripk3f značajan za imunosno uništavanje tumora inducirano vanjskim imunostimulansima (106), kao i to da nekroptotične stanice tumora same luče interleukine koji potiču imunosni odgovor organizma (107). Povišena ekspresija Ripk3f tumore dojke čini osjetljivijima na kemoterapeutike, a u karcinomima jednjaka neophodan je za odgovor na terapiju cisplatinom (82, 100). Istražuju se razni spojevi koji bi indukcijom nekroptoze mogli imati suprimirajući učinak na tumore (108). U staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura i pluća uspješno je aktiviran nekroptotski antitumorski put uporabom halkona 24 (109). Uspješnost ovakvih oblika imunoterapije ovisi o samom izražaju nekroptotskih gena u tumorima koji se odlikuju velikom genetskom varijabilnošću. Istraživanje izražaja ključnih gena nekroptoze u različitim tumorima važno je za odabir tumora za istraživanje novih oblika pro-nektoptotske terapije. Ovo istraživanje pokazalo je statistički značajan porast izražaja gena za Ripk3f u mokraćnim mjehurima miševa već nakon 2 tjedna izloženosti karcinogenom BBN-u. Izražaj gena porastao je 7 puta. Ovako rani i značajan porast aktivnosti markera nekroptoze u tumorima mokraćnog mjehura upućuje kako se glavnina stanične smrti u takvom tipu tumora odvija nekroptozom i ukazuje na njegov potencijal u istraživanjima novih antitumorskih terapija. Za očekivati je kako bi takvi tumori povoljno reagirali na terapiju usmjerenu ka imunosnom uništavanju tumora. U mokraćnim mjehurima miševa izloženih karcinogenu 12 tjedana izražaj gena porastao je 20 puta. Moguće objašnjenje takvog porasta leži u sukladnom porastu mase tumora nakon duljeg razdoblja tumorigeneze. Potrebna su daljnja istraživanja uloge nekroptoze u tumorigenezi koja će otvoriti nove mogućnosti antitumorske terapije.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Gen Ripk3f ima statistički značajno povišen izražaj u stanicama zloćudnog tumora mokraćnog mjehura miša. To ukazuje na važnost uloge nekroptoze u patogenezi mokraćnog mjehura.
2. Gen p62 nema promijenjen izražaj u stanicama zloćudnog tumora mokraćnog mjehura miša.
3. Gen Beclin 1 nema promijenjen izražaj u stanicama zloćudnog tumora mokraćnog mjehura miša.
4. Gen LC3A nema promijenjen izražaj u stanicama zloćudnog tumora mokraćnog mjehura miša.
5. Gen Atg5 nema promijenjen izražaj u stanicama zloćudnog tumora mokraćnog mjehura miša.

7. LITERATURA

1. Fritsch H, Kühnel W. Odvodni mokraćni putevi. U: Platzer W, urednik. Priručni anatomski atlas u tri sveska. 2. Zagreb: Medicinska naklada 2006. str. 229-45.

2. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Systema urinarium, mokraćni sustav. U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A, urednici. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada 2007. str. 353-65.

3. Moore KL. Pelvis and perineum. U: Moore KL, Dalley AF, Agur. AMR, urednici. Clinically oriented anatomy. 7th ed. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. str. 326-429.

4. Junqueira LC, Carneiro J. Mokraćni sustav. U: Bradamante Ž, Kostović-Knežević L, urednici. Osnove histologije, udžbenik i atlas. 10. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 383-403.

5. Ćorić M, Damjanov I. Bolesti bubrega i mokraćnoga sustava. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, urednici. Patologija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

6. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. European urology. 2016;70(1):106-19.

7. Cancer AJCO. Urinary bladder. U: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FC, Trotti A, urednici. AJCC Cancer Staging Manual. New York: Springer-Verlag; 2010. str. 497-507.

8. Klotz L, Brausi MA. World Urologic Oncology Federation Bladder Cancer Prevention Program: a global initiative. Urologic oncology. 2015;33(1):25-9.

9. Šekerija M, Bubanović L, Novak P. Registar za rak. 2016. In: Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016 godinu [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; [283-5].

10. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. European urology. 2013;63(2):234-41.

11. Yeung C, Dinh T, Lee J. The health economics of bladder cancer: an updated review of the published literature. PharmacoEconomics. 2014;32(11):1093-104.

12. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. Jama. 2011;306(7):737-45.

13. Lammers RJ, Witjes WP, Hendricksen K, Caris CT, Janzing-Pastors MH, Witjes JA. Smoking status is a risk factor for recurrence after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer. European urology. 2011;60(4):713-20.

14. Westhoff E, Maria de Oliveira-Neumayer J, Aben KK, Vrieling A, Kiemeney LA. Low awareness of risk factors among bladder cancer survivors: New evidence and a literature overview. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2016;60:136-45.

15. Fernandez MI, Lopez JF, Vivaldi B, Coz F. Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure. The Journal of urology. 2012;187(3):856-61.

16. Ferris J, Berbel O, Alonso-Lopez J, Garcia J, Ortega JA. Environmental non-occupational risk factors associated with bladder cancer. Actas urologicas espanolas. 2013;37(9):579-86.

17. Khaled H. Schistosomiasis and cancer in egypt: review. Journal of advanced research. 2013;4(5):461-6.

18. Cantiello F, Cicione A, Salonia A, Autorino R, De Nunzio C, Briganti A, et al. Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological outcomes of bladder cancer: a systematic review. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. 2015;22(1):22-32.

19. Šitum M, Gotovac J, suradnici. Novotvorine urogenitalnog sustava. Urologija. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 111-57.

20. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori mokraćnoga sustava. U: Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z, urednici. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 143-50.

21. Soubra A, Risk MC. Diagnostics techniques in nonmuscle invasive bladder cancer. Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India. 2015;31(4):283-8.

22. Liu JJ, Droller MJ, Liao JC. New optical imaging technologies for bladder cancer: considerations and perspectives. The Journal of urology. 2012;188(2):361-8.

23. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. European urology. 2005;47(6):736-48.

24. Schmitz-Drager BJ, Droller M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. Urologia internationalis. 2015;94(1):1-24.

25. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Compérat E, Kaasinen E, Palou J, et al. Non-muscle-invasive Bladder Cancer: European Association of Urology; 2016 [citirano 27.6. 2016.]. Dostupno na: https://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladder-cancer/#5.
26. Herr HW. Role of Repeat Resection in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. 2015;13(8):1041-6.
27. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. Lancet (London, England). 1999;353(9165):1689-94.
28. Patel SG, Cohen A, Weiner AB, Steinberg GD. Intravesical therapy for bladder cancer. Expert opinion on pharmacotherapy. 2015;16(6):889-901.
29. Abern MR, Owusu RA, Anderson MR, Rampersaud EN, Inman BA. Perioperative intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. 2013;11(4):477-84.
30. Cui J, Wang W, Chen S, Chen P, Yang Y, Guo Y, et al. Combination of Intravesical Chemotherapy and Bacillus Calmette-Guerin Versus Bacillus Calmette-Guerin Monotherapy in Intermediate- and High-risk Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. Medicine. 2016;95(3):e2572.
31. Sfakianos JP, Galsky MD. Neoadjuvant chemotherapy in the management of muscle-invasive bladder cancer: bridging the gap between evidence and practice. The Urologic clinics of North America. 2015;42(2):181-7, viii.
32. Tsao CK, Liaw BC, Oh WK, Galsky MD. Muscle invasive bladder cancer: closing the gap between practice and evidence. Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology. 2015;67(1):65-73.
33. Premo C, Apolo AB, Agarwal PK, Citrin DE. Trimodality therapy in bladder cancer: who, what, and when? The Urologic clinics of North America. 2015;42(2):169-80, vii.
34. Chan E, Patel A, Heston W, Larchian W. Mouse orthotopic models for bladder cancer research. BJU international. 2009;104(9):1286-91.
35. Ahmad I, Sansom OJ, Leung HY. Exploring molecular genetics of bladder cancer: lessons learned from mouse models. Disease models & mechanisms. 2012;5(3):323-32.
36. Vasconcelos-Nobrega C, Colaco A, Lopes C, Oliveira PA. Review: BBN as an urothelial carcinogen. In vivo (Athens, Greece). 2012;26(4):727-39.
37. Oliveira PA, Colaco A, De la Cruz PL, Lopes C. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. Experimental oncology. 2006;28(1):2-11.

38. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Intracellular Membrane Traffic. Molecular Biology of The Cell. USA: Garland Science; 2015. str. 695-752.
39. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. The Journal of pathology. 2010;221(1):3-12.
40. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell death and differentiation. 2012;19(1):107-20.
41. Fimia GM, Piacentini M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2010;67(10):1581-8.
42. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. Antioxidants & redox signaling. 2014;20(3):460-73.
43. Mizushima N. Autophagy: process and function. Genes & development. 2007;21(22):2861-73.
44. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell. 2010;141(4):656-67.
45. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. The Journal of cell biology. 2008;182(4):685-701.
46. Schneider JL, Cuervo AM. Autophagy and human disease: emerging themes. Current opinion in genetics & development. 2014;26:16-23.
47. Honscheid P, Datta K, Muders MH. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. International journal of radiation biology. 2014;90(8):628-35.
48. Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. Current opinion in genetics & development. 2011;21(1):113-9.
49. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. Nature. 2013;504(7479):296-300.
50. Xu LW, Qian M, Jia RP, Xu Z, Wu JP, Li WC, et al. Expression and significance of microsomal prostaglandin synthase-1 (mPGES-1) and Beclin-1 in the development of prostate cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2012;13(4):1639-44.

51. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Koutsopoulos AV, Harris AL, Gatter KC, Sivridis E. Autophagy and hypoxia in colonic adenomas related to aggressive features. Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. 2013;15(5):e223-30.

52. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pitiakoudis M, Gatter KC, Harris AL. Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. British journal of cancer. 2010;103(8):1209-14.

53. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Koutsopoulos A, Chloropoulou P, Liberis V, Sivridis E. High Beclin 1 expression defines a poor prognosis in endometrial adenocarcinomas. Gynecologic oncology. 2011;123(1):147-51.

54. Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, et al. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. Autophagy. 2012;8(1):6-17.

55. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. Journal of virology. 1998;72(11):8586-96.

56. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. Cell death and differentiation. 2008;15(8):1318-29.

57. Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. The American journal of pathology. 2007;170(1):75-86.

58. Heidari N, Hicks MA, Harada H. GX15-070 (obatoclax) overcomes glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia through induction of apoptosis and autophagy. Cell death & disease. 2010;1:e76.

59. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(25):15077-82.

60. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell. 2005;122(6):927-39.

61. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. The EMBO journal. 2007;26(10):2527-39.

62. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO reports. 2008;9(9):859-64.
63. Liu H, He Z, Simon HU. Protective role of autophagy and autophagy-related protein 5 in early tumorigenesis. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). 2015;93(2):159-64.
64. Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. The Journal of pathology. 2010;221(2):117-24.
65. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature. 2004;432(7020):1032-6.
66. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. Nature. 2009;458(7242):1131-5.
67. He Z, Liu H, Agostini M, Yousefi S, Perren A, Tschan MP, et al. p73 regulates autophagy and hepatocellular lipid metabolism through a transcriptional activation of the ATG5 gene. Cell death and differentiation. 2013;20(10):1415-24.
68. Salemi S, Yousefi S, Constantinescu MA, Fey MF, Simon HU. Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. Cell research. 2012;22(2):432-5.
69. Codogno P, Meijer AJ. Atg5: more than an autophagy factor. Nature cell biology. 2006;8(10):1045-7.
70. Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Zlobec I, Perren A, Friis R, et al. ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. Nature communications. 2013;4:2130.
71. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. Genes & development. 2011;25(8):795-800.
72. Liu H, He Z, Simon HU. Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence. Autophagy. 2014;10(2):372-3.
73. Rao S, Tortola L, Perlot T, Wirnsberger G, Novatchkova M, Nitsch R, et al. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. Nature communications. 2014;5:3056.
74. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Harris AL, Polychronidis A, Gatter KC, Sivridis E. Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. Journal of clinical pathology. 2010;63(10):867-72.
75. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. The EMBO journal. 2000;19(21):5720-8.

76. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. Oncogene. 2012;31(40):4397-408.
77. Spowart JE, Townsend KN, Huwait H, Eshragh S, West NR, Ries JN, et al. The autophagy protein LC3A correlates with hypoxia and is a prognostic marker of patient survival in clear cell ovarian cancer. The Journal of pathology. 2012;228(4):437-47.
78. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. The FEBS journal. 2015;282(24):4672-8.
79. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. Cell. 2009;137(6):1001-4.
80. Ralston SH. Pathogenesis of Paget's disease of bone. Bone. 2008;43(5):819-25.
81. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nature chemical biology. 2005;1(2):112-9.
82. Xu Y, Lin Z, Zhao N, Zhou L, Liu F, Cichacz Z, et al. Receptor interactive protein kinase 3 promotes Cisplatin-triggered necrosis in apoptosis-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. PloS one. 2014;9(6):e100127.
83. Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. Critical reviews in oncology/hematology. 2012;82(3):249-58.
84. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 2010;464(7285):104-7.
85. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. Immunity. 2013;38(2):209-23.
86. Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. Cell. 2009;138(2):229-32.
87. Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. Nature cell biology. 2014;16(1):55-65.
88. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, McCormick LL, Fitzgerald P, Pop C, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. Nature. 2011;471(7338):363-7.

89. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. Cell. 2012;148(1-2):213-27.
90. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nature reviews Cancer. 2013;13(10):714-26.
91. Su Z, Yang Z, Xie L, DeWitt JP, Chen Y. Cancer therapy in the necroptosis era. Cell death and differentiation. 2016;23(5):748-56.
92. Nehs MA, Lin CI, Kozono DE, Whang EE, Cho NL, Zhu K, et al. Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. Surgery. 2011;150(6):1032-9.
93. Liu X, Zhou M, Mei L, Ruan J, Hu Q, Peng J, et al. Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. Oncotarget. 2016.
94. Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O, et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. Nucleic acids research. 2014;42(Database issue):D756-63.
95. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, et al. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. Cell death & disease. 2013;4:e465.
96. Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, et al. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. Science (New York, NY). 2014;343(6177):1357-60.
97. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. Cell host & microbe. 2010;7(4):302-13.
98. Roychowdhury S, McMullen MR, Pisano SG, Liu X, Nagy LE. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. Hepatology (Baltimore, Md). 2013;57(5):1773-83.
99. Morgan MJ, Kim YS. The serine threonine kinase RIP3: lost and found. BMB reports. 2015;48(6):303-12.
100. Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, Koo JS, et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. Cell research. 2015;25(6):707-25.
101. Giatromanolaki AN, Charitoudis GS, Bechrakis NE, Kozobolis VP, Koukourakis MI, Foerster MH, et al. Autophagy patterns and prognosis in uveal melanomas. Modern

pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2011;24(8):1036-45.

102. Sivridis E, Koukourakis MI, Zois CE, Ledaki I, Ferguson DJ, Harris AL, et al. LC3A-positive light microscopy detected patterns of autophagy and prognosis in operable breast carcinomas. The American journal of pathology. 2010;176(5):2477-89.

103. Sivridis E, Giatromanolaki A, Karpathiou G, Karpouzis A, Kouskoukis C, Koukourakis MI. LC3A-positive "stone-like" structures in cutaneous squamous cell carcinomas. The American Journal of dermatopathology. 2011;33(3):285-90.

104. Ioachim E, Michael M, Salmas M, Michael MM, Stavropoulos NE, Malamou-Mitsi V. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in bladder cancer and their associations with other angiogenesis-related proteins. Urologia internationalis. 2006;77(3):255-63.

105. Sivridis E, Koukourakis MI, Mendrinos SE, Touloupidis S, Giatromanolaki A. Patterns of autophagy in urothelial cell carcinomas--the significance of "stone-like" structures (SLS) in transurethral resection biopsies. Urologic oncology. 2013;31(7):1254-60.

106. Takemura R, Takaki H, Okada S, Shime H, Akazawa T, Oshiumi H, et al. PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumor Elimination In Vivo. Cancer immunology research. 2015;3(8):902-14.

107. Schmidt SV, Seibert S, Walch-Ruckheim B, Vicinus B, Kamionka EM, Pahne-Zeppenfeld J, et al. RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC-induced necroptosis, IL-1alpha release, and efficient paracrine dendritic cell activation. Oncotarget. 2015;6(11):8635-47.

108. Fulda S. Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. Seminars in cell & developmental biology. 2014;35:51-6.

109. He W, Wang Q, Srinivasan B, Xu J, Padilla MT, Li Z, et al. A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy. Oncogene. 2014;33(23):3004-13.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Istražiti postoji li povećan izražaj gena za p62, Beclin 1, LC3A, Atg5 i Ripk3f u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo mokraćnog mjehura miša.

Materijali i metode: Eksperimentalno istraživanje provedeno je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta u Splitu. Miševi C57BL/6J divljeg tipa (wt) stari 6 do 8 tjedana podijeljeni su u 3 eksperimentalne skupine, netretiranu kontrolnu skupinu, ispitivanu skupinu podvrgnutu akutnom tretmanu i ispitivanu skupinu podvrgnutu kroničnom tretmanu. Ispitivane skupine izložene su kemikaliji N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozaminu (BBN-u) u vodi za piće sa svrhom indukcije tumora mokraćnog mjehura. Akutna skupina miševa bila je izložena 0,05% BBN-u tijekom 2 tjedna, dok je skupina kroničnih miševa BBN-u (0,05%) bila izložena 12 tjedana. Životinje su žrtvovane 2 tjedna (skupina akutnih) i 20 tjedana (skupina kroničnih) nakon početka tretmana. Iz uzoraka je izolirana mRNA, nakon čega je prevedena u cDNA koja je služila kao predložak za qRT-PCR. Kao standard za genski izražaj korišten je gen za aktin.

Rezultati: Izražaj gena za p62, Beclin 1, LC3A i Atg5 nije promijenjen u akutnoj skupini u odnosu na kontrolnu netretiranu skupinu. Izražaj gena za Ripk3f statistički je značajno povećan u akutnoj skupini u odnosu na kontrolnu ($p<0,0001$), kao i u kroničnoj skupini u odnosu na kontrolnu ($p<0,001$).

Zaključak: Geni za autofagijske proteine p62, Beclin 1, LC3A i Atg5 nemaju značajno povišen izražaj u tumorima mokraćnog mjehura miša. Izražaj gena za Ripk2f statistički značajno je povećan te ukazuje na važnost uloge nekroptoze u patogenezi tumora mokraćnog mjehura.

9. SUMMARY

Expression of autophagy and necroptosis markers in bladder carcinoma in mice

Objectives: To determine expression of autophagy related genes p62, Beclin 1, LC3A and Atg5, as well as gene expression of necroptosis related gene Ripk3f, in bladder carcinoma compared to healthy bladder tissue of mice.

Materials and methods: Experimental research was conducted at Laboratory for cancer research at University of Split School of Medicine. Wild type C57BL/6J mice 6-8 weeks old were divided into 3 groups: untreated control group, experimental group that undergone acute treatment and experimental group that undergone chronic treatment. Experimental groups were exposed to a chemical carcinogen N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) administered in drinking water, in order to induce bladder carcinoma. Acute experimental group was exposed to BBN (0.05%) during 2 weeks, while the chronic experimental group was exposed to BBN (0.05%) during 12 weeks. Mice were sacrificed 2 and 20 weeks after commencement of treatment. RNA was isolated from tissue samples and then converted into cDNA by reverse transcription. cDNA was used as a template for qRT-PCR reaction. Actin gene was used as a housekeeping control.

Results: Expression of p62, Beclin 1, LC3A and Atg5 was not changed in acute experimental group compared to nontreated control group. Ripk3f expression was significantly increased in both acute and chronic experimental groups compared to nontreated control group ($p<0.0001$; $p<0.001$).

Conclusion: Expression of autophagy related genes p62, Beclin 1, LC3A and Atg5 is not significantly increased in bladder carcinoma in mice. Significantly increased expression of Ripk3f gene suggests that necroptosis plays an important role in pathogenesis of bladder cancer.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ružica Tokalić

Adresa: Sadić 8c, 21425 Selca, otok Brač

Elektronička pošta: rtokalic@gmail.com

Državljanstvo: Republike Hrvatske

Datum i mjesto rođenja: 12. prosinca 1991., Supetar

OBRAZOVANJE

- 1998. – 2006. Osnovna škola „Selca“ u Selcima, otok Brač
- 2006. – 2010. Prirodoslovna gimnazija u Splitu
- 2010. – 2016. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- Engleski jezik (C2)
- Talijanski jezik (A1)

STUDENTSKE AKTIVNOSTI

- Demonstratorica pri katedri za Imunologiju i medicinsku genetiku (hrvatski i engleski studiji) ak. god. 2014 – 2015
- Demonstratorica pri katedri za Medicinsku kemiju i biokemiju ak. god. 2011 – 2015
- Demonstratorica pri katedri za Anatomiju ak. god. 2011 – 2012

PUBLIKACIJE

- Filipović N, Žuvan L, Mašek T, **Tokalić R**, Grković I. Gender and gonadectomy influence on neurons in superior cervical ganglia of sexually mature rats. Neurosci Lett. 2014;563:55-60.