

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Antonio Kobeščak

**UTJECAJ KOMBINIRANE PRIMJENE DVOLANČANE RNA, CISPLATINE
I ZRAČENJA NA PREŽIVLJENJE STANICA TUMORA ŽDRIJELA
ČOVJEKA**

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom mentorice dr. sc. Tanje Matijević Glavan, znanstvene suradnice, i komentorice prof. dr. sc. Karmele Barišić sa Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013./2014.

POPIS KRATICA

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Gy	grej, jedinica za apsorbiranu dozu zračenja (engl. <i>Gray</i>)
LRR	regije bogate leucinom (engl. <i>Leucine-Rich Regions</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
poli(A:U)	poliadenilna:poliuridilna kiselina
poli(I:C)	poliinozilna:policitidilna kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
dsRNA	dvolančana RNA
ssRNA	jednolančana RNA
TLR	Toll-like receptor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Toll-like receptori	1
1.2. Toll-like receptor 3	4
1.3. Izražaj TLR na stanicama tumora	5
1.4. Liječenje zračenjem	7
1.5. Stanični ciklus	8
2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Stanična linija i kemijski reagensi	11
3.2. Nasađivanje stanica za test citotoksičnosti	11
3.3. Zračenje stanica gama-zrakama	12
3.4. Ispitivanje citotoksičnosti MTT testom	12
3.5. Nasađivanje stanica za analizu staničnoga ciklusa	13
3.6. Analiza staničnoga ciklusa pomoću protočnog citometra	15
3.7. Statistička analiza.....	16
4. REZULTATI	17
4.1. Učinak kombinirane primjene poli(I:C), poli(A:U), cisplatine i zračenja na preživljenje stanica Detroit 562	17
4.2. Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom nakon tretmana stanica Detroit 562 poli(I:C)-om, cisplatinom i γ -zračenjem	19
5. RASPRAVA	23
6. ZAKLJUČCI	26
7. ZAHVALE	27
8. POPIS LITERATURE.....	28
9. SAŽETAK	31
10. SUMMARY.....	32

1. UVOD

1.1. Toll-like receptori

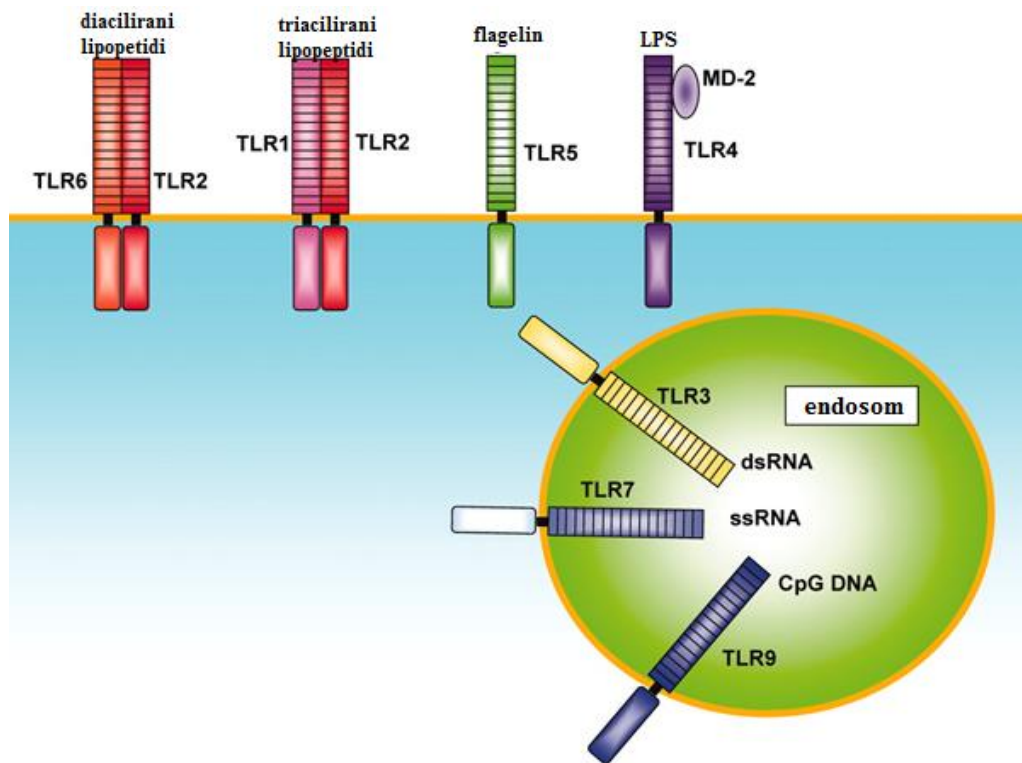
Toll-like receptori (TLR) pripadaju skupini evolucijski očuvanih receptorskih proteina PRR (od engl. *Pattern Recognition Receptors*) koji domaćinu omogućuju prepoznavanje patogenima pridruženih molekularnih sljedova, PAMP-a (od engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Najvažnija skupina unutar te porodice su TLR koji specifično prepoznaju i vežu brojne ligande podrijetlom od patogena (bakterijski flagelin, polipeptide, glikoproteine te virusnu RNA i DNA) aktivirajući prirodni i stečeni imunski odgovor.

TLR su dobili naziv po genu *Toll* (od njem. izvanredno, odlično), najprije otkrivenom u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) 1984. godine, čiji proteinski produkt sudjeluje u razvoju dorzo-ventralne osi tijekom embriogeneze, a kasnije u obrani od gljivičnih infekcija. U sisavaca je prvo otkriven TLR4, receptor analogan Toll proteinu vinske mušice, a zatim još 12 različitih TLR-a, nazvanih TLR1 do TLR13. TLR su uglavnom izraženi na stanicama imunskog sustava te na endotelnim i epitelnim stanicama. Nedavno je dokazana prisutnost TLR-a u živčanom sustavu gdje igraju ulogu u obrani organizma od infekcija neurotrofnim virusima (Carty i sur., 2014), zatim u okusnim pupoljcima (Wang i sur., 2009) te tubulima i intersticijskom tkivu bubrega (Papadimitraki i sur., 2009). Osim molekularnih sljedova povezanih s patogenima, prepoznaju i endogene ligande koji se oslobađaju tijekom nekroze stanica domaćina uzrokovane upalnim procesom. Upravo su smještaj u stanici, ekspresija u različitim tkivima, specifičnost prema ligandima te način prijenosa signala svojstva prema kojima se TLR međusobno razlikuju (slika 1).

TLR 3, 7, 8 i 9 smješteni su unutarstanično, na membrani endosoma i prepoznaju unutarstanične ligande, poput nukleinskih kiselina. Ostali TLR smješteni su na površini stanica i prepoznaju vanstanične ligande podrijetlom od patogena.

TLR2 prepoznaje velik broj molekula podrijetlom iz mikroorganizama, poglavito lipopeptide i lipoproteine, zatim lipotehoičnu kiselinu, peptidoglikane Gram-pozitivnih bakterija, lipoarabinomanan, zimosan iz gljivica, glikozilfosfatidilinozitolna sidra parazita *Trypanosoma cruzi* itd. Zbog mogućnosti funkcionalnog udruživanja s TLR1 i TLR6, može prepoznavati i male razlike između diaciliranih i triaciliranih lipopeptida. TLR4 prepoznaje lipopolisaharide (LPS) Gram-negativnih bakterija, dok TLR5 prepoznaje flagelin.

Unutarstanični TLR7 i TLR8 vežu jednolančanu virusnu RNA (ssRNA), TLR9 je receptor za bakterijsku DNA koja sadrži nemetilirane CpG motive, a TLR3 prepoznaje i veže dvolančanu RNA (dsRNA) (Takeda i Akira, 2005; Matijević i Pavelić, 2010).

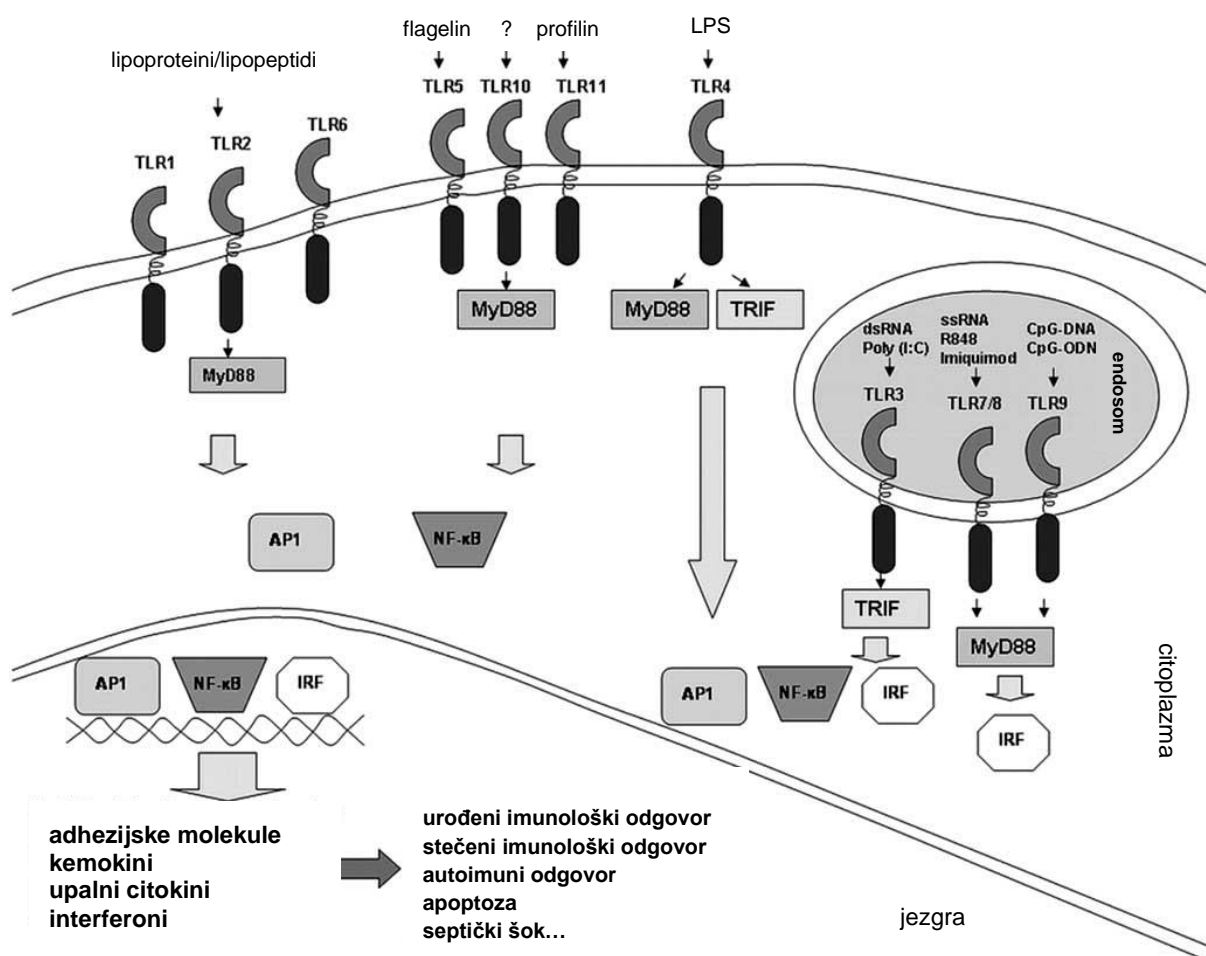


Slika 1. Toll-like receptori i njihovi ligandi. TLR 3, 7, 8 i 9 smješteni su unutar stanice, a ostali TLR nalaze se na površini stanice (preuzeto iz: Takeda i Akira, 2005).

TLR i obitelj receptora za interleukin-1 (IL-1R) imaju homolognu citoplazmatsku domenu nazvanu TIR (od engl. *Toll/IL-1 Receptor*), građenu od 200 aminokiselinskih ostataka koji čine 5 omči, 5 β -nabranih ploča i 5 α -uzvojnica. Domena TIR može se podijeliti u 3 podjedinice: Box1, Box2 i Box3, koje su ključne u prijenos signala. Izvanstanične domene ovih dviju porodica receptora značajno se razlikuju; TLR imaju domenu bogatu ponavljajućim sljedovima leucina (engl. *Leucine-Rich Repeats* – LRR), dok je domena IL-1 receptora nalik imunoglobulinu (engl. *Ig-Like*).

Nekoliko je adaptorskih proteina uključeno u signalni put pokrenut aktivacijom TLR-a: MyD88 (engl. *Myeloid Differentiation Factor 88*), Mal (engl. *MyD88 Adapter-Like*) ili TIRAP (engl. *TIR Domain-Containing Adapter Protein*), TRIF (engl. *TIR Domain-Containing Adapter Inducing Interferon- β*) i TRAM (engl. *TRIF-Related Adapter Molecule*). Svi TLR, osim TLR3, uključuju MyD88 adaptorski protein u svojoj kaskadi signala, dok se

signal od TLR4 može kretati i putom ovisnim o MyD88 i putom ovisnim o TRIF. Posljedica pokretanja puta prijenosa signala TLR-a aktivacija je transkripcijskih faktora NF- κ B (engl. *Nuclear Factor- κ B*), AP-1 (engl. *Activating Protein-1*) i IRF (engl. *Interferon Regulatory Factor 3*), što dovodi do transkripcije gena koji kodiraju za proteine uključene u imunski odgovor: adhezijske molekule, kemokine, upalne citokine, interferone, kostimulatorne molekule i dr. Na kraju dolazi do različitih učinaka na stanice: aktivacije urođenog i stečenog imunskog odgovora, autoimune reakcije, apoptoze, septičkog šoka itd. (slika 2).



Slika 2. Putovi prijenosa signala Toll-like receptora (preuzeto iz Matijević i Pavelić, 2010).

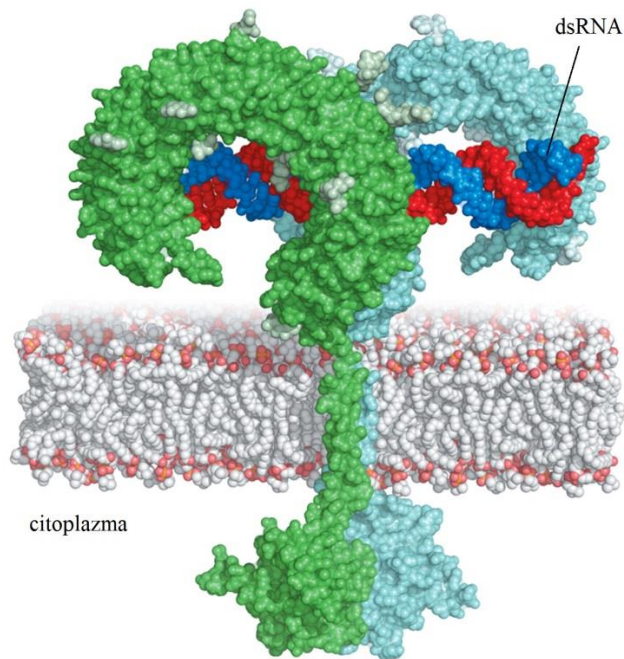
1.2. Toll-like receptor 3

TLR3 je protein građen od 904 aminokiseline. U ljudi je kodiran genom *TLR3*, smještenim na dugom kraku četvrtog kromosoma na poziciji 35 (4q35) koji se sastoji od 15.942 parova baza i 5 ekzona.

Izvanstanična domena TLR3 mjesto je vezanja liganda. Zavojnica je oblika potkove, načinjena od 23 regije LRR, pri čemu se najčešće ponavlja slijed od 24 lizina. Na domenu je vezano 15 *N*-vezanih glikana, osim na dijelu površine koja stupa u međudjelovanje s ligandom. Nedavno je utvrđeno da vezanjem dsRNA (dvolančana ribonukleinska kiselina) dolazi do dimerizacije izvanstaničnih domena TLR3. Analizom kristalne strukture dimernog kompleksa receptora s dsRNA pronađeno je da postoje dva vezna mjesta za dsRNA i jedno vezno mjesto važno za stvaranje dimera na svakoj izvanstaničnoj domeni. Za vezanje liganda nužna je istovremena interakcija sva tri vezna mjesta (Wang i sur., 2010). Pri tome je svaka od interakcija na veznim mjestima slaba (Liu i sur., 2008), no zajedno povezuju ligand i receptor u kompleks visokog afiniteta (Wang i sur., 2010). Vezna mjesta za dsRNA na površini domene bez vezanih glikana značajno su udaljena; jedno je blizu *N*-kraja, a drugo blizu *C*-kraja. Zbog toga kratke dsRNA (poput onih prisutnih u nekim tRNA, miRNA i ribosomima) ne mogu aktivirati TLR3 jer je za stvaranje stabilnog kompleksa s receptorom nužno vezivanje na oba vezna mjesta zbog čega bi dsRNA trebala biti duljine od oko barem 45 parova baza (slika 3).

Transmembranska domena TLR3 sadrži 21 aminokiselinu i odgovorna je za smještaj receptora unutar stanice. Unutarstanična domena TIR ima glavnu ulogu u prijenosu signala.

Ligandi TLR3 su dsRNA koja je genom dsRNA virusa ili je pak produkt replikacije ssRNA (jednolančana ribonukleinska kiselina) virusa. Imunosna reakcija posredovana TLR3 smatra se prvom i glavnom linijom obrane organizma od virusnih infekcija. Pri tome je posebno značajan smještaj TLR3 u endosomima budući da se smatra kako virusna RNA ulazi u stanicu putem endosoma ili apoptotskih tijela koja potječu od stanica zaraženih virusom (Karikó i sur., 2008). Endogeni ligandi TLR3 mogu biti mRNA (engl. *messenger RNA*) te stanične endogene RNA koje stvaraju dvolančane sekundarne strukture poput ukosnice.



Slika 3. Prikaz kompleksa između dsRNA i Toll-like receptora 3 (preuzeto iz Li i sur., 2010).

Ligandi za TLR3 su i sintetske dvolančane RNA te su stoga važne za istraživanje funkcije tih receptora. Dva najčešća sintetska liganda su poliinozilna:policitidilna kiselina, poli(I:C) i poliadenilna:poliuridilna kiselina, poli(A:U). Poli(A:U) je ligand specifičan za TLR3, dok poli(I:C) može aktivirati i članove druge obitelji PRR-a, odnosno RLR-a (engl. *RIG-I-Like Receptors Family*). Njoj pripadaju proteini koji prepoznaju dsRNA, a smješteni su u citoplazmi: RIG-I (engl. *Retinoic Acid-Inducible Gene-1*) i MDA5 (engl. *Melanoma Differentiation Associated Gene-5*). Naime, receptori RIG-I i MDA5 su zbog svojega smještaja u citoplazmi vjerojatno uključeni u izravno prepoznavanje dsRNA koja nastaje tijekom replikacije virusa, dok TLR3 sudjeluje u kasnijoj fazi kada se dsRNA otpušta u izvanstanični prostor nekrozom ili lizom stanica te fagocitozom ulazi u stanicu i susreće se s TLR3 u endosomima. Smatra se da su se ovi različiti putovi prepoznavanja dsRNA razvili kako bi organizam što brže prepoznao i odgovorio na infekciju virusima.

Signalni put TLR3 započinje vezanjem liganda za receptor, što dovodi do pokretanja kaskade signala koja uključuje adaptorsku molekulu TRIF. TLR3 je jedini TLR čiji se signal prenosi putem neovisnim o MyD88, a putem adaptora TRIF-a. Signalni put TLR3 završava aktivacijom transkripcijskih čimbenika IRF-3, NF- κ B ili AP-1 koji aktiviraju stvaranje interferona tipa 1 (IFN), citokina i kemokina. Za prijenos signala putem TLR3 nužna je i fosforilacija njegove domene TIR koju provodi enzim fosfatidil-inozitol kinaza PI3-K (Vercammen i sur., 2008).

1.3. Izražaj TLR na stanicama tumora

Tumor je posljedica nenormalne proliferacije stanica. Može biti dobroćudan ili zloćudan. Uglavnom nastaje od jedne promijenjene stanice koja nekontrolirano proliferira u monoklonsku populaciju stanica. Dalje se klonskom selekcijom i uz nove mutacije izdvajaju stanice izraženijih svojstava preživljenja i invazivnosti. Zloćudni tumor epitelnog tkiva (karcinom) najprije se pojavljuje kao adenom. Daljnjom proliferacijom stanica pretvara se u karcinom koji, u nekim slučajevima, prolazi bazalnu laminu te se širi u udaljena tkiva limfnim i krvožilnim sustavima, stvarajući metastaze.

U nedavnim je istraživanjima pokazano da su TLR izraženi na stanicama raznih vrsta tumora i tumorskih staničnih linija. Prvi opisan slučaj povezanosti TLR-a i tumora bio je za rak želuca (Schmausser i sur., 2005). Nakon toga dokazana je prisutnost TLR2, -3 i -4 na staničnim linijama HT29, CaCo2, DLD i LoVo (Furrie i sur., 2005), TLR2, -3, -4, -6 i -9 na stanicama hepatocelularnog karcinoma Hep2 i PLC/PRF/5 (Nishimura i Naito, 2005), TLR4 u epitelnim stanicama raka jajnika i neuroblastomu (Hassan i sur., 2006), TLR3, -4 i -9 kod raka dojke (Merrell i sur., 2006; Salaun i sur., 2006), zatim TLR3 i 9 kod raka prostate (Ilvesaro i sur., 2007; Paone i sur., 2008) te TLR2, 3, 4 i 9 kod raka pluća (Droemann i sur., 2005; He i sur., 2007).

Svakodnevno se otkriva prisutnost TLR-a i na raznim drugim tumorskim tkivima. Tako je, primjerice pokazano da se TLR4 nalaze na stanicama tumora rektuma, ali ne i na normalnim stanicama epitela kolona (Tchórzewski i sur., 2014). Također, nađeno je da su TLR2, -3, -4 i -9 jače izraženi na stanicama tumora testisa nego u zdravom tkivu testisa (Shapouri i sur., 2013). Zbog proturječnih rezultata, uloga TLR u tumorima nije potpuno jasna. S jedne strane, pokazano je da TLR tumorskim stanicama mogu omogućiti izbjegavanje apoptoze i imunskog odgovora te povećati invazivnost i preživljenje stanica (Xie i sur., 2009). S druge strane, Salaun i suradnici su pokazali da aktivacijom TLR3 dolazi do apoptoze u stanicama tumora dojke, i to signalnim putem ovisnim o adapteru TRIF-u. Slično, utvrđeno je da TLR3 pokreće apoptozu stanica tumora prostate, u ovom slučaju putem protein kinaze C, koja aktivira JNK (engl. *Jun N-Terminal Kinase*) i p38 te dovodi do apoptoze ovisne o kaspazi 8 (Paone i sur., 2008).

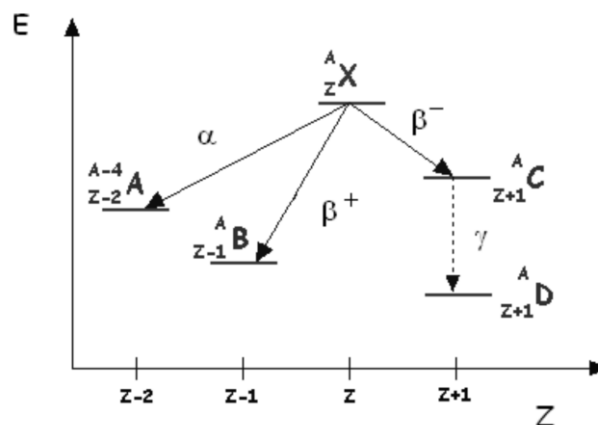
U još jednom istraživanju pokazano je da se aktivacijom TLR3 pomoću liganda poli(I:C) u stanicama melanoma u kombinaciji s cikloheksimidom ili IFN α (engl. *Interferon α*) inducira apoptoza i smanjuje proliferacija stanica tumora (Salaun i sur., 2007). Također,

Matijević i suradnici pokazali su da je funkcionalan TLR3 eksprimiran u stanicama tumora metastaza karcinoma ždrijela te da njegova aktivacija uzrokuje apoptozu stanica tumora.

Stoga dosadašnji rezultati daju naslutiti da bi se agonisti TLR3 mogli koristiti kao potencijalni protutumorski lijekovi, naročito u slučaju gdje su TLR3 izraženi selektivno u stanicama tumora, ali ne i u zdravom tkivu. Kombiniranjem s uobičajenim citostaticima moglo bi se pojačati uništavanje stanica tumora pri vrlo niskim koncentracijama citostatika. Rezultat toga bile bi smanjene nuspojave kemoterapije u bolesnika.

1.4. Liječenje zračenjem

Radioaktivnim raspadom dolazi do emisije tri tipa zraka: α (jezgre atoma helija, ${}^4_2\text{He}$), β (elektroni) i γ (fotoni vrlo malih valnih duljina). γ -zračenje je zračenje vrlo velike energije i prodornosti, a zaustavlja ga tek debeli olovni štit (slika 4).



Slika 4. Vrste radioaktivnoga raspada i emisija zračenja.

U liječenju bolesnika s tumorom koristi se ionizirajuće zračenje koje prolaskom kroz tkiva stvara ione ili oštećuje DNA i pri tome dovodi do smrti stanica. Ovisno o položaju izvora zračenja postoje teleradioterapija i brahiradioterapija. Teleradioterapija podrazumijeva oblik zračenja kod kojeg je izvor zračenja izvan tijela, dok je brahiradioterapija oblik liječenja pri kojem se radioaktivni materijal unosi u organizam bolesnika. Time se omogućuje ciljana dostava visokih doza zračenja u tkivo tumora, dok su zdrave stanice manje pogođene zračenjem.

Najčešće primjenjivana vrsta ionizirajućeg zračenja u liječenju bolesnika s tumorom je fotonsko zračenje visoke energije i velike prodornosti (x-zrake i gama-zrake). Dobiva se iz radioaktivnih izotopa kobalta i cezija pomoću linearnih akceleratora. Upotrebljava se i čestično zračenje, poput elektrona, protona, neutrona te alfa i beta čestica, ovisno o lokalizaciji i tipu tumora te ciljanoj dubini prodora u tijelo.

Elektronske zrake niske su energije i ne prodiru duboko pa se koriste za liječenje tumora smještenih blizu površine kože. Protonsko zračenje ne uzrokuje velika oštećenja tkiva kroz koja prolazi, zbog čega ima manje nuspojava. Neutronsko zračenje koristi se za uništenje stanica nekih tumora glave, vrata i prostate. Može poslužiti kao alternativa ostalim vrstama radioterapije kod nekih radiorezistentnih i neoperabilnih tumora, ali uzrokuje teže nuspojave.

Zračenje se koristi u liječenju tumora i to često u kombinaciji s kemoterapijom zbog sinergističkog učinka. Zračenje uzrokuje lomove DNA što dovodi do apoptoze stanica. Međutim, stanice tumora često postaju otporne na ionizirajuće zračenje (radiorezistencija) zbog poremećaja u regulaciji apoptoze ili radiorezistencije koja se pojavljuje zbog hipoksičnih uvjeta u mikrookolišu tumora. Pri liječenju zračenjem to dovodi do potrebe za povećanjem doze zračenja što na kraju nepovoljno djeluje na normalne, zdrave stanice, a uključuje i brojne nuspojave poput mučnine i povraćanja, kožnih reakcija, gubitka kose i drugih tkivno-specifičnih nuspojava. Doza fotonskog zračenja koja se koristi u liječenju ovisi o tipu i stadiju u kojem se nalazi tumor, a izražava se u grejima (*gray*, Gy). Tipične doze za liječenje solidnih tumora epitela iznose 60 – 80 Gy, dok su za limfome nešto niže, 20 – 40 Gy. Adjuvantne doze kreću se u rasponu od 4 do 60 Gy u frakcijama od po 1,8 – 2 Gy za tumor dojke te tumore glave i vrata.

Predtretmanom kemoterapeutičima može se povoljno utjecati na uništenje tumora zračenjem poticanjem radiosenzitivnosti stanica tumora. Time se smanjuje potrebna doza zračenja što rezultira ublažavanjem često vrlo teško podnošljivih nuspojava liječenja.

1.5. Stanični ciklus

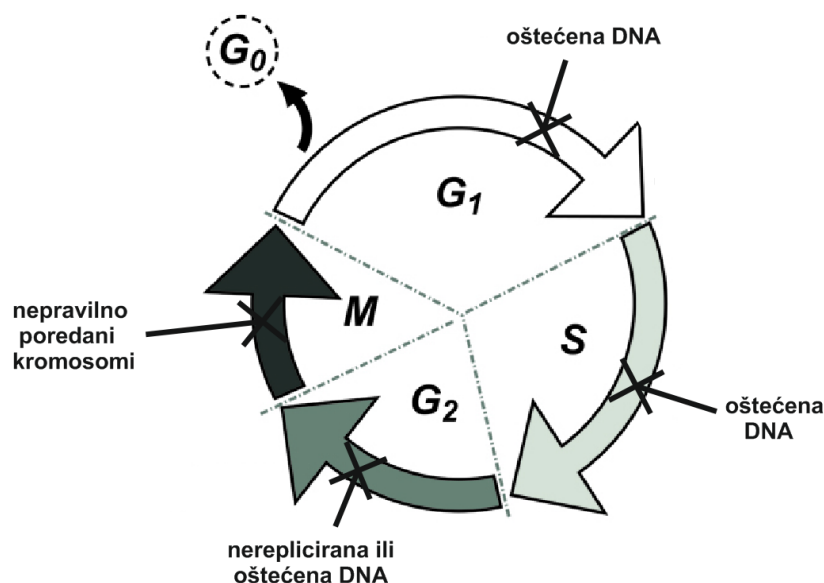
Stanični ciklus u eukariota traje približno 24 sata i može se podijeliti u dva osnovna dijela, mitozu i interfazu. Nadalje, interfaza se dijeli u tri faze: G_1 (engl. *Gap 1*), S (engl. *Synthesis*) i G_2 (engl. *Gap 2*). Tijekom faze G_1 stanica je metabolički aktivna i priprema se za udvostručenje DNA koje se događa u fazi S. Nakon sinteze DNA, stanica ulazi u fazu G_2 u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu. U fazi M (mitoza) dolazi

do razdvajanja kromosoma i citokineze pri čemu nastaju stanice kćeri koje ponovo započinju svoj stanični ciklus ulaskom u fazu G_1 . Osim u fazu G_1 , stanica može ući i u fazu mirovanja (G_0) u kojoj je metabolički aktivna, ali se ne dijeli.

Stanice se u različitim fazama staničnoga ciklusa mogu raspoznati prema sadržaju DNA. U fazi G_0 i G_1 su diploidne ($2n$), tijekom S-faze za vrijeme replikacije udvostručuje se količina DNA (od $2n$ na $4n$) i takvom ostaje i tijekom faza G_2 i M. Tek nakon citokineze, kada nastanu dvije nove stanice, svaka ponovo ima $2n$ broja kromosoma (molekula DNA). Navedene je promjene moguće analizirati protočnim citometrom i odrediti udjele stanica u pojedinim fazama staničnoga ciklusa.

U staničnome ciklusu postoje kontrolne točke koje osiguravaju da se samo ispravno replicirani i neoštećeni genomi prenose u stanice-kćeri. Kontrolne točke u fazi G_1 i S zaustavljaju stanični ciklus uslijed oštećenja DNA, a u fazi G_2 ciklus se zaustavlja ukoliko DNA nije u potpunosti replicirana ili je oštećena. Kontrolnu točku u fazi M stanice ne mogu proći ukoliko se kromosomi nisu pravilno poredali na diobenom vretenu (slika 5).

Budući da zračenje i tretman stanica interkalirajućim agensima poput cisplatine uzrokuje oštećenja stanične DNA, stanice se zaustavljaju u pojedinim fazama staničnoga ciklusa.



Slika 5. Stanični ciklus stanice i kontrolne točke.

2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Prethodnim istraživanjima pokazano je da su TLR3 izraženi na metastatskim linijama stanica ždrijela čovjeka te da se njihovom aktivacijom potiče apoptoza stanica tumora (Matijević i sur., 2011). Stoga je u istraživanju na liniji stanica metastatskog tumora ždrijela čovjeka (linija stanica Detroit 562) ispitivan učinak agonista TLR3 receptora, poli(A:U) i poli(I:C), cisplatine i γ -zračenja na rast i preživljenje stanica. Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Ispitati učinak pojedinačne i kombinirane primjene specifičnog agonista TLR3 (poli(A:U)) i nespecifičnog agonista TLR (poli(I:C)) s cisplatinom i zračenjem na rast i preživljenje stanica tumora ždrijela Detroit 562.
2. Istražiti postoji li sinergistički utjecaj kombinirane primjene agonista poli(I:C) i konvencionalnog citostatika cisplatine na zaustavljanje proliferacije stanica tumora Detroit 562 u pojedinim fazama staničnog ciklusa.

Svrha ovoga rada jest ispitati može li kombinirana primjena kemoterapeutika cisplatine, liganda TLR3 i zračenja poslužiti kao novi oblik protutumorskog liječenja. Pokaže li se ova hipoteza točnom, liječenje oboljelih od tumora moglo bi se provoditi znatno nižim dozama kemoterapeutika i zračenja što bi kao pozitivnu posljedicu imalo smanjenje teških nuspojava koje se pojavljuju tijekom uobičajenog liječenja citostaticima i zračenjem. Nadalje, uvođenjem agonista TLR3 u kombinirano liječenje specifično se ciljaju stanice tumora čime se smanjuje oštećivanje zdravog tkiva.

S obzirom na to da do sada nisu provedena istraživanja analize staničnoga ciklusa nakon tretmana stanica ovom kombinacijom kemoterapije i zračenja, dobiveni rezultati poslužiti će daljnjem razumijevanju funkcije TLR3 u metastatskim tumorima ždrijela čovjeka te kao podloga za buduća istraživanja u ovom području.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanična linija i kemijski reagensi

Istraživanje je provedeno na liniji stanica Detroit 562 (metastaza karcinoma ždrijela) koja je kupljena iz baze linija stanica ATCC. Stanice su uzgajane u plastičnoj boci za stanične kulture volumena 250 mL u hranjivoj tekućoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Sigma-Aldrich, Njemačka) obogaćenom 10 %-tnim serumom fetusa teleta (engl. *Fetal Bovine Serum* - FBS; Sigma-Aldrich, Njemačka) i uz dodatak 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Njemačka). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama u vlažnoj atmosferi u inkubatoru pri 37 °C uz 5 % CO₂. Za potrebe pokusa presađivane su kada su dosegle 80 – 90 % konfluentnosti.

Za ispiranje stanica korišten je pufer PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*, fosfatni pufer, pH = 7,4) bez Ca²⁺ i Mg²⁺ (Sigma-Aldrich, Njemačka), a za odvajanje stanica od podloge otopina tripsin/EDTA (0,25 %, Sigma-Aldrich, Njemačka). Za tretman stanica korištene su sljedeće matične otopine: poli(I:C) (1 mg/mL, InvivoGen, SAD), poli(A:U) (1 mg/mL, InvivoGen, SAD) i cisplatin (1700 µmol/L, Sigma-Aldrich, Njemačka). U pokusima su korišteni i dimetilsulfoksid *p.a.* (Gram-mol, Zagreb), 10x MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, Sigma-Aldrich, Njemačka), propidijev jodid (50 µg/mL, Sigma-Aldrich, Njemačka) te RNaza (10 µg/µL, Sigma-Aldrich, Njemačka).

3.2. Nasadivanje stanica za test citotoksičnosti

Za pokus u kojem je ispitivana citotoksičnost testom MTT iz sterilnih je posuda iznad stanica odstranjen medij i potom su stanice isprane PBS-om te tripsinom. Posude su zatim odložene u inkubator na 5 – 10 minuta. Nakon što su se stanice odvojile od podloge, u bocu je dodano 5 mL tekuće hranjive podloge, sadržaj boce resuspendiran je pipetom i premješten u sterilnu epruvetu.

Potom je određen broj živih stanica bojanjem tripanskim modrilom u omjeru 1:5 (20 µL suspenzije stanica + 80 µL tripanskog modrila) i promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom u Neubauerovoj komorici. Broj živih stanica u 1 mL određen je prema jednadžbi:

$$\text{broj stanica u 1 mL} = \frac{\text{broj živih stanica}}{0,4} \times \text{razrjeđenje} \times 10^3.$$

Nakon što je izračunata koncentracija stanica, na dvije mikrotitarske pločice s 96 bunarića nasadeno je 5×10^3 stanica u svaki bunarić.

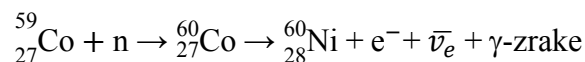
Sljedećeg su jutra stanice na obje pločice tretirane otopinom poli(I:C), 10 µg/mL, otopinom poli(A:U), 10 µg/mL, otopinom cisplatine, 1 µmol/L, te kombinacijama 10 µg/mL poli(I:C) + 1 µmol/L cisplatine i 10 µg/mL poli(A:U) + 1 µmol/L cisplatine. Svaki je pokus izveden u četiri bunarića (kvadriplikat) u 4 nezavisna pokusa.

Nakon 45-minutnog tretmana stanica kemoterapeuticima, stanice na jednoj pločici zračene su dozom zračenja od 2,5 Gy. Druga je pločica poslužila kao kontrola (za zračenje).

Nakon 72 sata izveden je test citotoksičnosti (MTT test).

3.3. Zračenje stanica gama-zrakama

Tretman stanica zračenjem proveden je gama-zračenjem. Kao izvor zračenja korišteni su radioaktivni izotop kobalta-60 (^{60}Co , poluvremena raspada $t_{1/2} = 5.2714$ godina) na panoramskom uređaju u Institutu Ruđer Bošković. Izotop ^{60}Co nastaje reakcijom neutrona i izotopa ^{59}Co . Beta radioaktivnim raspadom uzbuđene jezgre ^{60}Co do stabilnog izotopa nikla-60 (^{60}Ni) emitiraju se i dvije gama zrake (1,17 i 1,33 MeV) prosječne energije od 1,25 MeV:



Pločice s nasadenim stanicama postavljene su na udaljenosti od 260 cm od centra plašta u kojima se nalazi izvor zračenja i na visini 72 cm od poda. Brzina doze izračunata je dozimetrijskim mjerenjem ionizacijskom komorom i vremenom poluraspada ^{60}Co , a iznosila je oko 10 mGy/s. Za dozu zračenja od 2,5 Gy stanice je bilo je potrebno zračiti oko 4 minute.

3.4. Ispitivanje citotoksičnosti MTT testom

Preživljenje stanica nakon obrade kemoterapeuticima i zračenjem određeno je spektrofotometrijskim MTT testom. Test se temelji na svojstvu živih stanica da reduciraju žutu, u vodi topljivu tetrazolijevu sol MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid], u formazan (tamno plavo obojen spoj topljiv u dimetilsulfoksidu). MTT se reducira

enzimima vezanim za endoplazmatski retikulum (mikrosomalnim enzimima) uz koenzime NADH i NADPH, što se događa jedino u metabolički aktivnim, živim stanicama.

Nakon 72 sata sa stanica se ukloni medij i u svaki bunarić doda po 40 μL otopine koja sadrži medij i MTT reagens (razrjeđenje 1:10). Pločice se prekriju aluminijskom folijom kako bi se zaštitile od svjetlosti i ostave 4 h u inkubatoru. Zatim se u bunariće doda po 160 μL dimetil-sulfoksida kako bi se otopio nastali formazan, sadržaj bunarića promiješa na tresilici te mjeri apsorbancija na spektrofotometrijskom čitaču pločica *Multiskan Ascent (MTX Lab systems, SAD)* pri valnoj duljini od 570 nm. Izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna broju živih stanica. Preživljenje stanica (engl. *Percentage of Growth - PG*) izračuna se iz dobivene apsorbancije prema jednadžbi:

$$\text{PG (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost OD}_{\text{test}} - \text{srednja vrijednost OD}_{t_0}}{\text{srednja vrijednost OD}_k - \text{srednja vrijednost OD}_{t_0}} \times 100,$$

gdje je OD_{test} – izmjerena vrijednosti apsorbancije uzoraka nakon mjerenog vremena, OD_{t_0} – izmjerena vrijednosti apsorbancije uzoraka prije izlaganja uzoraka određenoj tvari i OD_k – izmjerena vrijednosti apsorbancije stanica bez tretmana.

Preživljenje stanica računa se u odnosu na netretirane stanice (kontrolu), pri čemu se od izmjerenih apsorbancija oduzima apsorbancija slijepe probe koju čini otopina reagensa MTT-a u dimetil-sulfoksidu.

3.5. Nasađivanje stanica za analizu staničnoga ciklusa

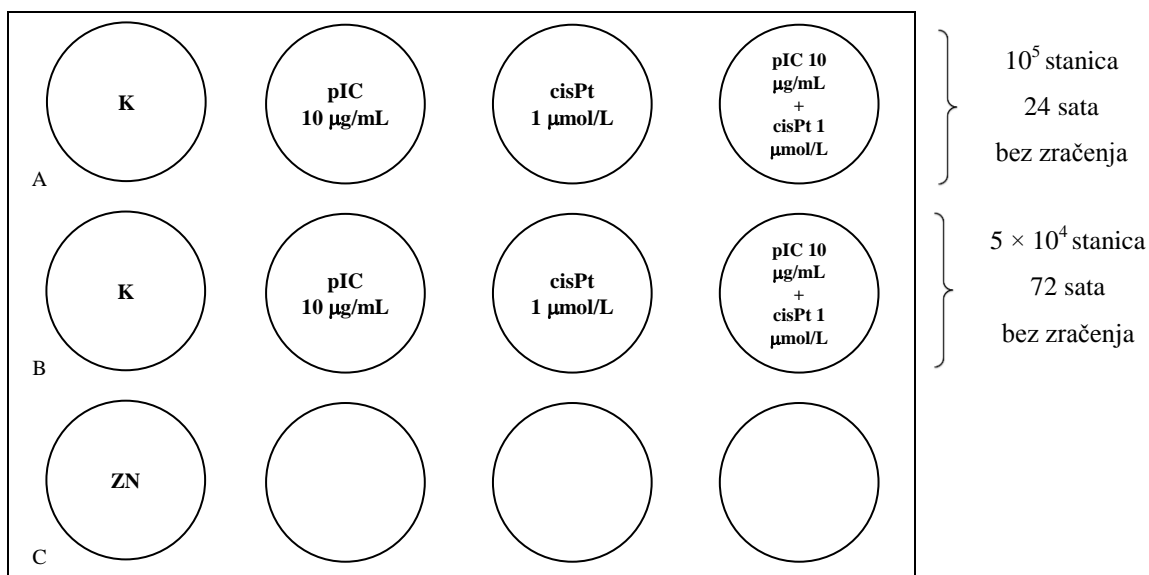
Nakon brojanja, stanice se nasade na dvije sterilne pločice za uzgoj stanica s 12 bunarića. Na obje je pločice u četiri bunarića nasađeno po 10^5 stanica u svaki bunarić, a u sljedeća četiri bunarića dvostruko manje, po 5×10^4 stanica u svaki bunarić. Na jednoj je od pločica nasađeno još 10^5 stanica u zaseban bunarić, za namještanje parametara pri analizi protočnim citometrom.

Stanični ciklus analiziran je na sljedeći način:

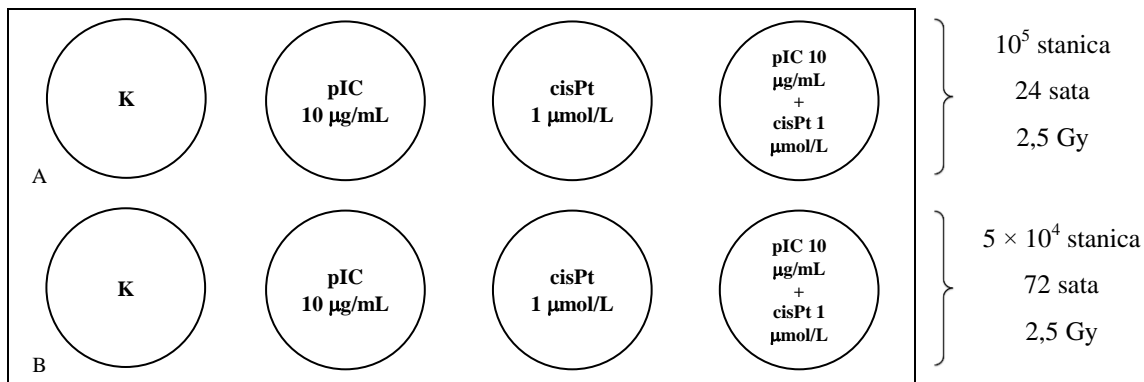
- a) 24 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina, bez zračenja,
- b) 72 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina, bez zračenja,
- c) 24 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina i γ -zračenjem doze 2,5 Gy,
- d) 72 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/ cisplatina i γ -zračenjem doze 2,5 Gy.

Dan nakon nasadivanja stanice su tretirane prema shemi (slika 6). Stanice su potom inkubirane tijekom 45 minuta i potom su stanice jedne pločice zračene dozom zračenja od 2,5 Gy, dok stanice s druge pločice nisu zračene, te su poslužile kao kontrola za zračenje.

a)



b)



Slika 6. a) Shema tretmana stanica na mikrotitarskoj pločici s 12 bunarića. Stanice su tretirane kombinacijama pIC i cisPt u naznačenim koncentracijama. Stanični ciklus analiziran je 24 h, odnosno 72 h nakon tretmana. **b)** Shema tretmana stanica na mikrotitarskoj pločici s 12 bunarića (prikazano 8 bunarića). Nakon tretmana s pIC i cisPt u naznačenim koncentracijama, stanice su podvrgnute gama-zračenju doze 2,5 Gy (K = kontrola, netretirane stanice; pIC = poli(I:C); cisPt = cisplatin; ZN = stanice za namještanje parametara protočnog citometra).

3.6. Analiza staničnoga ciklusa pomoću protočnog citometra

Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom temelji se na činjenici da se stanice u različitim fazama staničnoga ciklusa razlikuju u sadržaju DNA. Upotrebom fluorescentne boje propidijevog 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 G₂/M dvostruko veća od fluorescencije propidijeva jodida u stanicama koje se nalaze u fazi G₀/G₁. Za stanice u fazi S, izmjerena vrijednost fluorescencije nalazi se u intervalu između te dvije vrijednosti.

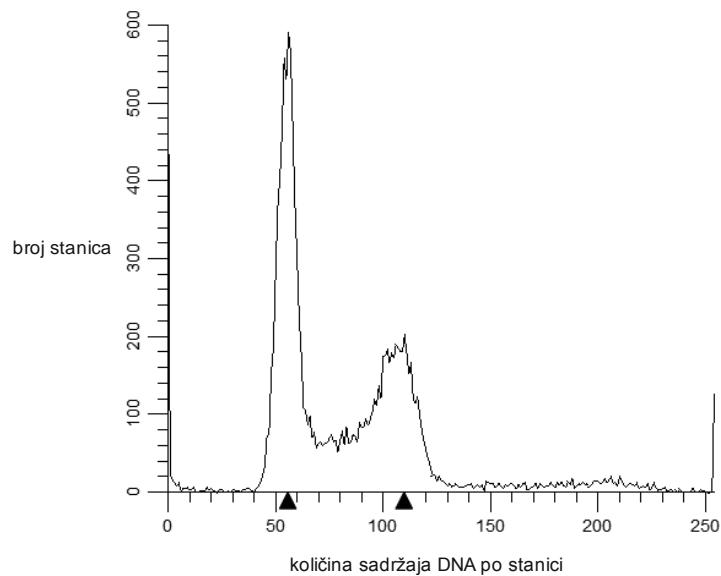
Pokus je izveden u dvije serije, tako što je promatran stanični ciklus 24 h i 72 h nakon tretmana stanica kemijskim reagensima, odnosno kemijskim reagensima i zračenjem.

Sa stanica se najprije ukloni medij i premjesti u epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka). Zatim se stanice isperu otopinom PBS-a, 300 µL, a potom se doda 200 µL tripsina. Nakon kratke (5 – 10 minuta) inkubacije, stanice se resuspendiraju u bunariću medijem u kojem su rasle, prebace u epruvete od 2 mL i centrifugiraju 5 minuta pri 3000 rpm. Nakon toga stanice se isperu dva puta u 500 µL PBS-a i centrifugiraju tijekom 5 minuta pri 3000 rpm. Epruvete sa stanicama prebace se na led i resuspendiraju u 500 µL PBS-a i 1 mL apsolutnog etanola (čuvanog pri –20 °C), dodavanog kap po kap uz blago miješanje. Stanice se potom pohrane na –20 °C do analize.

Prije analize protočnim citometrom stanice se ponovno ispiru dva puta u PBS-u te centrifugiraju 5 minuta pri 3000 rpm. Potom slijedi tretman otopinom RNaze (0,1 µg/µL; 150 µL) uz inkubaciju u vodenoj kupelji temperature 37 °C tijekom 15 minuta. Nakon toga stanice se rasprše u 150 µL propidijeva jodida (50 µg/mL) te se sav sadržaj prebaci u epruvete za mjerenje na protočnom citometru i inkubira na ledu 30 minuta zaštićen od svjetlosti. Analiza uzoraka provedena je pomoću protočnog citometra FACSCalibur™ (Becton Dickinson, SAD) i programa CellQuest Pro. Protok stanica namješten je na brzinu od 150 do 200 stanica u sekundi, a za svaki pojedini uzorak prikupljaju se podaci o 15.000 stanica i obrađuju u programu ModFit.

Prilikom analize rezultata u programu ModFit odabrane su koordinatne osi tako da je na ordinati prikazan broj stanica, a na apscisi parametar FL2-A koji pokazuje količinu stanične DNA. Ukoliko program nije automatski prepoznao parametre odabirom funkcije *Fit*, intervali D1 i D2 podešeni su na krivulje koji odgovaraju diploidnoj, odnosno tetraploidnoj

količini DNA. Potom je odabrana funkcija *Analysis i Fit With Current Model*, kako bi se mogli očitati postotci stanica zaustavljenih u pojedinim fazama staničnoga ciklusa (slika 7).



Slika 7. Tipična krivulja s dva vrha od kojih jedan odgovara broju stanica u fazi G₁, a drugi broju stanica u fazama G₂ i M. Stanice u fazi S raspoređene su na grafikonu između dva vrha.

3.7. Statistička analiza

Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti \pm standardna pogreška (od engl. *Standard Error of the Mean* – SEM) i analizirani Studentovim t-testom uz odabranu razinu značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

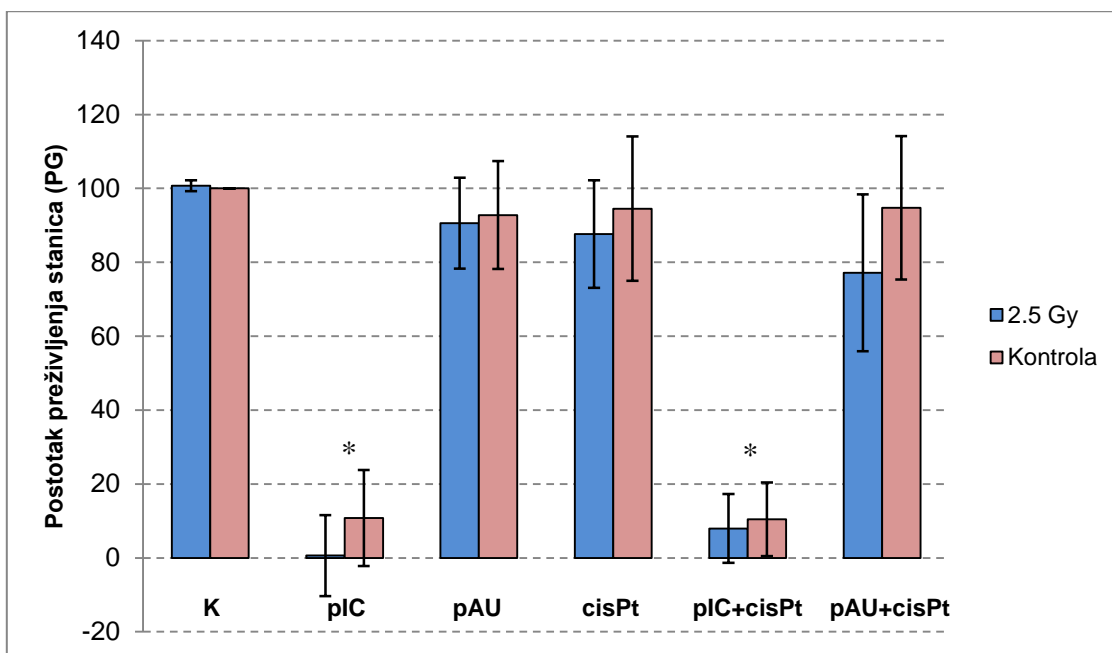
4.1. Učinak kombinirane primjene poli(I:C), poli(A:U), cisplatine i zračenja na preživljenje stanica Detroit 562

Stanice Detroit 562 tretirane su otopinama poli(I:C) i poli(A:U) koje su sadržavale njihove približno LD₅₀ koncentracije (10 µg/mL poli(I:C) i 10 µg/mL poli(A:U)) te otopinom cisplatine koncentracije 1 mmol/L (približno LD₂₀), koje su određene titriranjem reagensa i mjerenjem preživljenja stanica (Matijević i sur., 2011).

Tretman stanica otopinom poli(I:C) uzrokovao je smanjenje rasta stanica za približno 90 % u odnosu na kontrolu, što predstavlja statistički značajnu razliku. Tretman stanica s poli(I:C) uz zračenje od 2,5 Gy smanjuje rast stanica za gotovo 100 %, dakle za oko 10 % više u odnosu na tretman samom otopinom poli(I:C), a bez zračenja. U odnosu na tretman otopinom poli(A:U), tretman otopinom poli(I:C) smanjuje postotak preživljenja stanica od oko 80 %, odnosno 90 % uz tretman zračenjem.

Poli(I:C) u kombinaciji s cisplatinom također uzrokuje smanjenje rasta stanica od približno 90 %, bez statistički značajne razlike u odnosu na tretman samom otopinom poli(I:C), ali statistički značajno u odnosu na kontrolu. Također, ova kombinacija imala je značajno veći citotoksičan učinak u odnosu na kombinaciju poli(A:U) i cisplatine jer uzrokuje smanjenje rasta stanica od oko 84 %, odnosno 70 % uz tretman zračenjem.

Kombiniranim tretmanom stanica cisplatinom i selektivnijim ligandom za TLR3, poli(A:U), došlo je do inhibicije rasta stanica od oko 5 % u odnosu na kontrolu. Primjena zračenja dozom zračenja od 2,5 Gy uz navedeni tretman reagensima rezultirala je dodatnom inhibicijom rasta stanica za oko 17 % u odnosu na tretman bez zračenja, odnosno oko 23 % u odnosu na kontrolu.



Slika 8. Postotak preživljenja stanica nakon tretmana otopinom poli(I:C), 10 µg/mL, poli(A:U), 10 µg/mL, cisplatine, 1 mmol/L, te kombinacijama tih kemoterapeutika bez zračenja (kontrola) i uz tretman gama-zračenjem doze 2,5 Gy. Rezultati su srednja vrijednost najmanje 3 pokusa ± S.E.M. (pIC = poli(I:C), pAU = poli(A:U), cisPt = cisplatina, K = kontrola, netretirane stanice); * $p < 0,05$ prema kontroli (K).

4.2. Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom nakon tretmana stanica Detroit 562 poli(I:C)-om, cisplatinom i γ -zračenjem

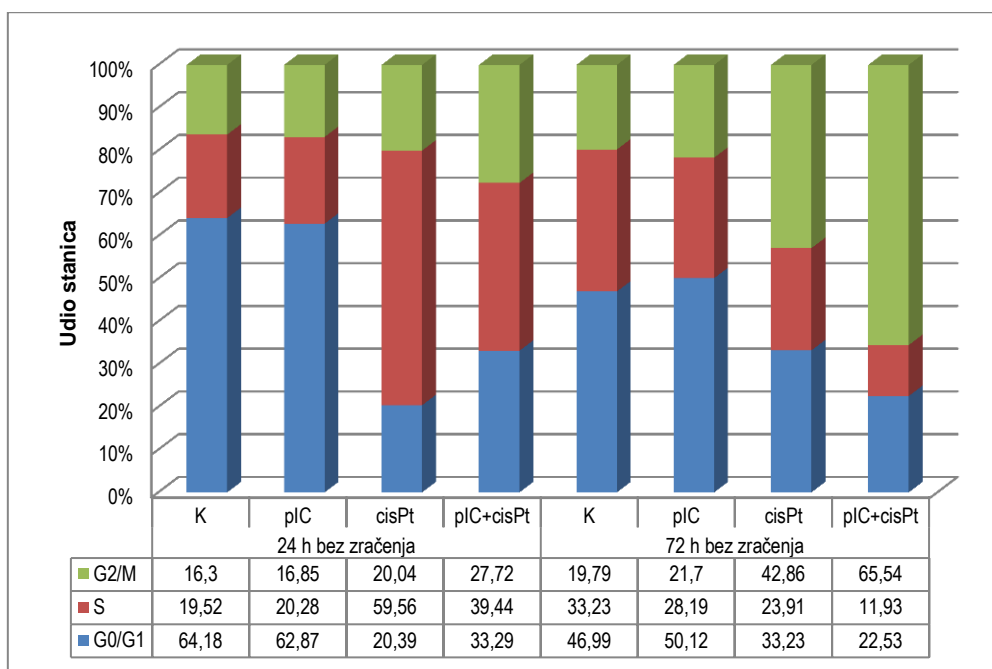
Stanični ciklus analiziran je protočnim citometrom uporabom programa ModFit nakon 24- i 72-satnog tretmana kemijskim agensima i zračenjem.

Netretirane stanice nakon 24 sata većinom se nalaze u fazama G_0 i G_1 (64,18 %), dok su manjim dijelom u fazama S (19,52 %) i G_2/M (16,3 %). Uz primijenjenu dozu zračenja od 2,5 Gy, netretirane stanice počinju se više nakupljati u fazama S i G_2/M (36%, odnosno 25 %), ali i dalje najviše u G_0 i G_1 (38 %).

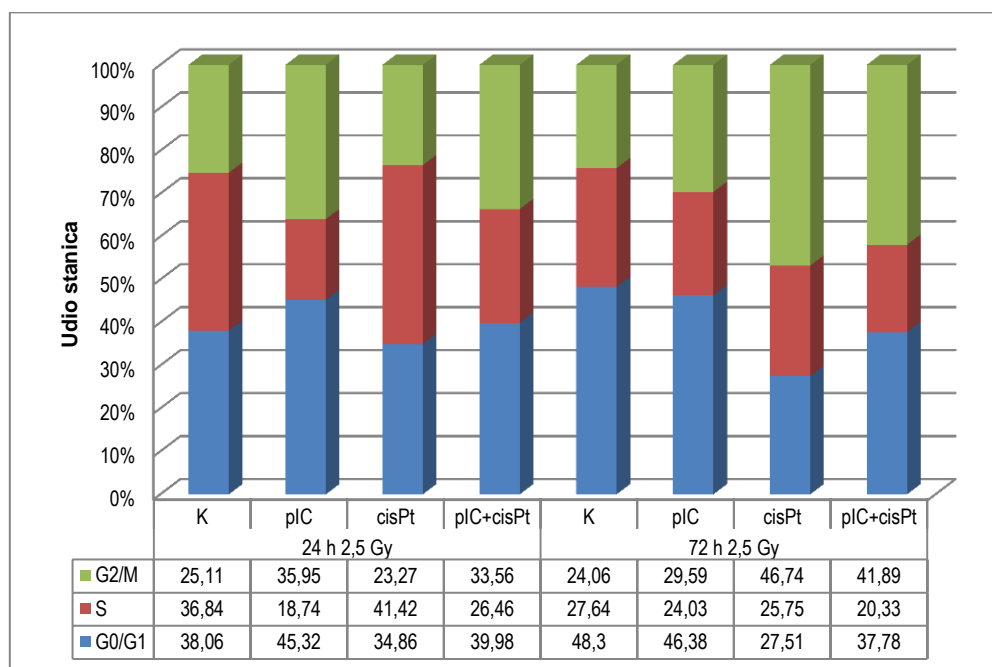
Nakon 24 sata cisplatina uzrokuje zaustavljanje većine stanica u S fazi (oko 60 %), a poli(I:C) nema utjecaj na raspodjelu stanica po fazama staničnoga ciklusa. Kombinacija cisplatine i poli(I:C)-a uzrokuje približno podjednaku raspodjelu stanica u sve tri faze ciklusa, s najviše stanica u S-fazi (oko 39 %). U kombinaciji sa zračenjem, taj se omjer povećava u korist faza G_0 i G_1 (40 % stanica).

Nakon 72 sata 47 % netretiranih stanica zaustavljeno je u fazama G_0 i G_1 te oko 33,23 % u fazi S i oko 20 % u fazi G_2 i M. Primijenjeno zračenje na iste stanice neznatno povisuje udio u fazama G_2 i M (za oko 5 %) i smanjuje u fazi S (za oko 6 %). Poli(I:C) blago povećava udio stanica u G_0 i G_1 , dok se stanice tretirane cisplatinom 72 sata nakon tretmana nalaze najviše u fazama G_2/M (43 %). Kombinacija cisplatine i poly(I:C)-a nakon 72 sata značajno povećava udio stanica u fazama G_2 i M (65 %), što je oko 45 % više u odnosu na kontrolu i oko 20 % više u odnosu na tretman samom cisplatinom. Samo oko 12 % stanica zaustavljeno je u fazi S.

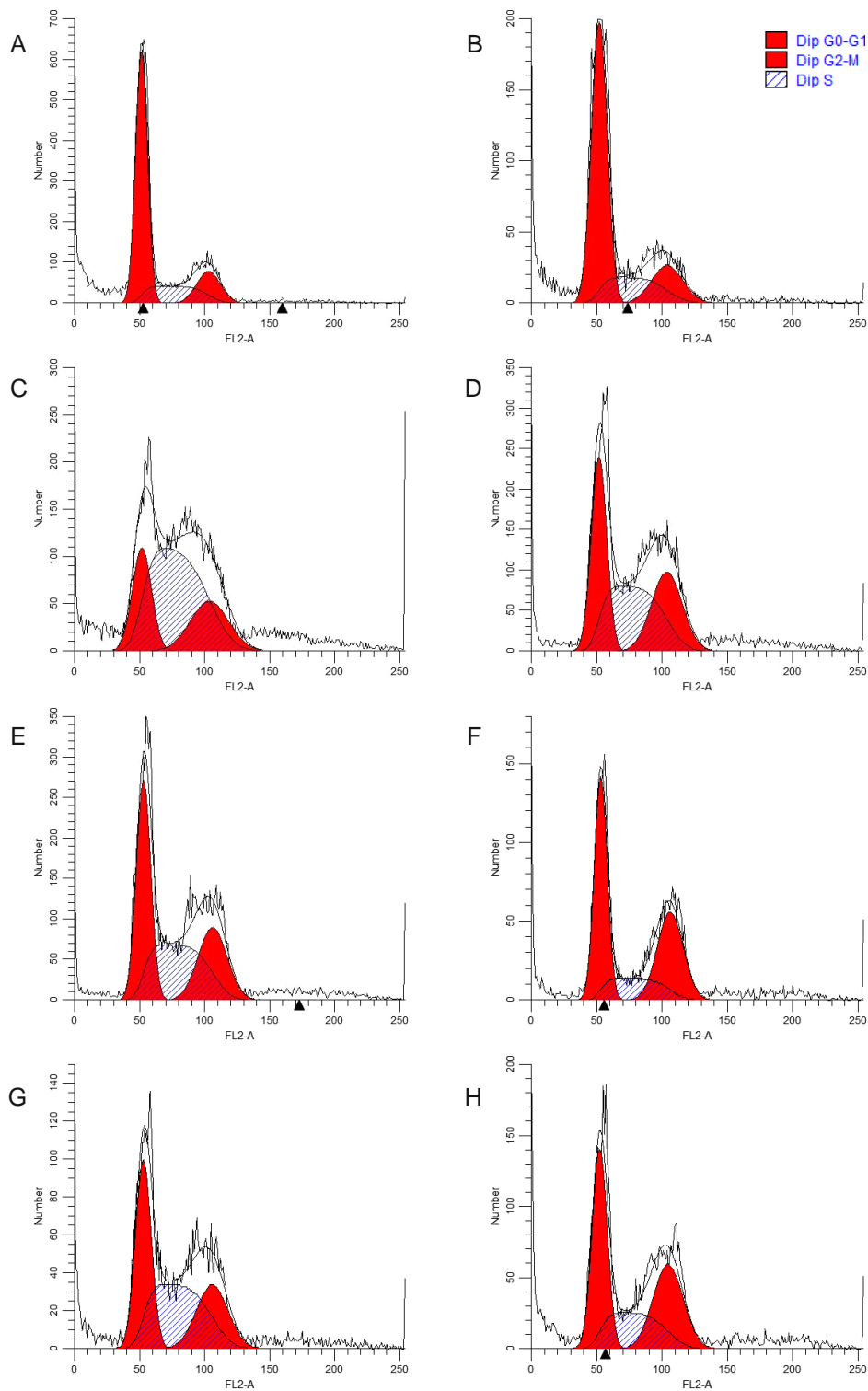
Rezultati dobiveni potonjom kombinacijom uz primijenjenu dozu γ -zračenja od 2.5 Gy pokazuju da se nakon 72 sata stanice najviše nakupljaju u fazama G_2 i M (oko 47 %), dok im se udio u fazi S smanjuje oko 7 % u odnosu na kontrolu. Tretman samom cisplatinom i zračenjem dovoljan je da se stanice nakon 72 sata zaustave najviše u fazama G_2 i M (46 %), što je gotovo dvostruko više u odnosu na kontrolu.



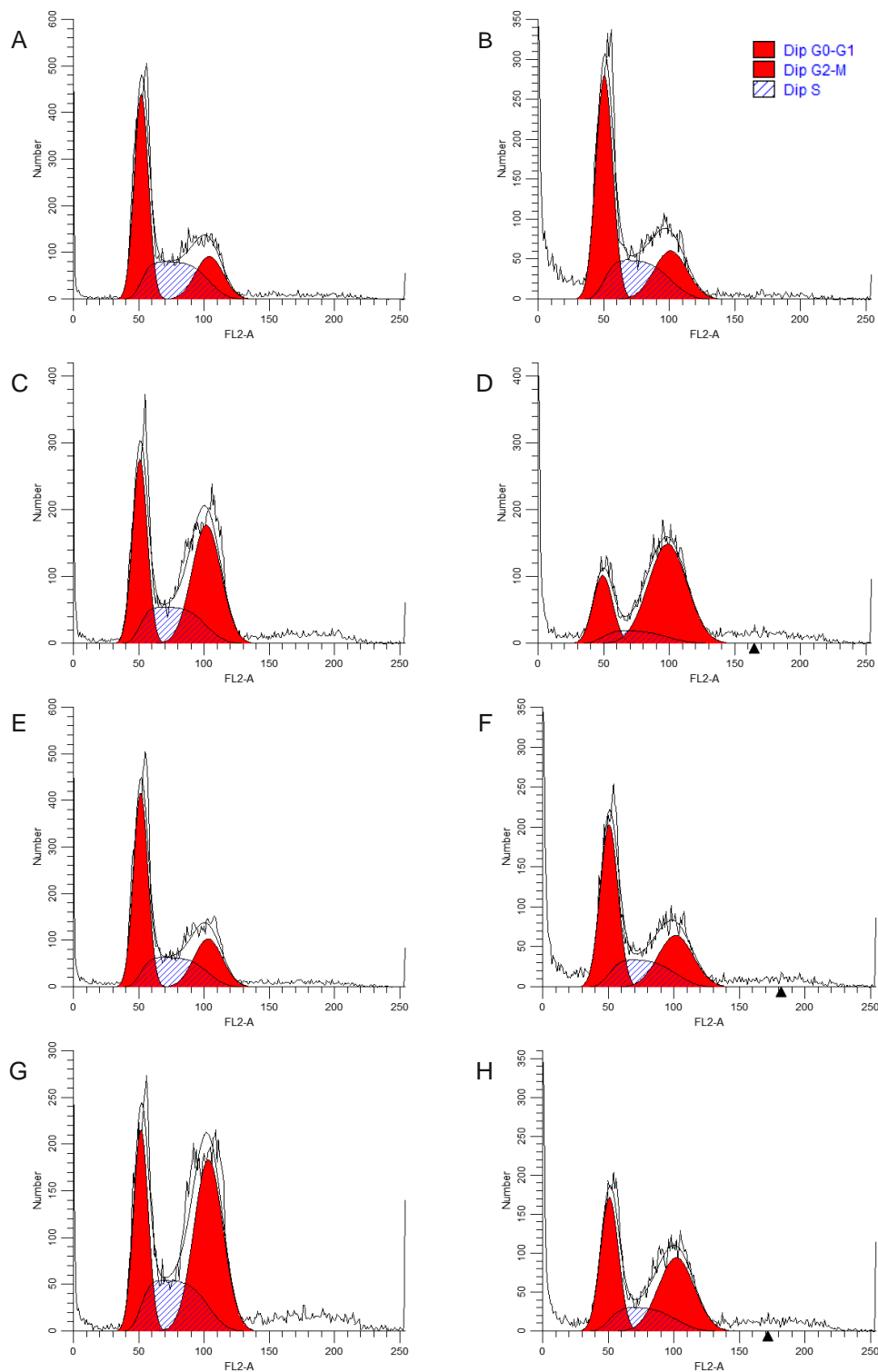
Slika 9. Prikaz udjela stanica u pojedinoj fazi staničnoga ciklusa nakon 24- i 72-satnog tretmana naznačenim reagensima (pIC = poli(I:C), cisPt = cisplatina, K = kontrola, netretirane stanice).



Slika 10. Prikaz udjela stanica u pojedinoj fazi staničnoga ciklusa nakon 24- i 72-satnog tretmana naznačenim agensima i dozom γ -zračenja od 2,5 Gy (pIC = poli(I:C), cisPt = cisplatina, K = kontrola, netretirane stanice).



Slika 11. Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom uz bojanje propidijevim jodidom 24 sata nakon tretmana kemoterapijom, odnosno kemoterapijom u kombinaciji sa zračenjem. A – D- kontrolne stanice u odnosu na zračenje (A = netretirane stanice, B = pIC, C = cisPt, D = pIC + cisPt); E – H- stanice zračene dozom zračenja od 2,5 Gy uz tretman kemoterapeuticima (E = netretirane stanice, F = pIC, G = cisPt, H = pIC + cisPt). Na apscisi je ukupna stanična fluorescencija (FL2-A), a na ordinati broj stanica. Slika prikazuje reprezentativni rezultat od 3 pokusa koji su dali sličan rezultat. (pIC = poli(I:C), 10 μ g/mL; cisPt = cisplatin, 1 mmol/L)



Slika 12. Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom uz bojanje propidijevim jodidom 72 sata nakon tretmana kemoterapijom, odnosno kemoterapijom u kombinaciji sa zračenjem. A – D- kontrolne stanice u odnosu na zračenje (A = netretirane stanice, B = pIC, C = cisPt, D = pIC + cisPt); E – H- stanice zračene dozom zračenja od 2,5 Gy uz tretman kemoterapeuticima (E = netretirane stanice, F = pIC, G = cisPt, H = pIC + cisPt). Na apsisci je ukupna stanična fluorescencija (FL2-A), a na ordinati broj stanica. Slika prikazuje reprezentativni rezultat od 3 pokusa koji su dali sličan rezultat. (pIC = poli(I:C), 10 μ g/mL; cisPt = cisplatin, 1 mmol/L)

5. RASPRAVA

Tumori su jedan od vodećih uzroka smrti u modernom društvu. Uz produženje životnoga vijeka ljudi raste i stopa oboljelih od zloćudnih bolesti. Stoga je pronalaženje odgovarajućih, specifičnih i neškodljivih načina liječenja bolesnika s tumorom jedan od glavnih izazova moderne medicine. Jedan od mogućih putova istraživanja svakako su TLR, čija se uloga u stanici i organizmu intenzivno istražuje od njihova otkrića u *D. melanogaster* do njihova pronalaska na stanicama brojnih tumora.

Budući da je brojnim istraživanjima pokazano da je ekspresija TLR povećana na stanicama raznih vrsta tumora, iznimno su važna daljnja istraživanja o njihovoj funkciji na tim stanicama. Posebno su vrijedni nalazi prema kojima su određeni TLR selektivno izraženi na stanicama tumora, a ne i na zdravim stanicama. Neke studije pokazale su kako je TLR3 izražen u tkivu tumora glave i vrata, ali ne i na susjednom zdravom tkivu (Pries i sur., 2008), a otprije je poznato da se stimulacijom TLR3 pokreće i urođeni i stečeni imunski odgovor. Stoga je aktivacija TLR3 dobra strategija u razvoju novih načina liječenja tumora. Budući da smo prethodnim istraživanjima pokazali da se aktivacijom TLR3 u kombinaciji s kemoterapeuticima smanjuje preživljenje stanica tumora, ovom studijom ispitano je može li se uvođenjem zračenja dodatno sniziti doze i kemoterapeutika i zračenja.

U istraživanju su korištene stanice Detroit 562 koje posjeduju mutirani tumorski supresorski gen *p53*. Osim što te stanice posjeduju funkcionalan TLR3 (Matijević i sur., 2009) na koji se može djelovati poli(I:C)-om i poli(A:U)-om te uzrokovati apoptozu, potvrđeno je da u tom procesu uloga *p53* nije ključna. Potonje je otkriće iznimno važno budući da većina stanica tumora posjeduje mutirani, nefunkcionalan tumorski supresorski gen/protein *p53*, što često predstavlja problem u liječenju tumora zračenjem i kemoterapijom zbog pojave rezistencije na takvo liječenje izbjegavanjem apoptoze.

Cisplatina je u upotrebi već nekoliko desetljeća kao citostatik s alkilirajućim djelovanjem koji tvori kovalentne veze s adeninom, gvaninom i citozinom u DNA i pri tome aktivira mehanizam popravka DNA te u konačnici apoptozu stanica. Tretman približnim koncentracijama LD₂₀ za cisplatinu i LD₅₀ za ligande TLR3 poli(I:C) i poli(A:U) pokazao je smanjenje preživljenja stanica tumora. Doza LD₂₀ za cisplatinu korištena je budući je u ovom slučaju cisplatina bila samo adjuvans, a osnovna meta bilo je ciljano uništavanje stanica tumora ždrijela aktivacijom TLR3. Tretman samim poli(I:C)-om i kombinacijom poli(I:C) i

cisplatine pokazao je bitno snažniji učinak na proliferaciju stanica Detroit 562 od kombinacije poli(A:U) i cisplatine.

Uzrok tomu mogao bi biti sljedeći: poli(A:U) specifičan je ligand za TLR3, dok je poli(I:C) ligand i citoplazmatskih RIG-I i MDA-5 receptora. Slično je nedavno pokazano i na staničnoj liniji tumora dojke čovjeka (Alizadeh i sur., 2013). Zbog toga se može zaključiti da sama aktivacija TLR3 nije dostatna za zadovoljavajuću inhibiciju rasta stanica Detroit 562, već je za jači apoptotski učinak na stanice tumora značajna i aktivacija drugih unutarstaničnih receptora za dsRNA. Činjenica da je izlaganje stanica poli(I:C)-u bez zračenja i bez kombinacije s cisplatinom izazvalo smanjenje proliferacije od 90 % u odnosu na kontrolu posebno je zanimljiva. Iako je takav oblik liječenja još daleko od kliničke primjene, to bi otkriće moglo pridonijeti korištenju dsRNA u monoterapiji ili eventualno u kombinaciji sa zračenjem s obzirom da zračenje dodatno snižava preživljenje stanica za 10 %. Ovakva kombinacija dodatno bi se trebala ispitati na stanicama tumora koje su postale rezistentne na zračenje. Moguće je da bi prethodno izlaganje stanica poli(I:C)-u uzrokovalo da stanice postanu radiosenzitivnima. Ujedno, ovo istraživanje pokazuje kako je u ovom slučaju poli(I:C) bolji kemoterapeutik od cisplatine s obzirom na opaženu veću učinkovitost uz selektivno djelovanje samo na stanice koje imaju izražen TLR3, dok je cisplatina djelovala neselektivno i izazivala oštećenja i zdravih stanica.

Iako je test citotoksičnosti (MTT test) pokazao da je tretman samim poli(I:C)-om dostatan za smanjenje rasta stanica od 90 % u odnosu na kontrolu, provedeno je dodatno istraživanje s ciljem utvrđivanja udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Budući da je uloga TLR3 u staničnom ciklusu još uvijek nepoznata te da postoji tek nekoliko literaturnih izvora o utjecaju poli(I:C) na stanični ciklus, ovo istraživanje kao prvo ispituje djelovanje dsRNA u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem na zaustavljanje stanica u određenim fazama staničnog ciklusa. Ranije istraživanje pokazalo je da tretman poli(I:C)-om uzrokuje zaustavljanje stanica fibroblasta u fazi G₁ (Hasan i sur., 2005). Isto tako, aktivacija TLR3 na β-stanicama gušterače uzrokovala je zaustavljanje tih stanica u G₁ fazi staničnog ciklusa (Wang i sur., 2013). Međutim, studije utjecaja poli(I:C) na stanice tumora gotovo i ne postoje.

Rezultati analize staničnoga ciklusa protočnim citometrom nakon opisanog izlaganja stanica djelovanju poli (I:C) i cisplatine tijekom 72 sata uzrokovao je zaustavljanje oko 63 % stanica u fazama G₂ i M, što predstavlja vrlo značajno otkriće, budući da su stanice u navedenim fazama staničnog ciklusa najosjetljivije na zračenje. Pri tome je nađeno da se

samo oko 12 % stanica zadržalo u fazi S, fazi staničnog ciklusa u kojoj su stanice najotpornije na zračenje. Budući da je jedan od glavnih problema tijekom liječenja razvoj rezistencije stanica tumora na kemoterapeutike i zračenje, ovi rezultati ukazuju da bi bilo korisno upotrijebiti navedenu kombinaciju kemoterapije kao oblik predtretmana gama-zračenju.

Ove rezultate potrebno je dalje detaljnije ispitati, i to korištenjem različitih kemoterapeutika i njihovih različitih koncentracija na većem broju stanica/tkiva tumora koji izražavaju TLR3.

Budući da je, zbog zaobilaženja normalne regulacije rasta i proliferacije te zakazivanja regulatornih mehanizama apoptoze, tkivo tumora najčešće otpornije na zračenje od zdravoga tkiva, ovo otkriće je od iznimnog značaja kao temelj daljnjih istraživanja u kliničkim studijama.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da aktivacija TLR3 na stanicama tumora ima protutumorsko djelovanje i farmakološki prilagođeni agonisti TLR3 već se nalaze u kliničkim ispitivanjima liječenja bolesnika s različitim tumorima. Pri tome se agonisti TLR3 uglavnom kombiniraju sa citostaticima kako bi se sinergijskim djelovanjem aktivirali različiti signalni putevi koji u konačnici dovode do jačeg umiranja stanica tumora nego kod primjene monoterapije. Kako je ovo još jedno u nizu istraživanja koje potvrđuje protutumorsku aktivnost TLR3, ali i prvo koje pokazuje učinak kombinacije agonista TLR3 i kemoterapeutika na stanični ciklus, potrebno je u daljnjim istraživačkim postupcima utvrditi mehanizam njihova djelovanja. Ti bi rezultati mogli unaprijediti buduća ispitivanja na animalnim modelima, a potom i u kliničkim studijama.

Razvoj ovakvog novog pristupa liječenju tumorskih bolesti unaprijedio bi dosadašnje terapijske postupke, ne samo zbog izrazitog protutumorskog učinka, već i zbog smanjenja nuspojava koje se pojavljuju uz uobičajeno liječenje citostaticima. Liječenje bolesnika s tumorom na klasičan način, kao što je liječenje cisplatinom, uzrokuje iznimno teške i neugodne nuspojave zbog citotoksičnih učinaka protutumorskih lijekova na zdrave stanice domaćina koje se intenzivno dijele. Uporabom poli(I:C) mogle bi se smanjiti potrebne doze ostalih protutumorskih lijekova, kao i doze zračenja te time smanjiti štetni učinci i nuspojave kemoterapije i radioterapije. Međutim, kako aktivacija TLR3 uzrokovana dsRNA može ponekad imati i pro-tumorsko djelovanje, potrebno je dodatno istražiti signalne puteve i ulogu ovih receptora u proliferaciji tumora, prije njihove konačne upotrebe u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

1. Testom citotoksičnosti pokazano je da poli(I:C) i bez kombinacije s cisplatinom djeluje citotoksično na 90 % stanica tumora ždrijela u odnosu na kontrolne stanice. U kombinaciji sa zračenjem taj se učinak djelomice povećava.
2. Cisplatina u kombinaciji s poli(I:C) i poli(A:U) ne pokazuje pojačani učinak na smrt stanica mjerenu testom citotoksičnosti.
3. Poli(A:U) uzrokuje vrlo blago smanjenje preživljenja stanica čak i u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem kada, u odnosu na kontrolu, umire svega 25 % stanica.
4. Poli(I:C) i cisplatina uzrokuju zaustavljanje većine metastatskih tumorskih stanica ždrijela Detroit 562 u fazama G₂ i M u kojima su stanice najosjetljivije na zračenje.
5. Kombinacija poli(I:C), cisplatine i zračenja mogla bi se koristiti u liječenju bolesnika s tumorima koji izražavaju funkcionalni TLR3.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem komentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na ukazanom povjerenju i pružanju mogućnosti izrade ovoga rada na Institutu Ruđer Bošković, te na vrijednim savjetima tijekom pisanja rada.

Zahvaljujem dr. sc. Jasminki Pavelić, znanstvenoj savjetnici, na stručnim savjetima i pomoći, kao i zaposlenicima Laboratorija za molekularnu onkologiju IRB-a na ukazanoj susretljivosti.

Dr. sc. Branki Mihaljević iz Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković" i Igoru Sajku zahvaljujem na svakoj pomoći u eksperimentalnom dijelu rada.

Najveća zahvala ide na račun mentorice dr. sc. Tanje Matijević Glavan; na stručnom vodstvu tijekom cjelokupnoga eksperimentalnog dijela i naročito tijekom pisanja rada, na strpljenju i uloženom trudu te na svim vještinama, znanjima i velikom interesu za znanstveni rad koje sam stekao za vrijeme zajedničke suradnje.

8. POPIS LITERATURE

Alizadeh N, Amiri MM, Salek Moghadam A, Zarnani AH, Saadat F, Safavifar F, Berahmeh A, Khorramizadeh MR. Effect of toll-like receptor 3 agonists on the functionality and metastatic properties of breast cancer cell model. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2013; 12(2):161-7.

Carty M, Reinert L, Paludan SR, Bowie AG. Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends Immunol.* 2014; 35(2):79-87.

Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, *et al.* Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res.* 2005; 6:1-10.

Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT, Microbiology & Gut Biology Group, Tayside Tissue & Tumour Bank. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology.* 2005; 115:565-74.

Hasan UA, Trinchieri G, Vlach J. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2005; 280(21):20620-7.

Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, Naiki Y, Koide N, Mori I, *et al.* Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer.* 2006; 6:281-8.

He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol.* 2007; 44:2850-9.

Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, *et al.* Toll-like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion *in vitro*. *Prostate* 2007; 67:774-81.

Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* 2004; 279:12542-12550.

Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*. 2008; 18;320(5874):379-81.

Matijevic T, Marjanovic M, Pavelic J. Functionally active toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells. *Scand J Immunol*. 2009; 70:18-24.

Matijevic T, Pavelic J. Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? *Curr Pharm Des*. 2010;16(9):1081-90.

Matijević T, Kirinec G, Pavelić J. Antitumor activity from the combined application of poli(I:C) and chemotherapeutics in human metastatic pharyngeal cell lines. *Chemotherapy*. 2011;57(6):460-7.

Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, *et al*. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res*. 2006; 4:437-47.

Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28: 886-92.

Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E, Riccioli A. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 2009; 29:1334-1342.

Papadimitraki ED, Tzardi M, Bertsiias G, Sotsiou E, Boumpas DT. Glomerular expression of toll-like receptor-9 in lupus nephritis but not in normal kidneys: implications for the amplification of the inflammatory response. *Lupus*. 2009; 18(9):831-5.

Pries R, Hogrefe L, Xie L, Frenzel H, Brocks C, Ditz C, Wollenberg B. Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int J Mol Med*. 2008; 21(2):209-15.

Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006; 176:4894-901.

Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res* 2007; 13:4565:4574.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*. 2005; 295:179-85.

Shapouri F, Saeidi S, Ashrafi Kakhki S, Pouyan O, Amirchaghmaghi E, Aflatoonian R. The expression of Toll-Like Receptors (TLRs) in testicular cancer: A case control study. *Iran J Reprod Med*. 2013; 11(11):919-24.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005; 17:1-14.

Taura M, Fukuda R, Suico MA, Eguma A, Koga T, Shuto T, Sato T, Morino-Koga S, Kai H. TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poli I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci*. 2009; 101:1610- 1617.

Tchórzewski M, Lewkowicz P, Dziki A, Tchórzewski H. Expression of Toll-Like Receptors on Human Rectal Adenocarcinoma Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 (in Press)

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21:13-25.

Wang H, Zhou M, Brand J, Huang L. Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1170:596-603.

Wang Y, Liu L, Davies DR, Segal DM. Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *J Biol Chem*. 2010; 285(47):36836-41.

Wang Y, Wu H, Gao L, Chen S, Gu L, Ding Z, Guo J. Elevated toll-like receptor 3 inhibits pancreatic β -cell proliferation through G1 phase cell cycle arrest. *Mol Cell Endocrinol*. 2013; 377(1-2):112-22.

Xie W, Wang Y, Huang Y, Yang H, Wang J, Hu Z. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDAMB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379:1027-32.

9. SAŽETAK

Antonio Kobeščak

UTJECAJ KOMBINIRANE PRIMJENE DVOLANČANE RNA, CISPLATINE I ZRAČENJA NA PREŽIVLJENJE STANICA TUMORA ŽDRIJELA ČOVJEKA

Toll-like receptori (TLR) omogućuju domaćinu prepoznavanje niza molekularnih sljedova podrijetlom od patogena (PAMP) aktivirajući prirodni i stečeni imunski odgovor. U nedavnim su istraživanjima TLR identificirani na brojnim vrstama tumora čovjeka. TLR3 je unutarstanični receptorski protein koji veže dvolančanu RNA (dsRNA). Nađeno je da je funkcionalan TLR3 izražen u stanicama tumora metastaza karcinoma ždrijela te da njegova aktivacija uzrokuje apoptozu stanica tumora. Stoga je u ovom istraživanju ispitan učinak pojedinačne i kombinirane primjene specifičnog liganda TLR3 (poli(A:U)) i nespecifičnog liganda TLR3 (poli(I:C)) s citostatikom cisplatinom i γ -zračenjem na rast i preživljenje stanica tumora ždrijela Detroit 562. Također je ispitano postoji li sinergistički utjecaj kombinirane primjene poli(I:C) i cisplatine na zaustavljanje stanica tumora Detroit 562 u određenoj fazi staničnog ciklusa, o čemu do sada ne postoje literaturni podaci. Testom citotoksičnosti pokazano je da poli(I:C) i bez kombinacije s cisplatinom djeluje citotoksično na 90 % stanica tumora ždrijela u odnosu na netretirane stanice, dok se u kombinaciji sa zračenjem taj učinak blago povećava. Cisplatina u kombinaciji s poli(I:C) i poli(A:U) ne pokazuje snažan učinak na smrt stanica mjerenu testom citotoksičnosti u odnosu na svaki tretman zasebno. Tretman s poli(A:U) uzrokuje vrlo blago smanjenje preživljenja stanica čak i u kombinaciji s cisplatinom i γ -zračenjem. Analizom pomoću protočnog citometra, uz bojenje stanične DNA propidijevim jodidom, utvrđeno je da primijenjena kombinacija poli(I:C)-a i cisplatine uzrokuje zaustavljanje većine stanica tumora ždrijela Detroit 562 u fazama G₂ i M, u kojima su stanice najosjetljivije na zračenje. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju kako bi se kombinacija poli(I:C), cisplatine i γ -zračenja mogla koristiti u liječenju bolesnika s tumorima koji izražavaju funkcionalni TLR3, uz korištenje relativno niskih doza lijekova i zračenja za postizanje zadovoljavajućeg protutumorskog učinka.

Ključne riječi: TLR3, poli(A:U), poli(I:C), cisplatina, stanični ciklus

10. SUMMARY

Antonio Kobešćak

EFFECTS OF COMBINED APPLICATION OF DOUBLE-STRANDED RNA, CISPLATIN AND RADIATION ON HUMAN PHARYNGEAL CANCER CELL SURVIVAL

Toll-like receptors (TLRs) enable their host to recognize a series of molecular motifs derived from pathogens (PAMPs) by activating innate and adaptive immune responses. In recent studies TLRs have been found in various human tumor cells. TLR3 is an intracellular protein receptor that binds double-stranded RNA (dsRNA). It has been reported that the functional TLR3 is expressed in pharyngeal metastatic tumor cells and its activation drives them to apoptosis. Therefore, in this study we studied the effect of individual and combined application of a specific TLR3 ligand, poly(A:U), and a non-specific TLR3 ligand, poly(I:C), with antitumor drug cisplatin and γ -irradiation on the growth and survival of human metastatic cancer cell line Detroit 562. In addition, a possible synergistic effect of combined administration of poly(I:C) and cisplatin on cell cycle arrest in tumor cells Detroit 562 was tested. As far as we know from the literature, there are no data on cell cycle distribution after this combination therapy. According to cytotoxicity assay poly(I:C), even without combining with cisplatin, had cytotoxic effect on 90 % of pharyngeal tumor cells, whereas in combination with radiation, the effect slightly increased. Cisplatin in combination with poly(I:C) and poly(A:U) did not significantly increase cell death (measured by cytotoxicity assay) compared to the each agent alone. Treatment with poly(A:U) caused only a slight decrease in cell survival, even in combination with cisplatin and γ -irradiation. Cell cycle distribution was analyzed after cell staining with propidium iodide using a flow cytometer. It was observed that the majority of Detroit 562 tumor cells were stopped in G2 and M phases of the cell cycle in which the cells are most radiosensitive. The results of this study demonstrate how the combination of poly(I:C), cisplatin and γ -radiation could be used in the treatment of patients with tumors that express functional TLR3. This allows the usage of lower doses of drugs and radiation thus maximizing the antitumor effect while limiting their toxicities.

Key words: TLR3, poly(A:U), poly(I:C), cisplatin, cell cycle