

Epitelno-mezenhimska tranzicija u glioblastomima

Crnković, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:590960>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Crnković

6872/BT

EPITELNO-MEZENHIMSKA TRANZICIJA U
GLIOBLASTOMIMA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Biologija 2

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Reno Hrašćan

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Labaratorij za genetiku i mikrobiologiju mikroorganizama

EPITELNO-MEZENHIMSKA TRANZICIJA U GLIOBLASTOMIMA

Petra Crnković, 6872/BT

Sažetak: Glioblastoma multiforme (GBM) je najzloćudniji i najinvazivniji tumor središnjeg živčanog sustava te se prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije svrstava pod astrocitom gradusa IV. U razvoju bolesti ključan je proces epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). EMT je proces koji se normalno pojavljuje tijekom fizioloških procesa embriogeneze i zacijeljivanja rana. Međutim, EMT u stanicama GBM inducira mezenhimski fenotip stanica, uključujući sposobnost metastaziranja, invazije i otpornost na apoptozu. Na taj način tumor postaje zloćudan te počinje invazivno rasti i metastazirati. Pokretanje EMT uzrokuju različiti signalni putevi stimulirani faktorima rasta, koji uzrokuju povećanu aktivaciju transkripcijskih faktora, koji onda smanjuju ekspresiju različitih epitelnih markera, a povećavaju ekspresiju mezenhimskih markera. Pacijenti s GBM imaju izrazito lošu prognozu. Zbog toga, znanstvenici iz područja onkologije teže otkrićima novih tretmana koji će prevladati difuznu prirodu GBM i njegovu rezistentnost na zračenje. U ovom radu promatrana su dva potencijalna terapijska tretmana koji bi mogli inhibirati migraciju i invaziju stanica GBM: liječenje pacijenata s kalikozinom izoliranog iz biljke *Radix astragali* i implantantom radioaktivnog joda (^{125}I).

Ključne riječi: glioblastoma multiforme, epitelno-mezenhimska tranzicija, metastaziranje, signalni putevi

Rad sadrži: 31 stranice, 16 slika, 0 tablica, 21 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Reno Hrašćan

Rad predan: lipanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION

Petra Crnković, 6872/BT

Abstract: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and the most invasive tumor of central nervous system, and is classified as grade IV astrocytoma by the criteria of The World Health Organization. A key process in the development of the disease is epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT is a process that normally occurs during the physiological processes of embryogenesis and wound healing. However, EMT in GBM cells induces a mesenchymal cell phenotype, including enhanced migratory properties, invasiveness, and resistance to apoptosis. On that way tumor becomes malignant and starts to grow and metastasize. Initiating of EMT is caused by various signalling pathways stimulated by growth factors, which cause the increased activation of transcription factors, which then decrease expression of various epithelial markers and increase expression of mesenchymal markers. Patients with GBM have an extremely poor prognosis. Thus, the discovery of novel treatments that can overcome the diffuse nature of GBM and its radioresistance has been an aspiration of scientists in the fields of oncology. This paper studied two potential therapeutic treatments that could inhibit migration and invasion of GBM cells: treatment of patients with calycosin derived from herb *Radix astragali* and radioactive ^{125}I seeds.

Keywords: glioblastoma multiforme, epithelial-mesenchymal transition, metastasis, signalling pathways

Thesis contains: 31 pages, 16 figures, 0 tables, 21 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Dr.sc. Reno Hrašćan, Assoc.Prof.

Thesis delivered: June 2016.

POPIS KRATICA

ATM - ataxia telangiectasia mutated

CDK – ciklin ovisna kinaza (od engl. cyclin-dependent kinase)

CNS – središnji živčani sustav (od engl. central nervous system)

DCF - 2',7'-diklofluorescein

DCFH-DA - 2',7-diklofluorescein diacetat

ECM – izvanstanični matriks (od engl. extracellular matrix)

EGF – epidermalni faktor rasta (od engl. epidermal growth factor)

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta (od engl. epidermal growth factor receptor)

EMT – epitelno-mezenhimska tranzicija

ERK1/2 - ekstracelularna regulatorna kinaza1/2 (od engl. extracellular signal-regulated kinase1/2)

FAK - kinaza fokalnih adhezija (od engl. focal-adhesion kinase)

FGF – fibroblasni faktor rasta (od engl. fibroblast growth factor)

FGF2 – fibroblasni faktor rasta 2 (od engl. fibroblast growth factor 2)

FITC - fluorescein izotiocijanat (od engl. fluorescein isothiocyanate)

GBM – glioblastoma multiforme

HGF – hepatocitni faktor rasta (od engl. hepatocyte growth factor)

HIF-1 α – hipoksija-inducibilni faktor-1 α (od engl. hypoxia-inducible factor-1 α)

IGF-1 – inzulinu sličan faktor rasta 1 (od engl. insulin-like growth factor-1)

JAK – Janus kinaza (od engl. Janus kinase)

MAPK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza (od engl. mitogen-activated protein kinase)

MET – mezenhimsko-epitelna tranzicija

MMP – matriks metaloproteinaza (od engl. matrix metalloprotease)

NCAM - neural cell adhesion molecule

NF- κ B – nuklearni faktor kapa beta (od engl. nuclear factor kappa beta)

NSCLC – rak pluća ne-malih stanica (od engl. non-small cell lung carcinoma)

PBS - fiziološka otopina puferirana fosforom (od engl. phosphate buffer saline)

PDGF – trombocitni faktor rasta (od engl. platelet-derived growth factor)

PDK-1 - fosfoinozimid-ovisna kinaza 1 (od engl. phosphoinositide-dependent kinase-1)

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza (od engl. phosphatidylinositol-3-kinase)

PIP3 - fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat

PPAR γ - peroksisom proliferator aktivirani receptor gama (od engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

PS – fosfatidil-serin (od engl. phosphatidyl-serine)

ROS – reaktivne kisikove čestice (od engl. reactive oxygen species)

SCCHN – karcinom stanica pločastog epitela glave i vrata (od engl. squamous cell cancer of the head and neck)

SRY – seks-determining region Y

STAT – signal transducers and activators of transcription

TGF- α – transformirajući faktor rasta alfa (od engl. transforming growth factor alpha)

TGF- β – transformirajući faktor rasta beta (od engl. transforming growth factor beta)

TK – tirozin kinaza (od engl tyrosine kinase)

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling

uPAR - urokinase plasminogen activator receptor

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (od engl. vascular endothelial growth factor)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. World Health Organization)

ZEB – zinc finger E-box binding homeobox

SADRŽAJ:

| | |
|---|----|
| 1.UVOD..... | 1 |
| 2.TUMORI OPĆENITO..... | 2 |
| 3.TUMORI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA..... | 2 |
| 4.GLIOBLASTOMI..... | 3 |
| 5.EPITELNO-MEZENHIMSKA TRANZICIJA..... | 4 |
| 6.KLASIFIKACIJA EMT..... | 5 |
| 7.EMT-INDUCIRAJUĆA MIKROOKOLINA..... | 6 |
| 8.MOLEKULARNA NAČELA EMT..... | 6 |
| 8.1.TRANSKRIPCIJSKI FAKTORI..... | 6 |
| 8.1.1.SNAI-1/-2 i ZEB-1/-2..... | 6 |
| 8.1.2.TWIST-1..... | 7 |
| 8.1.3.STAT-3..... | 8 |
| 8.1.4.STAT-5..... | 8 |
| 8.1.5.SOX-2..... | 8 |
| 8.1.6.NF- κ B..... | 8 |
| 8.2.RECEPTORI..... | 9 |
| 8.2.1.INTEGRINI..... | 9 |
| 8.2.2.EGFR..... | 9 |
| 8.2.3.NOTCH..... | 10 |
| 8.2.4.CD44..... | 11 |
| 8.3.SIGNALNE MOLEKULE..... | 11 |
| 8.4.WNT/ β -KATENIN SIGNALNI PUT..... | 11 |
| 9.IZVANSTANIČNI MATRIKS I EMT..... | 13 |
| 10.MicroRNA (miRNA) KOJE REGULIRAJU EMT U GLIOMIMA..... | 13 |
| 11.EMT INDUCIRANA RADIJACIJOM..... | 14 |
| 12.EMT INDUCIRANA S BEVACIZUMABOM..... | 14 |

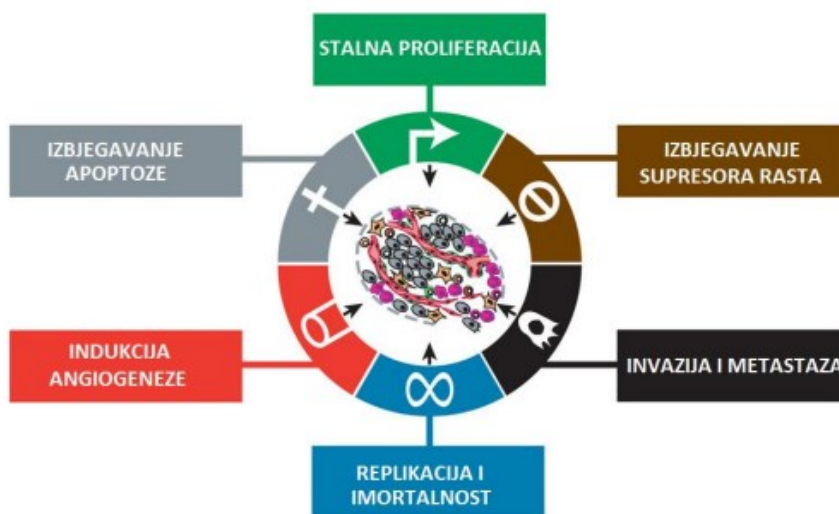
| | |
|--|----|
| 13.KANCEROGENE MATIČNE STANICE..... | 15 |
| 14.ISTRAŽIVANJE O UTJECAJU KALIKOZINA NA INHIBICIJU MIGRACIJE I INVAZIJE PREKO MODULACIJE TRANSFORMIRAJUĆEG FAKTORA RASTA β KOJI POSREDUJE U MEZENHIMSKIM ZNAČAJKAMA U87 I U251 STANICAMA..... | 16 |
| 14.1.KORIŠTENE METODE U ISTRAŽIVANJU..... | 16 |
| 14.2.REZULTATI..... | 18 |
| 14.2.1.Učinci kalikozina na staničnu proliferaciju, apoptozu i raspodjelu staničnog ciklusa u U87 i U251 stanicama..... | 18 |
| 14.2.2.Učinak kalikozina na staničnu migraciju i invaziju..... | 19 |
| 14.2.3.Učinak kalikozina na mezenhimska svojstva i MMP u stanicama glioblastoma..... | 20 |
| 14.2.4.Kalikozinom regulirani TGF- β u stanicama glioblastoma..... | 21 |
| 14.2.5.Ektopijska ekspresija TGF- β u U87 stanicama ukinula je antikarcenogeno djelovanje kalikozina..... | 21 |
| 14.2.6.Učinci kalikozina u glioblastomima ksenograft modela..... | 21 |
| 14.3.RASPRAVA..... | 22 |
| 15.IMPLATANT RADIOAKTIVNOG JODA (^{125}I) INHIBIRA RAST STANICA I EMT U LJUDSKIM GBM PREKO ROS-POSREDOVANOG SIGNALNOG PUTA..... | 23 |
| 15.1.KORIŠTENE METODE..... | 23 |
| 15.2.REZULTATI..... | 24 |
| 15.2.1.Implatant radioaktivnog joda (^{125}I) je učinkovitiji od X-zraka za inhibiciju rasta stanica GBM..... | 24 |
| 15.2.2.Utjecaj zračenja na EMT u stanicama GBM..... | 24 |
| 15.2.3.Implatant radioaktivnog joda (^{125}I) suzbija rast i migraciju stanica preko ROS-posredovanog signalnog puta..... | 25 |
| 15.2.4.Implatant radioaktivnog joda (^{125}I) pokazuje veću antitumorsku aktivnost <i>in vivo</i> od X-zraka..... | 26 |
| 15.3.RASPRAVA..... | 27 |
| 16.ZAKLJUČAK..... | 29 |
| 17.LITERATURA..... | 30 |

1.UVOD

Glioblastom je najčešći i najagresivniji tumor središnjeg živčanog sustava (CNS). Prema kriterijima Svjetske znanstvene organizacije (WHO) svrstava se u astrocitom gradusa IV. Ovaj tumor potječe od glija stanica, odnosno astrocita. Glija stanice, zajedno s neuronima, izgrađuju živčani sustav. Neke od vrsta glija stanica su: astrociti, oligodendrociti, ependimociti, radijalne, Schwannove, satelitske stanice. Najzastupljenije su astrociti koje reguliraju vanjsko kemijsko okruženje neurona. Maligne stanice astrociti koje čine glioblastome su nediferencirane ili vrlo slabo diferencirane (stanice tumora ne nalikuju na normalne stanice tkiva iz kojeg nastaju) te imaju visoku mitotičku aktivnost. Glioblastom je tumor gradusa IV, što znači da je zloćudan, invazivno raste i metastazira u okolno tkivo uz prisutnost nekroze (odumiranje stanica pri čemu stanice ne otpuštaju uobičajene kemijske signale imunom sustavu što dovodi do nakupljanja odumrlog tkiva). Stanice dobivaju sposobnost širenja, invazije i otpornosti na apoptozu procesom epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). Također, postoji i reverzibilan proces, mezenhimsko-epitelna tranzicija (MET) kojim migrirajuće tumorske stanice gube mezenhimski fenotip kako bi osnovale sekundarni tumor na udaljenim mjestima. Pacijenti s dijagnosticiranim glioblastomom u prosjeku umiru nakon 17 tjedana bez liječenja, 37 tjedana ako se primjeni operacija uz tretman zračenja i kemoterapije te samo mali broj pacijenata preživi nekoliko godina. Standardni tretman za liječenje glioblastoma je i dalje operacija u kombinaciji s kemoterapijom. Naime, glioblastomi su veoma otporni na takav način liječenja. Zbog toga znanstvenici iz područja onkologije intenzivno rade na istraživanju novih tretmana koji će prevladati difuznu prirodu glioblastoma i njegovu rezistentnost na zračenje. U ovom radu promatrana su dva eksperimentalna rada u kojima se istražuje inhibicijsko djelovanje kalikozina i implantanta radioaktivnog joda (^{125}I) na rast stanica i EMT u glioblastomima. Kalikozin je izoflavon izoliran iz biljke. Zračenje implantantom radioaktivnog joda (^{125}I) podrazumijeva njegovu ugradnju u tumor čime se direktno može djelovati na tumorsko tkivo, a istovremeno poštjedjeti zdravo tkivo.

2.TUMORI OPĆENITO

Tumor je nakupina promijenjenih stanica određenog tkiva u obliku izraslina ili otekline. Tumori nastaju iz jedne ili nekoliko promijenjenih stanica kod kojih dođe do poremećaja normalnih mehanizama rasta i diobe stanica. Tumori se sastoje od dva osnovna dijela: parenhima, koji je građen od pretvorenih ili neoplastičnih stanica po kojem tumor dobiva svoje ime i određuje se njegovo biološko ponašanje te potporne strome, koja je građena od vezivnog tkiva i krvnih žila te je presudna za rast i razvoj tumora. Proces nastanka tumora počinje na molekularnoj razini, promjenama gena povezanih s tumorima. Promjene u genima se javljaju kao posljedica dugotrajne izloženosti kancerogenim čimbenicima (kemijskim, mehaničkim, fizikalnim) te kao posljedica spontanij mutacija. Mutacije odgovorne za nastanak tumora se javljaju u tri skupine gena: onkogenima (mutirani oblici normalnih gena protoonkogeni) čiji proizvodi potiču stanični rast, tumor-supresijskim genima te genima za provjeru i popravak DNA. Nastanak novotvorine je postupni i dugotrajni proces do kojeg dođe nagomilavanjem niza genskih promjena. Osobitost tumora je njegova biološka heterogenost, odnosno tumor sadrži različite populacije stanica s nejednakim osobitostima. Tijekom rasta tumora najmanje su tri mehanizma odgovorna za heterogenost, a to su: različita mogućnost prehrane zbog ograničenog rasta krvnih žila u rastućem tumoru, a očituje se smrću stanica i nekrozom, nastanak novih klonova tijekom progresije tumora i diferencijacija tumorskih stanica unutar jednog klona.



Slika 1. Stanice tumora stalno proliferiraju, dijele se neograničeno i neovisno o vanjskim supresorima rasta. Također izbjegavaju staničnu smrt i imunosni odgovor. Njihov nastanak potaknut je mutacijama, nestabilnostima genoma i nekim upalama. Potiču angiogenezu novog tumorskog tkiva, koja im omogućava invaziju i metastaziranje (Jurlin, 2013).

3.TUMORI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Znanost do danas nije utvrdila koji su uzroci tumora na mozgu. Još uvijek se istražuje utječe li na pojavu tumora korištenje mobitela i WiFi uređaja, ozljede glave, izloženost određenim

kemikalijama te magnetskim poljima dalekovoda i baznih stanica. Dosadašnja istraživanja nisu otkrila pouzdane veze između tih rizičnih čimbenika i tumora mozga.

Osnovna podjela tumora CNS-a je na primarne i sekundarne tumore. Primarni tumori nastaju iz različitih dijelova moždanog tkiva te mogu biti zloćudni (maligni) ili dobroćudni (benigni). Oko 75% moždanih tumora je benigne naravi, dok ostatak čine maligni tumori. Sekundarni tumori su metastaze drugih primarnih tumora (dojke, pluća itd.). Nastaju tako što maligne stanice krvotokom ulaze u lubanjsku šupljinu ili mozak.

Primarni tumori CNS-a dijele se prema klasifikaciji WHO u 14 skupina: 1. astrocitni tumori; 2. oligodendroglijalni tumori; 3. ependimalni tumori; 4. tumori koroidnog pleksusa; 5. drugi neuroepitelni tumori; 6. neuronalni i miješani neuronalno-glijalni tumori; 7. tumori pinealne regije; 8. embrionalni tumori; 9. tumori kranijalnih i perifernih živaca; 10. tumori mozgovnih ovojnica; 11. tumori stanica hematopoeze; 12. tumori zametnih stanica; 13. tumori povezani s obiteljskim sindromima; 14. tumori područja sele. Najbrojniji primarni tumori mozga su gliomi, a unutar gliomske skupine najčešći su astrocitomi.

Prema agresivnosti WHO tumore CNS-a grupira u stupnjeve ili graduse od I do IV. Određivanje gradusa vrlo je važno za liječenje i prognozu bolesti. Gradus I je benigni tumor, najmanje agresivan. Stanice su slične stanicama normalnog tkiva, sporo se umnožavaju i rastu. Postoji mogućnost izliječenja nakon kirurškog uklanjanja. Gradus II je uvjetno zloćudan tumor. Stanice su slične stanicama normalnog tkiva, ali se brže umnožavaju. Može se ponovno pojaviti i napredovati prema višem stupnju maligniteta. Gradus III je maligni tumor. Stanice se razlikuju od stanica normalnog tkiva, brže se umnožavaju. Potrebno je dodatno liječenje kemoterapijom i zračenjem. Gradus IV je maligni tumor. Stanice uopće ne nalikuju stanicama normalnog tkiva, brže se umnožavaju i rastu uz prisutnost nekroze.

Prema kriterijima WHO glioblastomi se svrstavaju u astrocitome gradusa IV.

Simptomi tumora CNS-a ovise o veličini tumora, vrsti tumora i mjestu na kojem se tumor nalazi. Mogu biti uzrokovani pritiskom tumora na okolne strukture, oštećenjem dijela mozga i razvojem povišenog intrakranijalnog tlaka (tlaka unutar lubanje). Najčešći simptomi tumora mozga su: glavobolja (početni simptom u trećine bolesnika, u 70% oboljelih pojavljuje se tijekom bolesti), mučnina i povraćanje (nastaju zbog porasta intrakranijalnog tlaka, koji uzrokuje pomake u dijelovima mozga, što dovodi do kompresije moždanog debla, pojavljuje se u polovici slučajeva), epileptički napadaji (pojavljuju se kod trećine bolesnika kao prvi simptom, a kod 50 do 70 % bolesnika pojavljuju se i tijekom bolesti), promjene kognitivnog funkcioniranja (poremećaji u ponašanju, pamćenju i koncentraciji; pojavljuju se kod petine bolesnika), mentalna i psihomotorna astenija (bolesnik je usporen, sporo i sa stankom odgovara na pitanja, teško se izražava).

4. GLIOBLASTOMI

Glioblastomi su najčešći tumori CNS-a kod odraslih, a glioblastoma multiforme (GBM) čini gotovo polovicu takvih slučajeva. GBM je jedan od najagresivnijih astrocitnih tumora. Izraz

glioblastoma multiforme opisuje njegove histopatološke karakteristike: raznolika morfologija i heterogene populacije stanica koje se razlikuju po mnogim biološkim osobinama kao što su razina proliferacije, invazivnost u okolna tkiva, izgled, otpornost na terapiju itd. Glioblastomi se obično javljaju u subkortikalnoj bijeloj tvari moždanih hemisfera i to najčešće u temporalnom, zatim parijentalnom i frontalnom režnju. Vrlo rijetki su glioblastomi moždanog debla, malog mozga te drugih dijelova središnjeg živčanog sustava. Ovaj tumor može biti vrlo raznolik kako mikroskopski tako i makroskopski. Neka područja mogu biti tvrda i siva dok su druga žuta i mekana. Često su vidljiva i područja nekroze, cista i krvarenja. Još jedna od karakteristika glioblastoma je i agresivno prodiranje tumorskih stanica, odnosno invazija u okolno, zdravo tkivo mozga što doprinosi ponovnoj aktivaciji tumora. Glioblastomi čine 12-15% svih tumora mozga te pogađaju sve dobne skupine, no najviše se javljaju kod osoba iznad 65 godina s nešto većom učestalošću kod muškaraca nego kod žena. Načini liječenja glioblastoma uključuju: kirurško uklanjanje tumora, radioterapiju i kemoterapiju, no unatoč tome smrtnost među pacijentima je vrlo velika. Ovi tumori mogu nastati na dva načina. Jedan način je nastanak iz bolje diferenciranih astroglialnih tumora te tako nastaje oko 10% svih glioblastoma. Tako nastale glioblastome nazivamo sekundarnima. Drugu, puno veću skupinu, čine glioblastomi koji nastaju *de novo*. Oni čine oko 90% glioblastoma te ih nazivamo primarnima. Unatoč velikoj histološkoj sličnosti, ove dvije vrste glioblastoma razdvajaju mnoge druge karakteristike kao što su dob pacijenata (primarni uglavnom kod muškaraca s oko 62 godine starosti, dok su sekundarni češći kod žena s oko 45 godina starosti), razina molekularnih mehanizama uključenih u nastanak tumora, uzorci ekspresije RNA i proteina te odgovor na radioterapiju i kemoterapiju. Općenito, glioblastomi pokazuju najviše genskih promjena s obzirom na ostale astrocitne tumore. Neke od tih promjena su: amplifikacije onkogeni i njihova prekomjerna ekspresija, mutacije u genima tumor-supresora i proteinima za popravak DNA, gubitak heterogenosti nekih dijelova kromosoma te epigenetičke promjene poput hipermetilacije promotorskih regija. Upravo ove promjene rezultiraju nekontroliranom proliferacijom, gubitkom normalnih kontrolnih mehanizama staničnog ciklusa, sprječavanjem apoptoze, neučinkovitim popravkom oštećene DNA, povećanjem genske nestabilnosti i gubitkom kontrole nad signalnim putevima faktora rasta (Bačić, 2014).

5. EPITELNO-MEZENHIMSKA TRANZICIJA

Tumor postaje zloćudan kad počinje invazivno rasti i metastazirati u okolno normalno tkivo. Ovi su događaji povezani s promjenama u vezi tumorskih stanica s drugim stanicama i ekstracelularnim matriksom. Dio tumorskih stanica dobiva sposobnost invazije, širenja i otpornosti na apoptozu procesom epitelno-mezenhimske tranzicija (EMT), kojim poprimaju fenotip mezenhimskih stanica. U normalnom tkivu se EMT događa tijekom embriogeneze i zacjeljivanja rana, te je pod kontrolom transkripcijskih faktora. Ekspresijom tih transkripcijskih faktora u različitim kombinacijama u tumorskom tkivu pokreće se EMT. Neka od staničnih svojstava koja kontroliraju ti transkripcijski faktori su gubitak adherentnih veza između stanica i adhezije za bazalnu laminu, gubitak polarnosti stanica, promjena morfologije stanica iz poligonalne, karakteristične za epitelne stanice, u vretenastu, karakterističnu za fibroblaste te ekspresija enzima koji degradiraju stanični matriks. Smanjuje

se ekspresija E-kadherina, ključnog za kontakte između stanica i glavnog supresora mobilnosti stanica. Rezultat ovih promjena je sposobnost tumorskih stanica da se šire lokalno i ulaze u krvotok i limfni sustav te metastaziraju (Jurlin, 2013). Osim toga, indukcija EMT uzrokuje uspostavljanje određenih svojstava tumorskih matičnih stanica. Naime, na njihovoj površini dolazi do ekspresije markera karakterističnih za matične stanice tkiva iz kojih su potekle. Takve matične stanice su visoko invazivne i otporne na kemoterapiju i radioterapiju te su odgovorne za ponovni rast i širenje tumora nakon terapije.



Slika 2. Epitelno-mezenhimska tranzicija u stanicama glioma (Iwadate, 2016)

6.KLASIFIKACIJA EMT

EMT je klasificirana u tri različite vrste.

Prva vrsta EMT je bitan mehanizam potreban za prijelaz primitivnih epitelnih stanica u embriju u pokretne mezenhimske stanice, koje su potrebne za gastrulaciju i migraciju stanica neuralnog grebena. Mezenhimske stanice generirane pomoću EMT postanu sekundarne epitelne stanice u mezodermalnim i endodermalnim organima pomoću reverzibilnog procesa, odnosno mezenhimsko-epitelne tranzicije (MET). Na taj način prva vrsta EMT ima jako važnu ulogu tijekom embriogeneze u generiranju morfološki i funkcionalno različitih tipova stanica, uključujući mezenhimske i sekundarne epitelne stanice tijekom procesa MET.

Druga vrsta EMT se pojavljuje kod odraslih te sudjeluje u regeneraciji tkiva, zacijeljivanju rana i fibrozi (zadebljanje i ožiljkasto pretvaranje vezivnog tkiva, najčešće kao posljedica upale ili oštećenja). Fibroze organa posredovane su fibroblastima i upalnim stanicama koje izlučuju brojne upalne signale pored komponenta kompleksa izvanstaničnog matriksa, koji se sastoji od elastina, kolagena, tenascina i laminina. Prijelaz epitelnih stanica u fibroblaste javlja se tijekom nekoliko dana. Pokazano je da fibroblasti dijele određene genetičke mutacije s tumorskim stanicama, što sugerira da se druga vrsta EMT pojavljuje prije punog napada tumorigeneze.

Treća vrsta EMT zabilježena je u tumorskim stanicama koje mijenjaju fenotip kako bi povećale migraciju, invazivnost i metastaziranje. Nedavna istraživanja su pokazala da TGF- β može inducirati EMT u epitelnim tumorskim stanicama. Aktivacija EMT preko tumorskih mikrookolišnih podražaja predstavlja kritični mehanizam za stjecanje visoko malignih

fenotipova tumorskih stanica. U trećem tipu EMT određene tumorske stanice mezenhinskog fenotipa podliježu MET kako bi se formirali metastazirani tumori na udaljenim mjestima (Iwadate, 2016).

7. EMT-INDUCIRAJUĆA MIKROOKOLINA

Genske promjene kojima se podvrgavaju tumorske stanice čine ih osjetljivima za EMT-inducirajuće signale. Reverzibilnost EMT sugerira da genske promjene, koje su rezultat raznih čimbenika iz staničnog mikrookoliša, generiraju visoko agresivni fenotip tumora.

Hipoksija (nedostatak kisika u stanicama i tkivu) se smatra potencijalnim induktorom EMT u različitim tipovima epitelnih tumora. U gliomima, upalni procesi ili hipoksija unutar tumora ili susjednog normalnog tkiva, mogu rezultirati jačanjem cirkulacije mijeloidnih stanica u stromu (vezivna komponenta parenhimskih organa kroz koju obično prolaze živci, krvne i limfne žile). Mijeloidne stanice otpuštaju brojne faktore rasta, uključujući TGF- β , PDGF, EGF i FGF2. Ti faktori rasta uzrokuju promjene u razini transkripcijskih faktora koji su potrebni za pokretanje EMT te brojnih proteaza koje povećavaju invazivnost u okolni zdravi mozak. Dakle, stanice glioblastoma koje su pod utjecajem određenih signalnih molekula, su podložne EMT kod nedostatka kisika (Iwadate, 2016).

8. MOLEKULARNA NAČELA EMT

Progresiju tumora predstavlja integrirani kompleks molekularnih promjena koje u konačnici rezultiraju lokalnom invazijom i širenjem malignih stanica. Ovi dinamični i agresivni procesi zahtijevaju EMT i progresiju glioblastoma preko stanica-stanica i stanica-matriks interakcija, razgradnju i remodeliranje izvanstaničnog matriksa, reorganizaciju citoskeleta te pojačano migracijsko ponašanje tumorskih stanica. EMT potiče gubitak epitelnog fenotipa i olakšava staničnu pokretljivost i invazivnost.

U normalnim fiziološkim uvjetima epitelne stanice su odvojene od izvanstaničnog matriksa (ECM) pomoću bazalnih membrana. Ova barijera sprječava interakcije između epitelnih stanica i njihove mikrookoline. Destabilizacija bazalne membrane omogućuje kontakt između različitih signalnih proteina u ECM i epitelnih stanica. Dobivena stanična signalizacija može poboljšati napredovanje EMT aktiviranjem različitih unutarstaničnih signalnih puteva (Pala i sur., 2013).

8.1 TRANSKRIPCIJSKI FAKTORI

8.1.1. SNAI-1/2 i ZEB-1/-2

Regulacija transkripcije gena transkripcijskim faktorima važan je mehanizam uključen u regulaciju gena. Prekomjerna ekspresija nekih transkripcijskih represora kao što su SNAI-1, SNAI-2 (SLUG), ZEB-1 i ZEB-2 potiče mezenhimske transformacije te kontinuirano stjecanje malignih obilježja tumorskih stanica. Ti proteini su u mogućnosti da se direktno

vežu na promotor E-kadherina i tako blokiraju njegovu transkripciju. E-kadherin (epithelial kadherin) je transmembranska stanična adhezijska glikoproteinska molekula prisutna u većini tkiva koja preko Ca^{2+} ovisnih homofilnih veza sudjeluje u stvaranju međustaničnih pričvrtnih spojeva vežući se za izvanstaničnu domenu E-kadherinske molekule druge stanice. Poremećaj funkcije E-kadherina dovodi do gubitka međustaničnih veza. Pored ključne uloge u stvaranju pričvrtnih spojeva u stanici i očuvanju apikobazalne polarizacije stanice, E-kadherin ima ulogu regulatora različitih procesa u stanici, poput proliferacije, migracije, apoptoze i održavanja polariteta stanice. E-kadherin upravlja ovim procesima u stanici slanjem signala preko glavnog medijatora β -katenina. Gubitkom funkcionalnog E-kadherina, a time i međustaničnih kontakata u pričvrtnim spojevima, dolazi do odvajanja tumorskih stanica od glavne tumorske mase, stanice postaju mobilne i u dodiru s izvanstaničnim matriksom metastaziraju (Ožanić Bulić, 2011). Nadalje, povećana ekspresija SNAI-1 ili SNAI-2 smanjuje ekspresiju različitih epitelnih markera (proteini okcludin i kladin koji su komponente čvrste veze između stanica te protein citokeratin koji formira filamente koji pružaju mehaničku potporu epitelnim stanicama) i povećava ekspresiju mezenhimalnih markera (proteini vitronektin i fibronektin čija je funkcija adhezija stanica u plazmi). Transkripcijska aktivnost SNAI-1 proteina uglavnom je regulirana njegovom substaničnom lokalizacijom. Fosforilacija SNAI-1 rezultira njegovim prijenosom iz jezgre u citoplazmu što dovodi do inaktivacije proteina. Mezenhimalne stanice izlučuju TGF- β koji inducira premještanje SNAI-1. ZEB-1 inhibira ekspresiju čimbenika odgovornih za apikobazalnu polarizaciju stanica. Primijećeno je da pacijenti s GBM i visokom razinom ZEB-2 pokazuju znatno ranije pojavljivanje malignih transformacija u odnosu na pacijente s niskom razinom ZEB-2 (Iwadata, 2016).

8.1.2. TWIST-1

Bitni transkripcijski faktori koji su uključeni u EMT su i TWIST-1 i STAT-3/-5. TWIST-1 je protein s heliks-heliks strukturom koji je transkripcijski aktivan tijekom diferencijacije stanica. Njegova funkcija unutar EMT je represija transkripcije gena za E-kadherin te aktivacija transkripcije gena za N-kadherin (povećava afinitet tumorskih stanica za endotel krvnih žila) i ovime poticanje mezenhimalne transformacije što rezultira agresivnijim fenotipom i progresijom glioblastoma. TWIST-1 je uključen u regulaciju programirane smrti stanice tako što inhibira protein p53. Protein p53 je u normalnim stanicama prisutan u aktivnom obliku. Gen za njegovu sintezu lociran je na kromosomu 17, a sudjeluje u procesima replikacije DNA i transkripcije. Protein p53 ima sposobnost da zaustavi rast stanice. Oštećenja DNA potiču transkripcijsku aktivnost p53 i njegovo nakupljanje u stanici, a posljedično dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljivanja oštećene DNA ili do pokretanja apoptoze stanice ako su ta oštećenja nepopravljiva. p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina,

ili da inducira gene koji povećavaju produkciju reaktivnih spojeva kisika, koji su snažni aktivatori oštećenja mitohondrija i apoptoze (Žlender, 2003). Putem inhibicije proteina p53, TWIST-1 omogućuje preživljavanje stanica sprječavajući zaustavljanje rasta te potiče invaziju tumorskih stanica. Osim toga, ovaj proces može dovesti do povećanog otpora na različite kemoterapeutike. Pokazano je da inhibicija ekspresije Twist proteina rezultira značajnom redukcijom rasta i formiranja GBM matičnih stanica, što predstavlja potencijalnu mogućnost terapije u smjeru inhibicije ekspresije istog.

8.1.3. STAT-3

Aktivacija pretvornika signala i aktivatora transkripcije 3 (STAT-3) je povezana s malignim tumorima i lošom prognozom. Obitelj proteina STAT je fosforilirana pomoću JAK spojene na receptor te se zatim dimerizira. Zatim STAT dimer ulazi u jezgru te se spaja s određenom promotorskom regijom na DNA što aktivira transkripciju određenih gena što ima ključnu ulogu u progresiji staničnog ciklusa, EMT, antiapoptozu i metastaziranju. STAT-3 je važan faktor koji konvergira mnoge stanične puteve. Stoga, izravna ili neizravna inhibicija STAT-3 predstavlja potencijalnu medicinsku metu u liječenju glioblastoma. Nadalje, STAT-3 ulazi u interakciju s EGFR i tako posreduje u ekspresiji TWIST-1, a TWIST-1 posreduje u EMT (Pala i sur., 2013).

8.1.4. STAT-5

Pretvornik signala i aktivator transkripcije 5 (STAT-5) je bitan transkripcijski faktor koji je uključen u regulaciju mnogih gena, olakšavanje staničnog rasta, migracije i pokretljivosti. STAT-5 dimeri vežu se na specifične DNA promotorske regije te posreduju u staničnom odgovoru. Deregulacija STAT-5 nedavno je opisana u mnogim zloćudnim bolestima kao što su rak prostate, rak dojke i karcinom stanica pločastog epitela glave i vrata (SCCHN). Kod SCCHN aktivnost STAT-5 rezultira povećanom otpornošću tumorskih stanica na erlotinib (terapeutski EGFR inhibitor) (Pala i sur., 2013).

8.1.5. SOX-2

Transkripcijski faktor SRY-box 2, također poznat kao SOX-2, je transkripcijski faktor koji ima važnu ulogu tijekom razvoja živčanog sustava i progresije tumora (Pala i sur., 2013).

8.1.6. NF- κ B

NF- κ B pripada obitelji transkripcijskih faktora čija je aktivnost važna za održavanje i promicanje invazivnog fenotipa tumorskih stanica. NF- κ B se veže na DNA sekvence kao hetero ili homodimer i tako regulira različite stanične procese. Na ovaj način je regulirano nekoliko gena koji kodiraju za proteine koji su uključeni u stanični ciklus (ciklin D1, c-MYC), staničnu adheziju ili upalne procese (interleukin-2, interleukin-6, interleukin-8). Signalizacija putem NF- κ B rezultira povećanom ekspresijom SNAI-1 i ovime doprinosi progresiji EMT. Osim toga, aktivnost NF- κ B u korelaciji je s ekspresijom ZEB-1, ZEB-2 i TWIST-1, koji su drugi snažni induktori EMT. Vimentin, intermedijarni filamentni protein, doprinosi mezenhimske transformaciji stanice. Stanice dobivaju vretenasti oblik i olabavljaju se veze sa susjednim stanicama. Dakle, ekspresija vimentina potiče migraciju tumorskih

stanica. Nuklearni faktor- $\kappa\beta$ aktivira vimentin promotor i na taj način povećava ekspresiju vimentina (Pala i sur., 2013).

8.2. RECEPTORI

8.2.1. INTEGRINI

Integrini se sastoje od velike ligand-vezujuće izvanstanične domene, transmembranske domene, te relativno male citoplazmatske domene koja je povezana s citoplazmatskim strukturnim i signalnim proteinima. Izvanstanična domena funkcionira kao receptor za proteine ECM (npr. fibronektin, kolagen, vitronektin) i druge molekule odgovorne za adheziju stanica. Vežanje izvanstaničnih liganada na integrine prenosi signal unutar stanice, u procesu koji se naziva signalizacija iz okoline u stanicu, što ima utjecaj na proliferaciju, diferencijaciju i pokretljivost stanica. Integrini nemaju kinaznu aktivnost. Za prijenos signala iz okoline u stanicu moraju se povezivati s adaptornim proteinima koji povezuju integrine sa citoskeletom, citoplazmatskim kinazama i transmembranskim receptorima faktora rasta. Vežanje liganda na integrine aktivira različite protein kinaze, kao što su FAK i Src obitelj nereceptorskih protein tirozin kinaza. FAK je regulator signalnih puteva unutar tumorskog mikrookoliša. Tijekom razvoja, te u brojnim tumorima FAK promiče pokretljivost, diferencijaciju i preživljenje stanice.

Kao posljedica smanjene ekspresije E-kadherina, gubitka adhezije između stanica i reorganizacije aktinskog citoskeleta tijekom EMT, stanice stječu mezenhimski fenotip. Ekspresija mezenhimskih citoskeletnih proteina kao što je vimentin i taloženje ECM proteina kao što su kolagen i fibronektin potiče aktivaciju integrina i njihovih signalnih puteva. Prvo dolazi do dimerizacije FAK, što vodi do autofosforilacije, vežanja SRC kinaze, fosforilaciju posredovanu SRC u aktivacijskoj regiji FAK i formaciju FAK-SRC kompleksa. FAK-SRC kompleks se može povezati s dvije glavne ciljane molekule, adaptorni protein paksilin i p130Cas, koji dalje prenose signale bitne za adheziju i pokretljivost stanice. Pokazano je da inhibicija SRC-a povećava osjetljivost stanica tumora na djelovanje protutumorskih lijekova, a inhibicijom fosforilacije SRC-om smanjuje se sposobnost stanica da adheriraju na podlogu i migriraju što je jedan od preduvjeta tumorskih stanica da prodiru u druga tkiva i organe i tamo stvaraju metastaze. Drugi signalni put kojim FAK utječe na migraciju uključuje interakciju s PI3K, gdje aktivacija PI3K potiče migraciju putem nizvodnog proteina Rac, koji je ključni regulator kortikalnog aktina (kortaktina) i lamelopodija u procesu migracije stanice (Faraho, 2015).

8.2.2. EGFR

EGFR je transmembranski glikoprotein koji pripada EGFR (HER) obitelji, koju čine četiri člana (HER 1-4) koji dijele sličnu strukturu. EGFR/HER1 sastoji se od vanjskih i unutarnjih domena. Vanjski dio sadrži regije za koje se mogu vezati signalne molekule kao što su EGF, HGF, FGF, IGF-1 ili TGF- α . Unutarnja domena sadrži tirozin kinazu (TK), koja služi za

fosforilaciju i aktivaciju različitih signalnih puteva, kao što su fosfolipaza CY, PI3K, JAK-2 i MAPK. Obitelj receptora humanih epidermalnih faktora rasta nalaze se na mnogim tipovima stanica te sudjeluju u prijenosu signala na unutarstanične dijelove te se time reguliraju različite funkcije stanica, kao što su proliferacija ili diferencijacija.

Fosforilacija i defosforilacija su ključna zbivanja kod unutarstaničnih interakcija. Deregulacija njihove ravnoteže doprinosi razvoju invazivnog staničnog fenotipa. Nakon aktivacije signalnom molekulom dva receptora tirozin kinaze se povezuju u dimer te dolazi do fosforilacije tirozinskih ostataka koji stvaraju komplekse s proteinima koji posjeduju SH2 domene.

Aktiviranje RAS proteina pojavljuje se u mnogim tumorima. Ovaj signalni put integrira različite podražaje koji potiču transformaciju stanica, ekspresiju gena i progresiju tumora. RAS je mali GTP-vezani protein koji aktivira serin-treonin kinazu RAF. RAF fosforilira kinazu MEK, koja se onda aktivira te fosforilira i aktivira kinazu MAPK. MAPK aktivira različite transkripcijske faktore kao što su faktori FOS, JUN ili SLUG. Na taj način RAS potiče aktivaciju EMT. Nadalje, RAS je u mogućnosti poticati EMT aktivacijom PI3K. PI3K je uključena u regulaciju staničnog ciklusa fosforilacijom inhibitora ciklin-ovisnih kinaza. PI3K može biti aktivirana putem RAS ili direktno putem TK receptora. PI3K je lipidna kinaza, njena aktivacija generira PIP3 na unutarnjoj strani plazmatske membrane, koji aktivira serin-treonin kinazu AKT (protein kinaza B), koja se može premjestiti u jezgru i sudjelovati u regulaciji gena preko PDK-1. Najčešća molekularna promjena u GMB je prekomjerna ekspresija EGF. To je zabilježeno u više od 50% stanica glioblastoma. Postoji nekoliko mehanizama koji mogu uzrokovati disfunkciju receptora. Amplifikacija gena za EGFR je najčešći razlog koji dovodi do prekomjerne ekspresije proteina.

TERAPEUTSKI EGFR INHIBITORI: Uvedeno je nekoliko lijekova koji ciljaju na EGFR. TK inhibitori erlotinib i gefitinib natječu se s adenzin trifosfatom u vezanju s intracelularnom TK domenom. Erlotinib je odobren za liječenje metastatskog raka pluća ne-malih stanica (NSCLC) te u kombinaciji s gemcitabinom za metastatski rak gušterače. Gefitinib se koristi za metastatski NSCLC. Još jedna mala molekula koja je EGFR-TK inhibitor je lapatinib, koja inhibira EGFR i HER-2 te ima odobrenje za liječenje uznapredovalog ili metastatskog karcinoma dojke. Nažalost, klinička primjena kod glioma nije pokazala nikakvu korist u odnosu na standardnu terapiju. Druga mogućnost za inhibiciju EGFR signalizacije sastoji se u sprječavanju vezanja signalnih molekula. U tu svrhu istražuju se monoklonska protutijela, poput cetuximab. Međutim, njihova molekulska masa otežava njihovo prodiranje kroz krvno-moždanu barijeru. Često je koncentracija sredstva nedovoljna da se dobije značajno terapijsko djelovanje unutar ciljnog tkiva (Pala i sur., 2013).

8.2.3. NOTCH

NOTCH je receptor na površini stanice koji predstavlja važnu ulogu u razvoju brojnih tipova stanica i tkiva. Signaliziranje NOTCH-a je primarni induktor EMT u brojnim epitelnim tumorima. NOTCH je povezan s aktivacijom PI3K/AKT signalnog puta koji regulira temeljne stanične funkcije, uključujući transkripciju, translaciju, proliferaciju, stanični rast,

preživljavanje i apoptozu. Inhibicija ovog signalnog puta reducira matične stanice u GBM. (Iwadata, 2016).

8.2.4. CD44

CD44 je hijaluronski receptor koji međusobno djeluje s ligandima kao što su kolagen, osteopontin i matriks metaloproteinazama. Osim standardne izoforme CD44, alternativnim povezivanjem nastaje 11 ostalih izoforma CD44 varijanti. GBM s visokom razinom mRNA za EMT indicirajuće molekule, uključujući SLUG i CD44, povezan je s povećanjem otpornosti na terapije i invaziju tumora. Međutim, funkcionalni podaci o posredovanju CD44 u GBM nisu potpuno razjašnjeni (Iwadata, 2016).

8.3. SIGNALNE MOLEKULE

TGF- β je zapažen kao snažni induktor EMT. Ovaj protein pripada TGF- β superobitelji te se pojavljuje u tri izoforme: TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 koje sudjeluju u proliferaciji i diferencijaciji stanica.

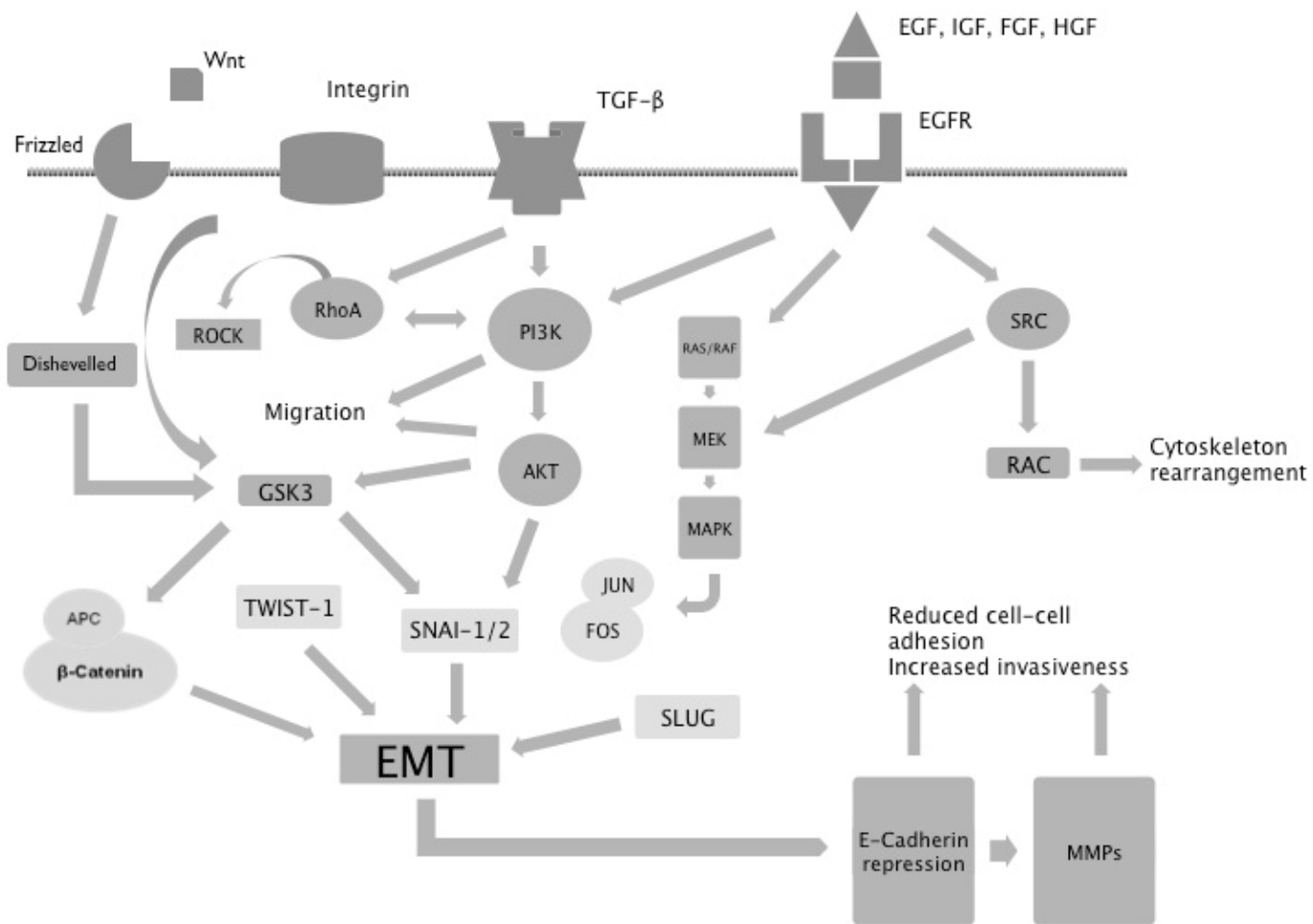
TGF- β može inducirati apoptozu u brojnim vrstama stanica preko signalnog puta koji uključuje fosforilaciju pripadnika porodice transkripcijskih faktora SMAD, koji se potom translociraju u jezgru gdje utječu na ekspresiju određenih gena. Ekspresijom tih gena nastaju proteini p15, p21 i p27 koji se vežu za CDK i tako spriječavaju nastajanje kompleksa ciklin ovisnih kinaza s ciklinima. Ti kompleksi su potrebni za pokretanje određenih faza staničnog ciklusa. Na taj način TGF- β djeluje kao tumor supresor.

Međutim, u invazivnim tumorima TGF- β mijenja ulogu te sudjeluje u napredovanju tumora. TGF- β može djelovati bez SMAD signalizacije, primjerice može pokrenuti MMP kaskadu i tako poticati malignu transformaciju stanica. Signalizacija pomoću TGF- β regulira ekspresiju transkripcijskih faktora TWIST-1, SNAI-1 i ZEB, što u konačnici regulira ekspresiju proteina kao što su kladin, dezmozoplakin (održava kontakt između stanica), MMP ili fibronektin. U tom kontekstu, TGF- β djeluje kao važan regulator EMT. TGF- β aktivira TK receptore preko PI3K koja zatim kontrolira AKT (Protein kinase B) u različitim stanicama. AKT je regulator raznih signalnih kaskada, kontrolira preživljavanje stanica, migraciju i proliferaciju. Aktivacija PI3K-AKT signalnog puta igra važnu ulogu kod EMT (Pala i sur., 2013).

8.4. WNT/ β -KATENIN SIGNALNI PUT

Tijekom tumorom aktiviranog EMT dolazi do specifičnih morfoloških i molekularnih promjena u stanici, od kojih je osobito značajan gubitak E-kadherina. Pored uloge u regulaciji međustanične adhezije, E-kadherin je važan regulator WNT signalnog puta djelujući preko njegova središnjeg dijela β -katenina. Slobodni β -katenin se u citosolu brzo razgrađuje kada WNT signalni put nije aktivan. Aktivacijom WNT signalnog puta dolazi do inhibicije razgradnje β -katenina i njegovog nakupljanja u jezgri stanice gdje regulira ekspresiju ciljnih

gena. Produkti gena WNT su WNT glikoproteini koji djeluju kao ligandi u aktivaciji receptorima posredovanih signalnih puteva važnih u kontroli diferencijacije, proliferacije i pokretljivosti stanica. WNT signalni put je isto tako povezan s epitelno mezenhimskom tranzicijom (EMT) stanica izravnom aktivacijom transkripcijskih represora E-kadherinskog gena CDH1 iz obitelji SNAI-2 ili indirektnom aktivacijom transkripcijskog faktora ZEB-1 putem drugih WNT ciljnih gena. Tumorske stanice različito se ponašaju ovisno da li se radi o stanicama u samoj tumorskoj masi ili metastazi. Stanice na tumorskom rubu poprimaju mezenhimski fenotip (EMT), dok u središnjim dijelovima metastaza stanice ponovno poprimaju epitelna svojstva (MET), dolazi do ponovne izraženosti E-kadherina i uspostavljanja pričvrstnih spojeva. Upravo ponovna lokalizacija β -katenina u staničnoj membrani dovodi do gašenja WNT signalnog puta i diferencijacije epitelnih stanica (Ožanić Bulić, 2011).



Slika 3. Signalni putevi povezani s EMT (Pala i sur., 2013).

9. IZVANSTANIČNI MATRIKS I EMT

Izvanstanični matriks (ECM) je nestanična komponenta organizma sastavljena od proteina i polisaharida, nalazi se u svim tkivima i organima. Služi kao bitna strukturna potpora stanicama i kao fizička prepreka ili kao selektivni filtar za topljive molekule. Dinamična je struktura koja se stalno preoblikuje. ECM vezanjem faktora rasta i interakcijom s receptorima na površini stanica potiče okidanje signala bitnih za morfogenezu tkiva, diferencijaciju, proliferaciju, adheziju i migraciju stanica te staničnu smrt (Stojanović, 2014).

Tumorske stanice eksprimiraju MMP koje su topive u izvanstaničnom matriksu i mogu izazvati invaziju tumora, migraciju i metastaziranje. MMP predstavljaju obitelj od 23 strukturno povezanih cink-ovisnih endopeptidaza koje imaju sposobnost da razgrađuju ECM. MMP-2 i MMP-9 su regulirani sa SNAI-1 i SNAI-2 (SLUG). EMT posreduje u deregulaciji SNAI-1 i SLUG što potiče aktivnost MMP-2 i MMP-9 čime se povećava invazivna i migracijska aktivnost tumorskih stanica. Stromelizin, poznat kao MMP-3, potiče EMT indukcijom reaktivnih kisikovih čestica (ROS) koje rezultiraju pojačanom ekspresijom SNAI-1 (Pala i sur., 2013).

10. MicroRNA (miRNA) KOJE REGULIRAJU EMT U GLIOMIMA

MicroRNA (miRNA) su nekodirajuće RNA molekule koje sadrže 20-23 nukleotida. Nedavna istraživanja pokazala su da određene miRNA mogu regulirati ekspresiju ciljnih gena, uključujući onkogene i tumor supresijske gene. Reguliraju ekspresiju gena tako što se vežu na komplementarne regije mRNA molekula koje su nastale transkripcijom tih gena. Svaka miRNA ima stotinu ciljnih gena. Kontrola ekspresije gena pomoću miRNA jedan je od najbitnijih modulnih procesa kod diferencijacije stanica tijekom normalne embriogeneze. Brojne studije pokazale su da miRNA može imati funkciju kao negativni regulator ekspresije tumor supresijskih gena u različitim tumorima. U usporedbi s normalnim tkivom mozga, u GBM tkivu pokazana je povećana količina oko 253 i smanjena količina oko 95 takvih regulatornih miRNA molekula. Oko 85% tih miRNA molekula još nije funkcionalno karakterizirano. Neke od prekomjerno izraženih miRNA su miR-10b, miR-130b, miR-30a-5p i miR-494 koje utječu na procese kao što su proliferacija, rast tumora, invazivnost i angiogeneza. miRNA molekule koje koče rast tumora i invazivnost te čija je količina u GBM smanjena su miR-let-7b/I, miR-15b/miR-152, miR-146b-5p, miR-410, miR-590-3p, miR-661 i miR-34a.

MicroRNA-10b je prva za koju je uočeno da potiče metastaziranje različitih tumora. U glioblastomima potiče invaziju stanica tako što regulira ekspresiju invazivnih faktora MMP-14 i uPAR.

MicroRNA-130b zabilježena je u značajno većoj razini u primarnim gliomima IV stupnja u odnosu na gliome II stupnja. Potiče invaziju i migraciju stanica glioma tako što regulira ekspresiju PPAR γ .

MicroRNA-30a-5p se nalazi u većoj količini u gliomima u usporedbi sa zdravim tkivom mozga. Njezina razina ekspresije je u pozitivnoj korelaciji sa stupnjem malignosti tumora. Inhibicija miR-30a-5p suzbija rast stanica glioma. NCAM je molekula na površini stanice u

živčanom sustavu i sudjeluje u brojnim biološkim procesima uključujući migraciju stanica. Uvođenje NCAM u stanice glioma inhibira rast stanica i invaziju. MicroRNA-30a-5p potiče rast i invaziju stanica glioblastoma tako što potiskuje NCAM (Ye i sur., 2016).

11. EMT INDUCIRANA RADIJACIJOM

Radioterapija je glavna metoda za liječenje tumora te također ima ključnu ulogu u liječenju GBM. Ipak, zračenje potiče migraciju i invaziju stanica putem ekspresije TGF- β , EGF, VEGF i HGF. Kod stanica glioma koje su rezistentne na zračenje dolazi do ekspresije određenih gena koji potiču EMT. Primijećena su dva različita puta koja su uključena u indukciju EMT radijacijom u malignim gliomima: TGF- β , iz mezenhimskih stanica u tumorskom okruženju, koji izaziva aktivaciju SMAD2/3; dok reaktivni metaboliti kisika aktiviraju ERK1/2, što dovodi do premještanja SNAI-1 u jezgru. Neki podaci ukazuju da EMT ima ključnu ulogu u stjecanju rezistencije na zračenje. Nadalje, određeni dokazi upućuju na to da je takva uloga EMT, u generaciji rezistentnih tumorskih stanica, povezana s nakupljanjem markera matičnih stanica. NOTCH i WNT/ β -katenin signalni putevi su bitni za održavanje matičnih stanica i povezani su s rezistencijom GBM na radiozračenje. Daljnji važan aspekt bioloških učinaka terapije zračenjem na GBM je indukcija hipoksije i nekroze. Tkivna hipoksija direktno inducira EMT i skupljanje mijeloidnih stanica u tumorskim tkivima. Mijeloidne stanice izlučuju TGF- β što dovodi do indukcije HIF-1 α koji potiče malignu progresiju glioma stanica (Iwadata, 2016).

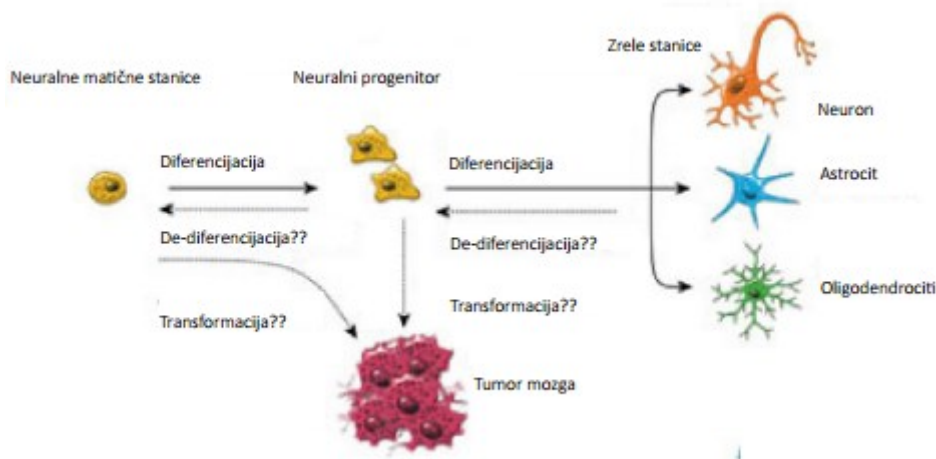
12. EMT INDUCIRANA S BEVACIZUMABOM

Bevacizumab je monoklonsko protutijelo koje je stvoreno s namjerom da prepozna i veže se za tipičnu strukturu koja se nalazi u određenim stanicama u tijelu ili cirkulira u tijelu. Bevacizumab se veže za VEGF, protein koji cirkulira u krvi i omogućava rast krvnih žila. Vežanjem za VEGF bevacizumab neutralizira aktivnost VEGF-a. Posljedično se smanjuje vaskularizacija tumora, normalizira se preostala krvna opskrba tumora, i na taj način se usporava tumorski rast (Bouche, 2011.). VEGF je jedan od najvažnijih faktora koji omogućava angiogenezu (nastajanje novih krvnih žila tzv. pupanjem postojećih krvnih kapilara) što rezultira rastom tumora kod GBM (stimulira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica). Inhibicija VEGF-VEGF receptor (VEGFR) signalnog puta pomoću anti-VEGF terapije (uključuje upotrebu bevacizumaba) i VEGFR inhibitora (uključuje sunitinib) je obećavajuća strategija u terapiji tumora. Bevacizumab je učinkovit kod produljenja života pacijenata s nedavno dijagnosticiranim GBM. Tijekom ranih faza terapije s bevacizumabom poboljšava se oksidacija tumora kroz proces vaskularne normalizacije. Međutim, s produljenjem liječenja s bevacizumabom, na sličan način kao i kod terapije zračenjem, tumor kod nedostatka kisika izravno ili neizravno potiče mezenhimski fenotip. Hipoksija izaziva otpuštanje HIF-1 α iz stanica glioma i zatim privlači mijeloidne stanice, uključujući makrofage

i granulocite, iz koštane srži u tkiva glioma. U mijeloidnim stanicama se otpušta TGF- β koji zatim pokreće EMT u stanicama glioma. Mijeloidne stanice luče i druge faktore rasta, uključujući IL-6, IL-10 i MMP. TGF- β , uz VEGF, također sakuplja matične stanice u tkivu glioma, što utječe na daljnji razvoj GBM (Iwadate, 2016).

13. KANCEROGENE MATIČNE STANICE

Matična stanica je biološka stanica koja je određena dvama karakteristikama: sposobnošću diferenciranja i samoregeneracije. Matične stanice se mogu podijeliti prema njihovom podrijetlu. Jedna od podjela je na embrionalne i adultne matične stanice. Embrionalne matične stanice su tip stanica koje imaju sposobnost razvijanja u bilo koji tip stanica ili tkiva. Adultne matične stanice se nazivaju i somatskim matičnim stanicama. To su nediferencirane stanice koje se mogu naći u tijelu djece i odraslih osoba. Adultne matične stanice se mogu diferencirati u različite vrste tkiva ali nemaju takvu proliferativnu sposobnost poput embrionalnih matičnih stanica. Matične stanice se također dijele prema njihovim mogućnostima diferencijacije na totipotentne, pluripotentne i multipotentne. U središnjem živčanom sustavu neuralne matične stanice su samoobnavljajuće te posjeduju sposobnost diferencijacije u tri neuralne podvrste (neurone, astrocite i oligodendrocite). Proces neurogeneze, koji se sastoji od stvaranja novih neurona od neuralnih matičnih stanica, inače se odvija tijekom prenatalnog razdoblja u području cijelog mozga te u dvije velike regije tijekom odrasle dobi. Specijalna vrsta zvjezdolikih astrocita je smatrana istinskom fiziološkom neuralnom matičnom stanicom. Ti astrociti se dijele asimetrično s niskom brzinom množenja, stvarajući jednu stanicu nalik sebi i jednu stanicu zvanu praotac stanicom s ograničenim potencijalom samoobnavljanja (Korica, 2015).



Slika 4. Diferencijacija matičnih stanica (Kolenc, 2010)

Nedavna istraživanja su dokazala postojanje kancerogenih matičnih stanica kod glioma, čije bi shvaćanje moglo riješiti misterij velike rezistencije glioblastoma na terapiju. Te su stanice zadržale karakteristike matičnih stanica, a odgovorne su za nastanak različitih tipova stanica unutar tumora. U tumorskom su tkivu prisutne u maloj količini te na površini izražavaju

markere kao što su CD133 ili nestin. CD133 predstavlja površinski marker tumorskih matičnih stanica koje imaju povećanu sklonost samoobnavljanju, sudjeluju u mozgovnoj tumorigenezi. Zamijećeno je da tumori višeg gradusa imaju više CD133 pozitivnih stanica u usporedbi sa stanica nižeg gradusa. Ako su rezistentne na kemoterapeutike i radioterapiju, one su odgovorne za ponovni rast i širenje tumora nakon terapije. Dakle, kancerogene matične stanice igraju ključnu ulogu u inicijaciji tumora, rastu, invaziji i ponavljanju. Indukcija epitelno-mezinhimske tranzicije doprinosi uspostavljanju svojstava matičnih stanica. Ciljanje i uništenje tumorskih matičnih stanica predstavlja veliki izazov u provođenju terapije. Bolje razumijevanje mehanizama kojim tumorske matične stanice preživljavaju kemoterapiju te usmjeravanje terapije na te mehanizme moglo bi prevenirati rezistenciju na kemoterapiju (Kolenc, 2010).

14. ISTRAŽIVANJE O UTJECAJU KALIKOZINA NA INHIBICIJU MIGRACIJE I INVAZIJE PREKO MODULACIJE TRANSFORMIRAJUĆEG FAKTORA RASTA β KOJI POSREDUJE U MEZENHIMSKIM ZNAČAJKAMA U87 I U251 STANICAMA

Standardni tretman za liječenje glioblastoma je i dalje operacija u kombinaciji s kemoterapijom. Unatoč razvoju agresivnih tretmana, većina malignih glioma je rezistentna na kemoterapijska sredstva. Stoga, pod hitno je potreban novi terapijski pristup liječenju.

U ovoj studiji istražuju se potencijalni antitumorski efekti kalikozina na humane stanice glioblastoma, uključujući utjecaj na staničnu proliferaciju, apoptozu i stanični ciklus. Kalikozin je o-metilirani izoflavon. Može biti izoliran iz biljaka *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (višegodišnja biljka s cvjetovima u obliku graška; raste u sjevernim i istočnim predjelima Kine, Mongolije i Koreje) i *Trifolium pratense* (crvena djetelina; rasprostranjena u čitavoj Europi). Proučava se njegova inhibicijska aktivnost na migraciju i invaziju U87 i U251 humanih stanica glioblastoma. U tim procesima detektirani su TGF- β te MMP-2/-9. Pokazano je da kalikozin ne samo da može smanjiti volumen tumora, već i suprimira TGF- β i njegove nizvodne molekule. Ovi rezultati su otkrili da je kalikozin potencijalni antitumorski agens u ljudskom glioblastomu.

14.1. KORIŠTENE METODE U ISTRAŽIVANJU

MMT test – MTT test koristi se za praćenje vijabilnost stanica nakon tretmana određenim spojevima u odnosu na netretiranu kontrolu. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) je žuti spoj koji se u živim stanicama reducira u ljubičasti spoj formazan, dok u mrtvim stanicama ostaje žut. Mjerenjem intenziteta ljubičastog obojenja može se odrediti vijabilnost stanica (Maurac, 2011).

Aneksin V-FITC/PI bojanje – Za ranu fazu apoptoze karakteristične su promjene na površini stanice, tj. promjene na nivou membrane. Jedna od membranskih promjena je translokacija PS s unutrašnje na vanjsku površinu plazma membrane. Aneksin V je 35-36 kDa Ca^{2+} zavisan fosfolipid koji ima veliki afinitet za vezanje za PS. Na ovoj osobini Aneksina V zasniva se test senzitivnosti za izlaganje PS na vanjsku stranu stanične membrane i detekcija apoptotskih

stanica u staničnoj populaciji. S obzirom da i kod nekrotičnih stanica PS izlazi na vanjsku stranu membrane, istovremeno bojanje stanica Aneksinom V konjugiranim s fluorescein izotiocijanatom (FITC) i propidium-jodidom omogućava razlikovanje apoptotskih od nekrotičnih stanica.

Određivanje staničnog ciklusa – Tijekom mitotičke diobe, stanice prolaze niz fiziološki definiranih faza, koje konačno rezultiraju stvaranjem dviju novih stanica kćeri od jedne majčinske stanice, u procesu kojeg nazivamo stanični diobeni ciklus. Neoplođene reproduktivne stanice, kao što su jajašce ili spermij, nazivaju se haploidnim stanicama jer sadrže set nesparenih kromosoma (n), za razliku od diploidnih somatskih stanica koje posjeduju set sparenih kromosoma ($2n$). Stanice koje se ne množe, nalaze se u mirovanju (G_0 fazi), dok se proliferirajuće stanice, ovisno o fazi mitoze, razlikuju po sadržaju DNA – od diploidnog $2n$, pa sve do tetraploidnog broja kromosoma $4n$, koji se nađe u stanici neposredno pred podjelom. Diobeni ciklus stanice započinje s G_1 fazom, tijekom koje se stanice pripremaju za replikaciju DNA. Ulaskom u S fazu stanice započinju s udvostručenjem DNA, te se tijekom ove faze količina nuklearne DNA uvećava od razine G_1 faze do potpunog udvostručenja u G_2 fazi, koja predstavlja razdoblje od završetka sinteze DNA do početka diobe. Analiza staničnog ciklusa protočnim citometrom temelji se na činjenici da se stanice u različitim fazama staničnog ciklusa razlikuju u sadržaju DNA. Upotrebom fluorescentne boje propidijeva jodida, koji se veže na jezgrinu DNA, te mjerenjem fluorescencije svake stanice u populaciji moguće je odrediti udio stanica u pojedinoj fazi ciklusa pri čemu je fluorescencija propidijeva jodida u stanicama u fazi G_2/M dvostruko veća od fluorescencije propidijeva jodida u stanicama koje se nalaze u fazi G_0/G_1 . Za stanice u fazi S izmjerena vrijednost fluorescencije nalazi se u rasponu između te dvije vrijednosti (Živčić-Ćosić, 2009).

Test stanične migracije i invazije (engl. transwell assay) – Tijekom ovog testa, stanice su smještene na gornjem sloju permeabilne membrane, a otopina koja sadrži testirani agens se nalazi ispod permeabilne membrane. Nakon perioda inkubacije (3-18 sati), stanice koje su migrirale kroz membranu se oboje i prebroje. Membrana je obično obložena nekom komponentom ekstracelularnog matriksa, koja oponaša okoliš s kojim se tumorske stanice susreću tijekom procesa invazije *in vivo* (Marshall, 2011).

Western blot – To je metoda prenošenja proteina nakon provedene elektroforeze s gela na membranu. Ova metoda povezuje razdjeljivanje proteina elektroforezom i specifičnu detekciju protutijelima. Naime, proteini razdijeljeni elektroforezom ne mogu se u gelu specifično detektirati protutijelima budući protutijela imaju veliku molekularnu masu i ne mogu ući u gel te specifično reagirati sa razdijeljenim proteinima. Iz tog razloga, proteini se „Western blot“ metodom prenesu na membranu koja ima sposobnost nespecifičnog vezanja proteina. Razdijeljeni proteini se iz gela prenose na membranu elektroforetski pri čemu električno polje djeluje okomito na površinu gela te ne mijenja raspored proteina nastao nakon provedene elektroforeze u gelu. Nakon što su proteini nanoseni na membranu specifični protein možemo detektirati protutijelom.

Real-time PCR (od engl. polymerase chain reaction) – To je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNA. Za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA.

Produkti lančane reakcije polimeraze obilježeni fluorescencijskom bojom kontinuirano se analiziraju. Fluorescencijska boja vezana je uz prigušivač, a emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja od njega, tj, vezanjem za dvolančanu (novonastalu) DNA. Dakle, mjerenjem fluorescencije mjeri se nastala DNA jer količina fluorescencije razmjerna je količini PCR proizvoda.

Ksenograft model – Ženke miševa stare šest tjedana, tjelesne mase 20-25 g, smještene individualno u ventiliranim kavezima te sa slobodnim pristupom hrani i pitkoj vodi. Količina od 0.5×10^7 U87 stanica u 0.1 mL PBS injektira se u desnu slabinu miša. Veličine tumora su mjerene pomoću kalipera, a izračunava se prema:

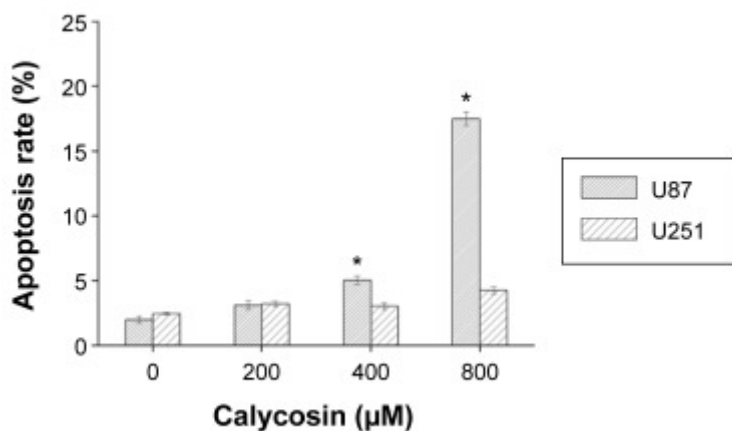
$$\text{Veličina tumora (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{dužina} \times \text{širina}^2$$

Kada tumori porastu na oko 200 mm³, miševi koji nose tumor se podijele u dvije skupine. Kalikozin ili PBS se intravenski injektiraju u miševe u dozi od 7.5 mg/kg u 0.2 mL svaki drugi dan tijekom 22 dana. Veličina tumora i tjelesna težina se mjere dva ili tri puta tjedno. Na kraju pokusa, miševi se anestetiziraju i žrtvovaju pomoću CO₂. Tumorsko tkivo se zamrzne u tekućem dušiku i pohrani na -80°C. Pojedinačni uzorci tumora se analiziraju na razini ekspresije proteina (Nie i sur., 2016).

14.2. REZULTATI

14.2.1. Učinci kalikozina na staničnu proliferaciju, apoptozu i raspodjelu staničnog ciklusa u U87 i U251 stanicama

Citotoksičnost kalikozina prema humanim stanicama glioblastoma ispitana je MTT testom. Kalikozin inhibira proliferaciju stanica samo pri većim koncentracijama (> 400 μM). Međutim, niska koncentracija kalikozina nema jak inhibitorski učinak. Sljedeće je mjerena stopa apoptoze pomoću Aneksin V-FITC/PI bojanja. Pokazano je da 400 μM kalikozina značajno inducira apoptozu kod U87 stanica. Međutim, kod U251 stanica nije bilo značajne razlike u stopi apoptoze čak i kod 800 μM kalikozina.

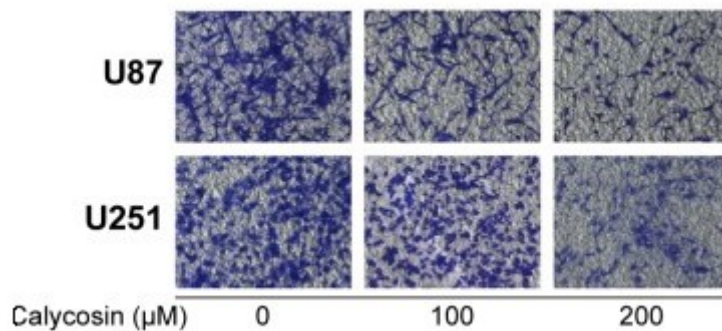


Slika 5. Ovisnost stope apoptoze u U87 i U251 stanicama o koncentraciji kalikozina (Nie i sur., 2016).

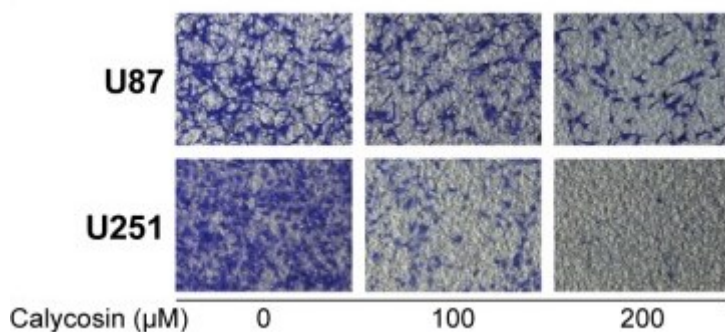
Također, otkriveno je da tretman s 800 μM kalikozina tijekom 24 sata sprječava stanični ciklus u obje stanične linije: postotak stanica u G2/M povećan je s 24.8% na 41.9% (U87) i s 21.1% na 30.6% (U251); postotak stanica u G1 fazi smanjen je s 50.6% na 30.8% (U87) i s 51.2% na 28.4% (U251) (Nie i sur., 2016).

14.2.2. Učinak kalikozina na staničnu migraciju i invaziju

Sljedeće, korišten je test stanične migracije i invazije (engl. transwell assay) da bi se ispitala inhibicija migracije i invazije stanica glioblastoma kalikozinom. Pokazano je da mnogo manje stanica migrira kroz poroznu membranu obloženu matrigelom s tretmanom od 100 do 200 μM kalikozina, u usporedbi s netretiranim stanicama (Nie i sur., 2016).



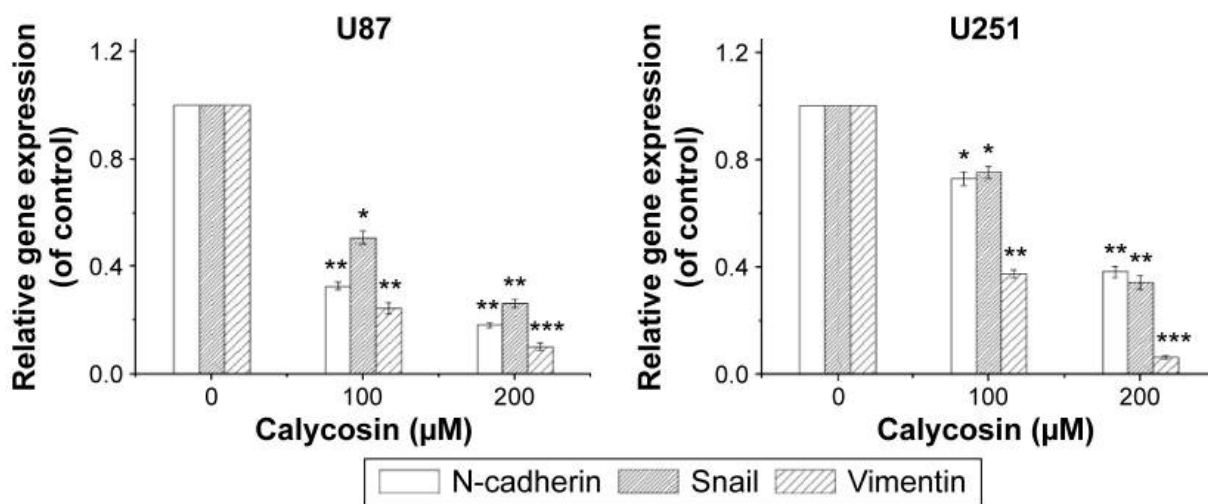
Slika 6. Stanice glioblastoma koje su migirirale kroz membranu nakon tretiranja s različitim koncentracijama kalikozina tijekom 18 h (Nie i sur., 2016).



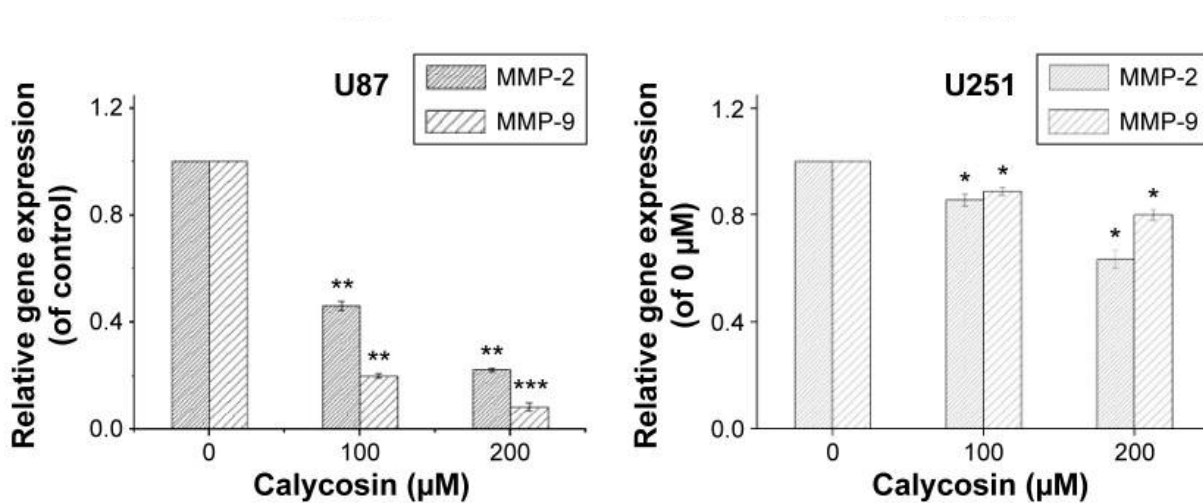
Slika 7. Stanice glioblastoma koje su migirirale kroz membranu nakon tretiranja s različitim koncentracijama kalikozina tijekom 24 h (Nie i sur., 2016).

14.2.3. Učinak kalikozina na mezenhimska svojstva i MMP u stanicama glioblastoma

S obzirom da je mezenhimska tranzicija usko povezana s migracijom i invazijom tumorskih stanica, ispitivane su promjene molekula povezanih s tim procesima nakon tretmana s kalikozinom. Nakon 24 sata inkubacije s određenim koncentracijama kalikozina (0, 100 i 200 μM) istražena je ekspresija molekula. Otkriveno je da kalikozin značajno smanjuje ekspresiju gena aktivatora koji utječu na mezenhimsku tranziciju, uključujući N-kadherin, SNAI-1 i Vimentin. Ovi rezultati snažno sugeriraju da bi kalikozin mogao izazvati znatne inhibitorne učinke na mezenhimska svojstva. Također, pokazano je da kalikozin smanjuje razinu MMP-2 i MMP-9 ovisno o njegovoj dozi (Nie i sur., 2016).



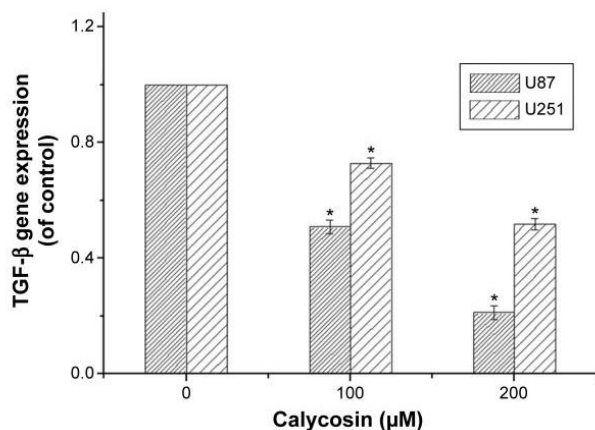
Slika 8. Ovisnost ekspresije gena koji kodiraju za N-kadherin, SNAI-1 i Vimentin u U87 i U251 stanicama o koncentraciji kalikozina (Nie i sur., 2016).



Slika 9. Ovisnost ekspresije gena koji kodiraju za MMP-2 i MMP-9 u U87 i U251 stanicama o koncentracijama kalikozina (Nie i sur., 2016).

14.2.4. Kalikozinom regulirani TGF- β u stanicama glioblastoma

Ispitivana je sposobnost kalikozina da modulira TGF- β u dvije stanične linije glioblastoma. Otkriveno je da je ekspresija gena i razina proteina značajno inhibirana ovisno o dozi kalikozina (Nie i sur., 2016).



Slika 10. Ovisnost ekspresije gena koji kodira za TGF- β u 087 i U251 stanicama o koncentraciji kalikozina (Nie i sur., 2016).

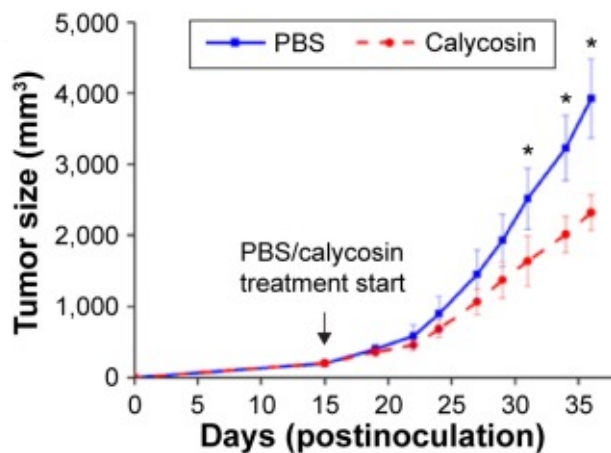
14.2.5. Ektopijska ekspresija TGF- β u U87 stanicama ukinula je antikarcenogeno djelovanje kalikozina

Zatim je testirano da li prekomjerna ekspresija TGF- β može preokrenuti antimigracijsko ili antiinvazivno djelovanje kalikozina. Otkriveno je da su inhibitorni učinci kalikozina znatno oslabljeni u U87 stanicama koje su bile podvrgnute prekomjernom ekspresijom TGF- β 1. Istražen je i učinak ektopijske ekspresije TGF- β 1 na ekspresiju mezenhimsko-povezanih molekula i MMP. Kao što je ranije spomenuto, razina tih proteina značajno se smanjila djelovanjem kalikozina. Međutim, prekomjerna ekspresija TGF- β 1 obnavlja njihovu razinu, što ukazuje na kritičnu ulogu TGF- β na antimezenhimalna svojstva kalikozina (Nie i sur., 2016).

14.2.6. Učinci kalikozina u glioblastomima ksenograft modela

Rezultati daljnjih istraživanja antikancerogenog djelovanja kalikozina na laboratorijskim miševima pokazali su da je kalikozin smanjio volumen tumora nakon tretmana s kalikozinom tijekom 22 dana u usporedbi s kontrolnom skupinom kojoj je injektiran PBS. Praćena je tjelesna masa miševa, no nisu opažene razlike između dvije skupine miševa. Za provjeru

molekularne promjene u životinjskom modelu, pročišćeni proteini iz tumorskog tkiva su analizirani pomoću imunoupijača. Pokazano je da kalikozin suprimira TGF- β , kao i njegove nizvodne molekule: N-kadherin, SNAI-1, Vimentin, MMP-2 i MMP-9 (Nie i sur., 2016).



Slika 11. Ovisnost veličine tumora kod miševa injektiranih s kalikozinom ili PBS o vremenu (Nie i sur., 2016).

14.3. RASPRAVA

Biljke su vrijedan izvor važnih medicinskih supstanci. Kalikozin je bioaktivna supstanca izolirana iz *Radix astragali*. Intezivno se istražuju njegovi protu-upalni, neuroprotektivni i proangiogeni učinci. Nedavno je predloženo istraživanje njegovog antitumorskog djelovanja. Prema tim istraživanjima, kalikozin je uspio suzbiti tumorsku staničnu liniju pomoću poticanja apoptoze ili inhibicije proliferacije. Međutim, njegov temeljni mehanizam još nije u potpunosti istražen. Štoviše, terapijski potencijal ovog izoflavona još nije ispitan na ljudskim glioblastomima.

Izražena migracija i invazija su obilježja malignih tumora. Genske kontrole i biokemijski mehanizmi, koji dovode do stjecanja migracijskih i invazivnih fenotipova, područja su intezivnog istraživanja. Antimigracijski i antiinvazivni potencijali kalikozina u određenoj dozi pokazuje terapijski potencijal ovog flavanoida u glioblastomima.

Inhibicija mezenhimskih karakteristika i MMP može biti učinkovit način za liječenje tumora. Smanjena količina mezenhimskih aktivatora, kao što su N-kadherin, SNAI-1 i Vimentin, pokazuje inhibicijsko djelovanje kalikozina na stanice s mezenhimskim svojstvima. Također, nakon tretmana s kalikozinom značajno su smanjeni MMP-2 i MMP-9.

Osim *in vitro*, provedeni su eksperimenti i *in vivo*. Rezultati su pokazali da intravenska primjena kalikozina značajno suprimira rast glioblastoma u ksenograft modela, a pritom ne izaziva gubitak tjelesne mase. Dakle, kalikozin je potencijalan antitumorski lijek s relativno niskom toksičnošću za normalno tkivo. Nakon tretmana kalikozinom smanjena je količina TGF- β , N-kadherina, SNAI-1, Vimentina, MMP-2 i MMP-9 u tumorskom tkivu, što je u skladu s otkrićima *in vitro* (Nie i sur., 2016).

Zaključno, kalikozin je obećavajuća supstanca za liječenje glioblastoma.

15. IMPLANTANT RADIOAKTIVNOG JODA (¹²⁵I) INHIBIRA RAST STANICA I EMT U LJUDSKIM GBM PREKO ROS-POSREDOVANOG SIGNALNOG PUTA

Implantant radioaktivnog joda (¹²⁵I) naširoko se primjenjuje u liječenju karcinoma. Štoviše, prethodni klinički pokusi potvrdili su da je liječenje GBM pomoću ¹²⁵I implantanta vrlo učinkovito. U ovoj studiji istražuje se učinak ¹²⁵I implantanta preko ROS-posredovanog signalnog puta na rast stanica GBM i na EMT. Reaktivne kisikove čestice (ROS) igraju važnu ulogu u staničnom metabolizmu i terapiji u liječenju raka. Žive stanice apsorbiraju ionizirajuće zračenje što se odvija preko radiolize vode, čime se generira ROS (Tian i sur., 2015).

15.1. KORIŠTENE METODE

U istraživanju koristile su se U251 i U87 humane GBM stanične linije. Stanice su bile izložene zračenju u različitim dozama *in vitro* pomoću ¹²⁵I implantanta i X-zraka.

Da bi se ispitala osjetljivost na zračenje provedene su sljedeće metode: MTT test, određivanje staničnog ciklusa i TUNEL metoda. TUNEL je jedna od metoda za detekciju i kvantifikaciju apoptoza. TUNEL podrazumijeva obilježavanje 3'OH-krajeva pomoću modificiranih nukleotida označenih fluorescein izotiocijanatom (fluorescein-dUTP). Uzorci se mogu analizirati pomoću protočne citometrije ili svjetlosne, fluorescencijske i elektronske mikroskopije. Metoda obilježavanja 3'OH-krajeva fragmenata DNA ima višestruke prednosti pri analizi kliničkog materijala kako bi se dobio uvid o indukciji apoptoze nakon primijenjene protutumorske terapije (Žlender, 2006).

Učinci zračenja ¹²⁵I implantanta mjereni su testom stanične migracije i invazije (engl. transwell assay) i wound-healing testom. Wound-healing test je jednostavna i jeftina metoda za ispitivanje migracijskih sposobnosti stanica. Ova metoda oponaša migraciju stanica tijekom liječenja rana *in vivo*. Osnovni koraci uključuju stvaranje „rane“ u sloju stanica, hvatanje slike na početku i u određenim intervalima tijekom migracije stanica kako bi zatvorile ranu te uspoređivanje slika kako bi se kvantificirala stopa migracije stanica (Rodriguez i sur., 2005).

Razina ROS-a mjerena je DCF-DA testom. DCFH-DA (2',7'-diklofluorescein diacetat) je boja koja se koristi za mjerenje ROS-a u stanicama sisavaca i kvasca, a brzo i jednostavno daje rezultate. Naime, DCFH-DA ulazi u stanice djelovanjem staničnih esteraza, te fluorescira tek ukoliko dođe do oksidacije ROS-om u fluorescentni oblik 2',7'-diklofluorescein (DCF). Intenzitet fluorescencije DCF-a mjeri se za količinu unutarstaničnih ROS-ova (Šitić, 2013).

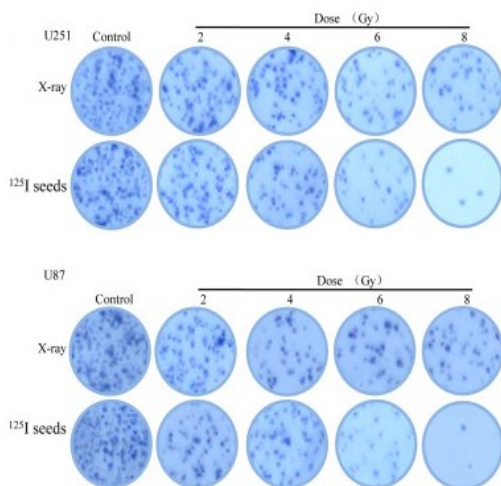
Provedeni su i *in vivo* eksperimenti na ženkama miševima starim 4-5 tjedana. Životinje su injektirane s U251 stanicama. Dva tjedna kasnije miševi, čiji je tumor dosegao veličinu oko 200 mm³, su slučajnim odabirom podijeljeni u tri skupine. Prva skupina je tretirana zračenjem sa X-zrakama, drugoj skupini je ugrađen implantant radioaktivnog joda (¹²⁵I), a treća skupina

je netretirana. Veličine tumora su mjerene pomoću kalipera svaka 3 dana kroz dva tjedna. Životinje su bile eutanizirane 15 dana poslije tretmana. Konačno, uzorci tumora se analiziraju pomoću imunohistokemijske metode i Western blota za E-kadherin i vimentin (Tian i sur., 2015).

15.2 REZULTATI

15.2.1. Implantant radioaktivnog joda (^{125}I) je učinkovitiji od X-zraka za inhibiciju rasta stanica GBM

U ovoj studiji, učinci zračenja na rast stanica GBM su mjereni stvaranjem kolonija, MTT testom i testom apoptoze. Rezultati su pokazali da je sposobnost stvaranja kolonija značajno smanjena određenom dozom zračenja. Stvaranje kolonija je značajno manje kod stanica koje su bile izložene zračenju ^{125}I implantantom, nego kod stanica koje su bile izložene zračenju X-zrakama u istim dozama. Mjerenjem proliferacije pokazano je da je proliferacija U251 i U87 stanica značajno inhibirana određenom dozom zračenja. Inhibicija proliferacije je značajno veća kod zračenja ^{125}I implantantom, u usporedbi sa zračenjem X-zrakama u istim dozama. Sumarno, ovi testovi pokazuju da su stanice GBM osjetljivije na zračenje ^{125}I implantantom nego na zračenje X-zrakama.



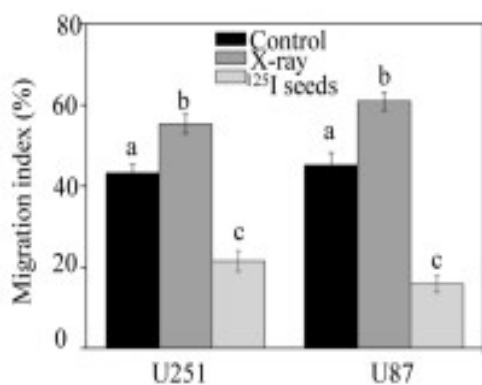
Slika 12. Sposobnost stvaranja kolonija U251 i U87 stanica koje su bile izložene zračenju ^{125}I implantantom i zračenju X-zrakama kroz 14 dana (Tian i sur., 2015).

Aneksin V-FITC/PI test je proveden kako bi se ispitaio utjecaj zračenja ^{125}I implantanta na programiranu smrt stanice. Rezultati su pokazali da se apoptoza stanice značajno inducira s X-zrakama i ^{125}I implantantom u određenoj dozi. Zračenje pomoću ^{125}I implantanta dovelo je do većeg postotka apoptoze, nego pomoću X-zraka u istim dozama (Tian i sur., 2015).

15.2.2. Utjecaj zračenja na EMT u stanicama GBM

Stanice GBM karakterizira migracija i invazija u okolno normalno tkivo mozga. Ova studija je usporedila EMT u stanicama GBM nakon zračenja X-zrakama i nakon zračenja ^{125}I

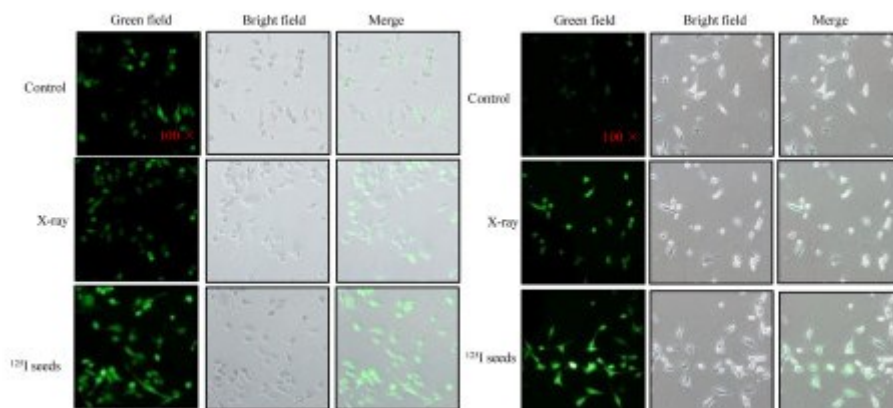
implantantom. Da bi se ispitala stanična invazija i migracija korišten je test stanične migracije i invazije. Nakon tretmana sa X-zrakama broj migrirajućih U251 stanica/polju se povećao sa 42.3 na 59.4, dok se je nakon tretmana sa ^{125}I implantantom smanjio na 22.9. slični rezultati su se pojavili i kod U87 stanica. Također, mjereno pomoću wound-healing testa, migracijski indeks za stanice tretirane sa ^{125}I implantantom je bio manji nego za X-zrake. U GBM staničnim linijama, sposobnost pokretljivosti i invazije pripisano je SNAI-1 i ZEB-1 ekspresiji. Stoga, u ovoj studiji su ispitane razine SNAI-1 i ZEB-1. Rezultati su pokazali da je pomoću ^{125}I implantanta došlo do inhibicije ekspresije ZEB1, ali bez značajnih promijena kod razine SNAI-1 u U251 i U87 stanicama. Također, došlo je i do smanjenja vimentina u U251 i U87 stanicama tretiranim ^{125}I implantantom. Sumarno, ovi rezultati pokazuju da zračenje ^{125}I implantanta inhibira EMT u stanicama GBM (Tian i sur., 2015).



Slika 13. Rezultati wound-healing testa stanica GBM: ovisnost migracijskog indeksa o primijenjenom tretmanu- zračenje X-zrakama ili zračenje ^{125}I implantantom (Tian i sur., 2015).

15.2.3. Implantant radioaktivnog joda (^{125}I) suzbija rast i migraciju stanica preko ROS-posredovanog signalnog puta

Pretpostavka studije je da zračenje ^{125}I implantanta može spriječiti rast stanica i EMT putem povećane generacije ROS-a u stanicama GBM. Da bi se utvrdila ta hipoteza, istraživano je da li je ^{125}I implantant učinkovitiji u stvaranju ROS-a od X-zraka. DCF-DA testom pokazano je da se razina ROS-a značajno povećala u U251 i U87 stanicama nakon 24 sata zračenja ^{125}I implantantom. U istoj dozi, X-zrake su generirale manje ROS-a. Ovi rezultati sugeriraju da inhibicija rasta stanica GBM i EMT inducirana ^{125}I implantantom bi mogla biti povezana s generacijom ROS-a (Tian i sur., 2015).



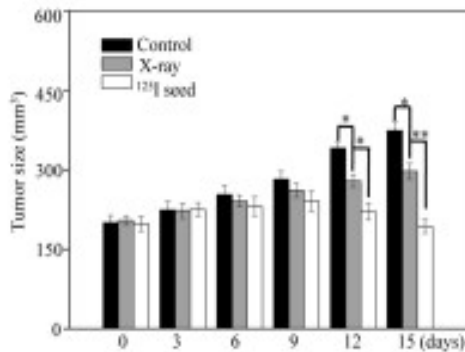
Slika 14. Razina ROS-a u U251 stanicama (lijevo) i U87 stanicama (desno) mjerena pomoću DCF-DA bojanja nakon 24 sata tretmana zračenjem X-zrakama i ^{125}I implantantom. Intenzitet zelene fluorescencije mjeri je količine ROS-a (Tian i sur., 2015).

Povećana količina ROS-a urokuje dvolančane lomove u DNA. Dva temeljna puta uključena u stanični odgovor na oštećenje DNA su popravak DNA i regulacija tijeka staničnog ciklusa. Budući da popravak DNA zahtijeva određeno vrijeme, nužno je usporavanje ili zaustavljanje staničnog ciklusa dok se oštećenje ne popravi. U protivnom dolazi do apoptoze ili trajnog zastoja staničnog ciklusa. Nakon oštećenja DNA, ATM kinaza fosforilacijom prenosi signal na Chk1 kinazu koja fosforilira nekoliko efektor koji reguliraju popravak DNA, zastoj staničnog ciklusa i apoptozu (Horvat, 2015). Otkriveno je da zračenje ^{125}I implantantom inducira stvaranje ROS-a. Radi toga postavljena je hipoteza da zračenje ^{125}I implantantom dovodi do inhibicije rasta i invazije stanica preko ROS-posredovanog signalnog puta. Da bi se testirala ta hipoteza stanice su prije bile tretirane s antioksidansom glutationom koji može inaktivirati ROS. Rezultati su pokazali da se predtretmanom stanica s glutationom smanjuje oštećenje DNA, G₂/M zastoj i apoptoza. Dalje se testiralo da li su EMT i rast stanica inhibirani ROS-posredovanim signalnim putem, tako što su se mjerili invazija i rast stanica GBM sa i bez glutationa. Rezultati su pokazali da prethodna obrada stanica s glutationom obnavlja invaziju stanica koja je bila potisnuta zračenjem ^{125}I implantantom. Glutacion je također potaknuo i ponovno formiranje kolonija. Sumarno, ovi rezultati pokazuju da zračenje implantanta radioaktivnog joda koči rast i migraciju stanica preko aktivacije ROS-posredovanog signalnog puta te da glutacion blokira djelovanje zračenja ^{125}I implantanta tako što inaktivira ROS (Tian i sur., 2015).

15.2.4. Implantant radioaktivnog joda (^{125}I) pokazuje veću antitumorsku aktivnost *in vivo* od X-zraka

Kao što je bilo i očekivano, zračenje i X-zrakama i ^{125}I implantantom u određenoj dozi inhibira rast tumora ksenograft modela. Mjerenjem veličine tumora, zabilježeni su značajno manji tumori u skupini miševa tretiranih zračenjem X-zrakama i ^{125}I implantantom, u usporedbi s tumorom kontrolne skupine nakon 12 dana. Pri tome, zračenje ^{125}I implantantom značajnije inhibira rast tumora od X-zraka. Osim toga, u tumorima ksenograft modela bila je

detektirana ekspresija proteina povezanih s oštećenjem DNA i apoptozom pomoću Western blota i imunohistokemijske metode. Zanimljiva činjenica je to što je tjelesna masa skupine miševa ozračenih X-zrakama znatno više smanjena nego što je to kod skupine miševa ozračenih ^{125}I implantantom. Sumarno, ovi rezultati pokazuju da je izloženost zračenju ^{125}I implantanta mnogo učinkovitije u inhibiciji rasta stanica GBM i EMT *in vivo*, u odnosu na X-zrake (Tian i sur., 2015).



Slika 15. Ovisnost veličine tumora ksenograft modela, tretiranih zračenjem X-zrakama ili ^{125}I implantantom ili netretiranih, o vremenu (Tian i sur., 2015).

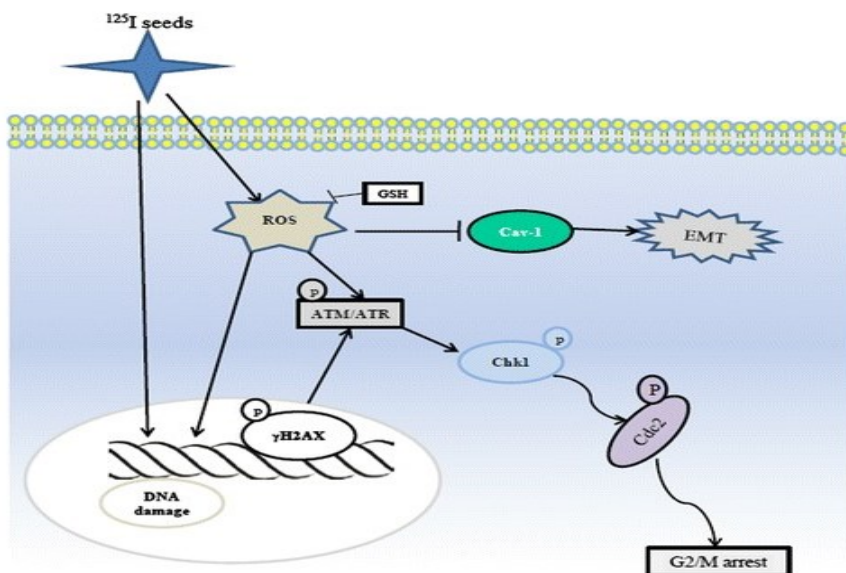
15.3. RASPRAVA

Iako su u zadnjih nekoliko desetljeća kontinuirano napredovale strategije za liječenje GBM, pacijenti s GBM i dalje imaju izrazito lošu prognozu. Zbog toga znanstvenici iz područja onkologije teže otkrićima novih tretmana koji će prevladati difuznu prirodu GBM i rezistentnost na zračenje.

Brahiterapija je oblik radioterapije kojom se radioaktivni izvor uvodi u tumor ili neposrednu blizinu tumora i smatra se danas optimalnim oblikom radioterapije, jer se tom tehnikom može djelovati odgovarajućom dozom na tumorsko tkivo, a istovremeno poštediti zdravo tkivo i postići maksimalni terapijski učinak. Brahiterapija pomoću implantanta radioaktivnog joda (^{125}I) potvrđena je kao učinkovit i siguran tretman za pacijente pri čemu dolazi do inhibicije rasta, migracije i invazije tumora. Ti ohrabrujući rezultati potaknuli su testiranje ovog načina liječenja na sve većem broju karcinoma, pa tako i GBM. Rezultati su pokazali da je zračenje ^{125}I implantantom učinkovitije na inhibiciju rasta stanica GBM od X-zraka. Nadalje, pomoću zračenja ^{125}I implantantom učinkovito je inhibirana EMT u stanicama GBM *in vitro* i *in vivo*. Daljnja istraživanja su pokazala da je antikancerogeno djelovanje zračenja ^{125}I implantantom posredovano generiranjem ROS-a.

Žive stanice apsorbiraju ionizirajuće zračenje što se odvija preko radiolize vode, čime se generira ROS koji može oštetiti nukleinske kiseline, proteine i lipide. ROS igra važnu ulogu u terapiji raka. Zbog toga je postavljena pretpostavka da je inhibicija rasta stanica i invazije

pomoću zračenja ^{125}I implantanta posljedica povećanja razine ROS-a. Rezultati su pokazali da zračenje ^{125}I implantantom dovodi do generiranja veće količine ROS-a nego sa X-zrakama. Ukoliko su stanice prije bile tretirane s antioksidansom glutationom, on inhibira ROS što blokira djelovanje zračenja ^{125}I implantanta, odnosno inhibiciju rasta i migraciju stanica. Dakle, rezultati ukazuju da implantant radioaktivnog joda (^{125}I) inhibira rast i invaziju stanica GBM preko ROS-posredovanog signalnog puta (Tian i sur., 2015).



Slika 16. Signalni put pomoću kojeg implantant radioaktivnog joda (^{125}I) inhibira EMT i rast stanica GBM: zračenje ^{125}I implantanta djeluje indirektno preko radiolize vode pri čemu se generira ROS koji uzrokuje oštećenja na DNA. Oštećenja DNA aktivira ATM/ATR kinazu što u konačnici rezultira inhibicijom rasta stanica G_2/M zastojom u staničnom ciklusu. Nadalje, generirani ROS može inhibirati EMT u stanicama GBM preko Cav-1 (Kaveolin-1) (Tian i sur., 2015).

16. ZAKLJUČAK

Glioblastoma multiforme (GBM) je najzloćudniji i najinvazivniji tumor središnjeg živčanog sustava. Unatoč desetljećima proučavanja i dalje je fatalan, vrlo brzo nakon dijagnoze, najčešće između 9 i 11 mjeseci. Stoga, pod hitno je potreban novi terapijski pristup liječenju. Epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT) je proces kroz koji prolaze stanice GBM čime dobivaju sposobnost migracije, invazije i otpornosti na apoptozu. GBM je zloćudan upravo zbog toga što invazivno raste i metastazira u okolno zdravo tkivo mozga što je posljedica EMT. Dakle, da bi se smanjila invazivnost GBM i tako produžio životni vijek pacijenata potrebno je djelovati na čimbenike koji uzrokuju EMT. EMT se događa zbog mutacija gena koji kodiraju za različite proteine koje su komponente različitih signalnih puteva. Prekomjerno vezanje određenih signalnih molekula na receptore pokreće genomske odgovore u stanici, što dovodi do prekomjernog vezanja transkripcijskih faktora na DNA čime se određeni geni suprimiraju, a određeni aktiviraju. Kao posljedica toga je gubitak adherentnih veza između stanica i adhezije za bazalnu laminu, gubitak polarnosti stanica, promjena morfologije stanica iz poligonalne u vretenastu, ekspresija enzima koji degradiraju stanični matriks, smanjena ekspresija E-kadherina, ključnog za kontakte između stanica. Terapijski tretmani trebali bi ciljati upravo na mutacije gena koje uzrokuju EMT. Ti tretmani bi mogli uključivati različite inhibitorne molekule, koje primjerice mogu inhibirati aktivnost kinaza koje posreduju u signalnim putevima; različite kompetitivne molekule koje bi se s većim afinitetom vezale na receptor nego signalne molekule, ali na način da ne pokreću aktivaciju signalnog puta; različite sintetske molekule koje bi se mogle vezati na transkripcijske faktore i tako neutralizirati njihovu aktivnost, itd. Dakle, svakom pacijentu s dijagnosticiranim GBM trebalo bi se pristupiti individualno jer tijekom procesa razvoja tumora u tijelu se događa kombinacija događaja. Prvo bi trebalo pronaći lokacije u genomu koje su povezane s bolešću, a onda ciljano djelovati na određene gene i/ili proteine. EMT također može biti izazvan mikrookolišnim uvjetima, posebice hipoksijom kojom se oslobađaju proinflamatorne molekule iz mijeloidnih stanica. Dakle, terapijska meta mogla bi biti i hipoksija s ciljem normalizacije koncentracije kisika i suzbijanja nakupljanja mijeloidnih stanica.

17. LITERATURA

1. Anonymous. Hrvatska udruga oboljelih od tumora mozga, <<http://glia.hr/klasifikacija/>>. Pristupljeno 16. ožujka 2016.
2. Bačić, M. (2014) Optimizacija lančane reakcije polimerazom za umnažanje mikrosatelitnih biljega gena Dishevelled1 u glioblastomima. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu. Str 1-3.
3. Bouche, G. (2011.) Rak dojke: vodič za bolesnice – Informacije na temelju ESMO smjernica kliničke prakse. Str 33, <<https://www.esmo.org/content/download/65113/1174049/file/ESMO-ACF-Rak-Dojke-Vodic-za-Bolesnice.pdf>>. Pristupljeno 28. ožujka 2016.
4. Faraho, I. (2015) Diferencijalna analiza proteoma staničnih linija karcinoma pločastih stanica jezika Cal27 i Cal27-2B1. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu. Str 9-12.
5. Horvat, A. (2015) Utjecaj proteina $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA u stanicama čovjeka. Doktorska disertacija, Sveučilište u Osijeku. Str 15.
6. Iwadate, Y. (2016) Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett.* 11(3): 1615-1620. doi:10.3892/ol.2016.4113
7. Jurlin, J. (2013) Protutumorski učinak apoptina na različitim staničnim modelima. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu. Str 9-10.
8. Kolenc, D. (2010) Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Str 26-27.
9. Korica, G. (2015) Primjena matičnih stanica u liječenju tumora mozga. *GYRUS VOL III BR 1.* 39-42.
10. Marshall, J. (2011) Transwell invasion assays. *Methods Mol Biol.* 769:97-110. doi:10.1007/978-1-61779-207-6_8.
11. Maurac, I. (2011) Signalni put HH- GLI i njegova interakcija s genima BRCA1 i BRCA2 u zloćudnim epitelnim novotvorinama jajnika. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Str 38.
12. Nie, X., Ou-Yang, J., Xing, Y., Li, D., Liu, R. i Xu, R. (2016) Calycosin inhibits migration and invasion through modulation of transforming growth factor beta-mediated mesenchymal properties in U87 and U251 cells. *Drug Des Devel Ther.* 10:767-779. doi:10.2147/DDDT.S90457
13. Ožanić Bulić, S. (2011) Utjecaj izraženosti E-kadherina i N-kadherina u primarnom melanomu i metastazama u limfnim čvorovima na prognozu bolesti. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Str 18-19; 21-26.
14. Pala, A., Karpel-Massler, G., Wirtz, C., Halatsch, M. (2013) Epithelial to Mesenchymal Transition and Progression of Glioblastoma. *Clinical Management and Evolving Novel*

Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumor (Lichtor, T., ured.), InTech. 14:277-289.
doi:10.5772/53183

15. Rodriguez , LG., Wu, X., Guan, JL. (2005) Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 294:23-9.

16. Šitić, S. (2009) Utjecaj ekstracelularnog matriksa i oksidacijskog stresa na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke. Doktorski rad, Sveučilište u Osijeku. Str 50.

17. Tian, Y., Xie, Q., He, J., Luo, X., Zhou, T., Liu, Y., Huang, Z., Tian, Y., Sun, D. i Yao, K. (2015) Radioactive ¹²⁵I seeds inhibit cell growth and epithelial-mesenchymal transition in human glioblastoma multiforme via a ROS-mediated signaling pathway. *BMC Cancer.* 15:1.
doi: 10.1186/1471-2407-15-1

18. Ye, X., Zhang, Z., Yang, R. i Jiang, Q. (2016) Mechanism of miRNA expression in regulating glioma invasion. *Cancer cell & Microenvironment.* 3:e1237.
doi:10.14800/ccm.1237.

19. Živčić-Ćosić, S. (2009) Kliničko i imunološko praćenje bolesnika nakon presađivanja bubrega. Doktorska disertacija, Sveučilište u Rijeci. Str 78.

20. Žlender, V. (2003) APOPTOSIS – PROGRAMMED CELL DEATH. *Arh Hig Rada Toksikol.* 54:267-274.

21. Žlender, V. (2006) DETECTION OF APOPTOSIS. *Arh Hig Rada Toksikol.* 57:229-236.