

Izražaj gena RNazeH2A u uzorcima pacijenata s recidivirajućim urotelnim tumorima mokraćnog mjehura

Beara, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:285777>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Mia Beara

**IZRAŽAJ GENA RNazeH2A U UZORCIMA PACIJENATA S
RECIDIVIRAJUĆIM UROTELNIM TUMORIMA MOKRAĆNOG MJEHURA**

Diplomski rad

Akadska godina: 2019./2020.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Mia Beara

**IZRAŽAJ GENA RNazeH2A U UZORCIMA PACIJENATA S
RECIDIVIRAJUĆIM UROTELNIM TUMORIMA MOKRAĆNOG MJEHURA**

Diplomski rad

Akadska godina: 2019./2020.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija

Tema rada je prihvaćena na 64. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 26. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

IZRAŽAJ GENA RNazeH2A U UZORCIMA PACIJENATA S RECIDIVIRAJUĆIM UROTELNIM TUMORIMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Mia Beara, broj indeksa 161

Sažetak:

Ovo istraživanje temelji se na proučavanju izražaja gena RNazaH2A koji ima važnu ulogu u patofiziološkom procesu različitih vrsta karcinoma među kojima je i karcinom mokraćnog mjehura. Ljudski RNazeH2 kompleks djeluje kao supresor tumora jer održava stabilnost genoma u normalnim fiziološkim uvjetima. Cilj istraživanja je utvrditi mogućnost korištenja izražaja gena RNazeH2A kao biljega vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura u usporedbi s tumorom koji je nerecidivirajući. Uzorci tumora mokraćnog mjehura su uklopljeni u parafinske blokove iz kojih je izolirana RNA koja je prevedena u cDNA te je potom korištena za qRT-PCR. Rezultati dobiveni pomoću qRT-PCR-a predstavljaju Ct (cycle threshold) vrijednosti koja definira ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadani prag detekcije. $\Delta\Delta Ct$ pokazuje relativne vrijednosti promjena ciljnog gena u odnosu na kontrolni, a proporcionalna je ekspresiji gena. U ovom istraživanju uspoređivali smo tri skupine uzoraka tumorskih tkiva (34 uzorka tumorskih tkiva koji neće recidivirati (NR), 17 uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) te 11 uzoraka tumorskih tkiva recidiva (R2)) te su mjerene relativne promjene izražaja gena RNazeH2A. $\Delta\Delta Ct$ za tri skupine, prethodno navedene, uspoređivane su jednosmjernom analizom varijance, ANOVA testom. $\Delta\Delta Ct$ je uspoređena i za 10 uzoraka R1 i R2 od istog pacijenta, a vrijednosti su uspoređivane uparenim T-testom. $\Delta\Delta Ct$ za sve tri skupine nisu se statistički značajno razlikovale ($P = 0,616$). Vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ za R1 i R2 od istih pacijenata također nisu bile značajno različite ($P = 0,4391$). Zbog navedenog zaključujemo da nema razlike u izražaju gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s uzorcima tumorskih tkiva koji neće recidivirati. Nema razlike ni u izražaju gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati i uzoraka tumorskih tkiva recidiva kod istih pacijenata. Izražaj gena RNazeH2A nije moguće koristiti kao biljeg vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura u usporedbi s tumorom koji neće recidivirati.

Ključne riječi: RNazaH2A, qRT-PCR, urotelni tumor, mokraćni mjehur, recidivirajući, nerecidivirajući tumori

Rad sadrži: 45 stranica, 5 slika, 6 tablica, 80 referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Maja Valić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Anita Markotić, član
3. Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 23.10.2010.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences

Scientific field: Pharmacy

Course title: Medical Chemistry and Biochemistry

Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy,

session no. 64 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28 and Faculty Council of School of Medicine, session no.26

Mentor: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

Technical assistance: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić

Expression of RNaseH2A gene in samples from patients with recurrent urothelial bladder cancer

Mia Beara, broj indeksa 161

Summary:

This research is based on the study of the expression of the RNaseH2A gene, which plays an important role in the pathophysiological process of various types of cancer, including bladder cancer. The human RNaseH2 complex acts as a tumor suppressor because it keeps genome stability under normal physiological conditions. The aim of the study was to determine the possibility of using the expression of the RNaseH2A gene as a marker of the probability of recurrent urothelial tumor compared to a tumor that is non-recurrent. The samples were embedded in paraffin blocks from which RNA was isolated, converted to cDNA and then used for a qRT-PCR. The results obtained by qRT-PCR represent Ct (cycle threshold) values which defines the cycle in which the fluorescent signal exceeds the set detection threshold. $\Delta\Delta Ct$ determines the relative values of changes in the target gene compared to the control and is directly proportional to the expression of the target gene in the sample. In this study, we compared three groups of tumor tissues (34 samples of tumors that would not recur (NR), 17 samples of tumors that would recur (R1), and 11 samples of tumor recurrence tissues (R2)) and measured relative changes in RNaseH2A gene expression. $\Delta\Delta Ct$ for the previously mentioned three groups, were compared by one-way analysis of variance, ANOVA test. $\Delta\Delta Ct$ was compared for 10 samples of R1 and R2 from the same patient. $\Delta\Delta Ct$ values for R1 and R2 were compared by paired T-test. $\Delta\Delta Ct$ for all three groups were not significantly different (P-value was 0.616). The $\Delta\Delta Ct$ values for R1 and R2 from the same patients also didn't show statistically significant difference (P-value was 0.4391). There is no difference in RNaseH2A gene expression in samples of urothelial bladder tumors that would recur compared with samples of tumor tissues that would not recur. There is also no difference in RNaseH2A gene expression in urinary bladder tumor samples that would recur and tumor recurrence tissue samples in the same patients. RNaseH2A gene expression cannot be used as a marker of the likelihood of urothelial bladder tumor recurrence compared to a tumor that would not recur.

Keywords: RNaseH2A, qRT-PCR, urothelial tumor, bladder, recurrent tumors, non-recurrent tumors

Thesis contains: 45 pages, 5 figures, 6 tables, 80 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Maja Valić, PhD, assoc. prof., chair person
2. Anita Markotić, PhD, full prof, member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

Defence date: October 23rd, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Anatomska i histološka građa mokraćnog mjehura	2
1.2. Karcinom mokraćnog mjehura	4
1.2.1. Epidemiologija.....	4
1.2.2. Etiologija i čimbenici rizika	4
1.2.3. Klinička slika.....	5
1.2.4. Dijagnostika.....	6
1.2.5. Stupnjevanje bolesti.....	6
1.2.6. Liječenje.....	9
1.3. RNaza (RIBONUKLEAZA).....	10
1.3.1. RNazaH2.....	10
1.3.1.1. Struktura RNazeH2.....	11
1.3.1.2. Uloga RNazeH2.....	11
1.3.1.3. Povezanost RNazeH2A i karcinoma.....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	14
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	16
3.1. Ispitanici.....	17
3.2. Postupak izolacije RNA iz parafinskih blokova	17
3.3. Spektrofotometrija	18
3.4. Sinteza cDNA.....	19
3.4.1. Postupak sinteze cDNA.....	19
3.5. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	20
3.6. Test efikasnosti primera (eng. Primer efficiency test).....	20
3.6.1. Standardna krivulja efikasnosti početnica RNazeH2A.....	20
3.7. Statistička analiza.....	21
4. REZULTATI	22
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČCI	29
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	31
8. SAŽETAK	39

9.	SUMMARY	41
10.	ŽIVOTOPIS.....	44

Zahvala

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić za pomoć i strpljenje prilikom izrade ovog diplomskog rada jer je time uljepšala kraj moga studiranja.

Od srca zahvaljujem svojim bližnjima koji su sve ove godine studiranja bili velika potpora.

1. UVOD

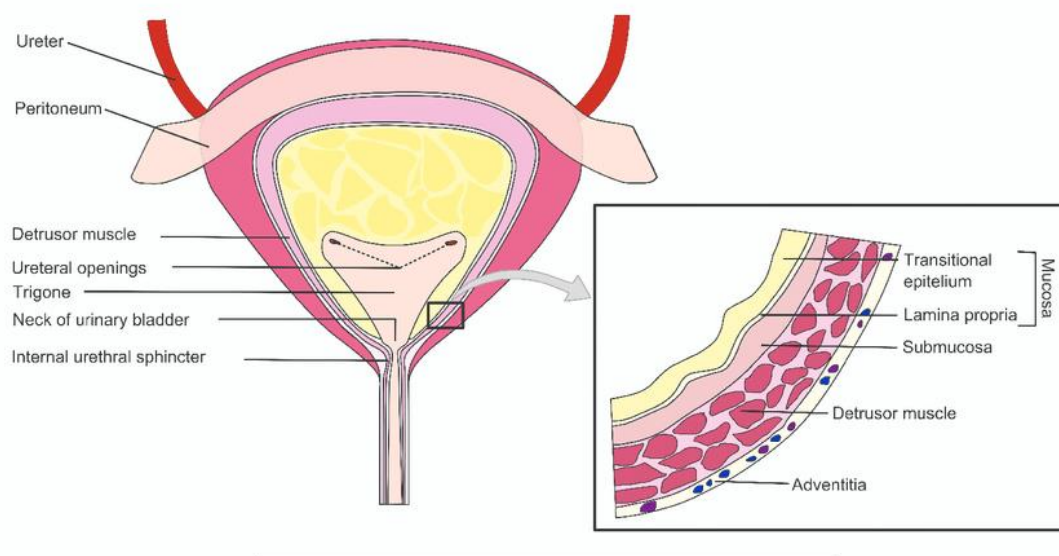
1.1. Anatomska i histološka građa mokraćnog mjehura

Mokraćni mjehur (lat. *vesica urinaria*) zajedno s bubrezima (lat. *ren*), mokraćovodima (lat. *ureter*) i mokraćnom cijevi (lat. *urethra*) čini mokraćni sustav. Urin se prikuplja u bubrezima, transportira putem mokraćovoda u mokraćni mjehur gdje se skladišti nakon čega se izbacuje iz organizma putem mokraćne cijevi (1).

Mokraćni mjehur je šuplji organ smješten u prednjem donjem dijelu male zdjelice, dok se u punom stanju, u kojem može sadržavati do 500 mL, nalazi unutar trbušne šupljine (2). S prednje strane mokraćnog mjehura nalazi se simfiza stidne kosti, a sa stražnje strane kod žena je prednja rodnička stijenka, a kod muškaraca rektum. Anatomski se dijeli na bazu (lat. *fundus*), vrat (lat. *cervix*), tijelo (lat. *corpus*) i vrh (lat. *apex*) (3). U području baze nalazi se složena anatomska struktura oblika trokuta zvana trigonum (lat. *trigonum vesicae*) na čijim vrhovima ulaze mokraćovodi, a dalje se nastavlja mokraćna cijev (4). Ureteri u mokraćni mjehur ulaze pod kosim kutem, okruženi kružnim mišićnim vlaknima što sprječava vraćanje mokraće, tzv. vezikoureteralni refluks. Najniži i najučvršćeniji dio mjehura je vrat koji se u muškaraca nastavlja na prostatu, a u žena leži na preponskoj fasciji koja okružuje mokraćnu cijev. Stijenkuru vrata čini detruzorski mišić koji se u tom području naziva unutarnji sfinkter. Za razliku od glatkog mišićja unutarnjeg sfinktera, vanjski sfinkter je skeletni mišić koji je pod našom kontrolom (5, 6) (Slika 1).

Glavninu živčane opskrbe mjehura ostvaruju pelvični živci koji sadržavaju senzorička i motorička živčana vlakna. Kad je mjehur pun, senzorička vlakna detektiraju istegnutost mokraćnog mjehura. Motorička živčana vlakna su parasimpatička vlakna koja inerviraju mišić detruzora i dovode do njegove kontrakcije, što je glavni korak u pražnjenju mokraćnog mjehura. Mjehur prima i simpatičku inervaciju preko hipogastričnih živaca pri čemu dolazi do relaksacije mišića detruzora i kontrakcije unutarnjeg sfinktera. Simpatička vlakna sprječavaju mokrenje i aktiviraju se onda kad je mjehur prazan. Konačno, somatska živčana vlakna inerviraju voljni skeletni mišić sfinktera uz pomoć kojeg je moguće svjesno spriječiti mokrenje (6). Arterijska opskrba mokraćnog mjehura dolazi od ogranaka unutarnje ilijačne arterije, donje vezikalne arterije koja je njen neposredni ogranak i gornje vezikalne arterije koja je ogranak umbilikalne arterije. Vene prate arterije, venska krv odlazi u vezikalni pleksus te preko njega u donje vezikalne vene i dalje u unutarnju ilijačnu venu. Limfa iz gornjeg dijela mokraćnog mjehura ide u vanjske ilijačne čvorove, a iz donjeg dijela u unutarnje ilijačne čvorove (5).

Mikroskopski gledano, presjek stijenke mokraćnog mjehura građen je u sljedećim slojevima iznutra prema van: epitelni pokrov, lamina proprija, muskularis proprija i adventicija ili serozni sloj (Slika 1). Terapija, dijagnoza i prognoza oboljelih od karcinoma mokraćnog mjehura ovise o stupnju bolesti koji se određuje ovom podjelom, stoga je bitno pravilno raspoznati slojeve mokraćnog mjehura (7). Epitel dijelom podsjeća na nekeratinizirajući višeslojni pločasti, a dijelom na pseudostratificirani cilindrični epitel zbog čega se naziva „prijelaznim“, dok je preferirani naziv „urotel“. Urotel je u rastegnutom stanju debljine 2-3 sloja stanica, a u opuštenom debljine 7-8 slojeva stanica koje mogu biti površinske, intermedijarne ili bazalne (8). Površinske stanice su u dodiru s urinom i služe kao barijera. Izbočuju se u lumen i poput kišobrana prekrivaju manje intermedijarne stanice, a spljoštene su kad je mjehur pun (9). Lamina proprija, sloj rahlog vezivnog tkiva razdvaja pokrovni epitel od mišićnog sloja. Sastoji se od elastičnih vlakana, krvnih i limfnih žila i živčanih završetaka (4). Muscularis proprija, glatko mišićje mokraćnog mjehura, nazvano detruzorsko mišićje, čine mišićne niti smješte u tri međusobno povezana sloja: unutarnji i vanjski sloj uzdužnog mišića i srednji sloj kružnog mišića. U području vrata mokraćnog mjehura slojevi se mogu jasno razlikovati dok u ostatku mjehura tek u svim smjerovima (10). Mišićni sloj s vanjske strane pokriva adventicija, sloj rahlog tkiva. Gornji dio mokraćnog mjehura i dio donjeg dijela u muškaraca prekriveni su serozom (5).



Slika 1. Prikaz anatomske i histološke građe mokraćnog mjehura.

(preuzeto s: <https://medicalxpress.com/news/2016-05-mechanics-urinary-bladder.html>)

1.2. Karcinom mokraćnog mjehura

1.2.1. Epidemiologija

Karcinom mokraćnog mjehura deseti je najčešći karcinom na svijetu, a njegova učestalost neprestano raste (11, 12). Najčešći tip je karcinom prijelaznih stanica (urotelni ili tranzitocelularni karcinom) čija je zastupljenost 90% (13). To nije iznenađujuće s obzirom da su urotelne stanice najviše izložene okolišu i potencijalno mutagenim agensima koji su filtrirani u mokraću putem bubrega (14). Manje zastupljeni su karcinom pločastih stanica i adenokarcinom (13). U 2018. procijenjeno je da je u 550 000 ljudi dijagnosticiran karcinom mokraćnog mjehura, što iznosi otprilike 3% dijagnoza raka. Južna i Zapadna Europa, kao i Sjeverna Amerika bilježe najvišu incidenciju. Četiri puta više zahvaća muškarce nego žene, a medijan dobi dijagnoze je 70 godina. Grčka ima najvišu stopu raka mokraćnog mjehura među muškarcima, a Libanon među ženama (3, 11).

1.2.2. Etiologija i čimbenici rizika

Postoji niz čimbenika rizika za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura, a pušenje duhana daleko je najveći. Pušenje povećava rizik od karcinoma mokraćnog mjehura čak tri do četiri puta i tako uzrokuje 50-65% novih slučajeva svake godine. Relativni rizik smrtnosti od raka mokraćnog mjehura zbog pušenja na drugom je mjestu nakon karcinom pluća (15). Prestanak pušenja smanjuje rizik od raka mokraćnog mjehura za oko 40% u roku 1-4 godine, a potpuno smanjuje rizik za 20 godina (16). Yan i sur. su u meta-analizi 14 studija pokazali da pasivni pušači imaju 22% veći rizik za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura u usporedbi s nepušačkom populacijom koja nije izložena duhanskom dimu (17).

Drugi najveći čimbenik rizika za razvoj raka mokraćnog mjehura je profesionalna izloženost kancerogenim tvarima, uključujući aromatske amine (benzidin i anilinske boje), policikličke aromatske ugljikovodike i klorirane ugljikovodike (18). Uglavnom se koriste u industrijskoj obradi boja, kože, metala, gume i naftnih derivata (16). Procijenjeno je da je profesionalna izloženost odgovorna za 18% slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura (19). Važna odrednica u individualnoj osjetljivosti na karcinogene određena je genetskim polimorfizmima u genima za popravak DNA i detoksifikaciju, kao što su N-acetiltransferaza (NAT) i glutation S-transferaza (GSMT) (3).

Iako se rak mokraćnog mjehura obično ne smatra nasljednim, određena stanja mogu biti predisponirajući čimbenici. Primjer je Cowdenov sindrom u kojem postoje nasljedna oštećenja tumor-supresorskog gena PTEN-a (20). Somatske mutacije uključene u karcinogenezu su mutacije

u genu za receptor fibroblastnog faktora rasta (engl. fibroblast growth factor, FGFR) koje se pronalaze u čak 20% pacijenata s recidivirajućim karcinomom mokraćnog mjehura i mutacije gena p53 (21, 22).

U Africi je česta infekcija *Schistosomom haematobium* koja povećava rizik za karcinom pločastih stanica (23). Neki dodatni čimbenici rizika su izloženost spojevima arsena u pitkoj vodi (24), terapijska upotreba fenacetina i ciklofosfamida (25), prehrana bogata crvenim i prerađenim mesom (26) te pretilost, gdje povećanje indeksa tjelesne mase (ITM) od 5 kg/m² rezultira povećanjem rizika za 4,2% (27).

1.2.3. Klinička slika

Temeljni znak karcinoma mokraćnog mjehura je hematurija, krv u mokraći (28). Hematurija može biti vidljiva prostim okom (makrohaturija) ili vidljiva samo mikroskopom (mikrohaturija) koja je definirana kao prisutnost 3 ili više eritrocita u vidnom polju (29). Hematurija je bezbolna i javlja se povremeno zbog čega je bolesnici često zanemare, a može biti uzrokovana i raznim benignim stanjima, uključujući menstruaciju, infekciju mokraćnog sustava, traumu i hipertrofiju prostate, zbog čega je specifičnost hematurije u otkrivanju raka mokraćnog mjehura prilično niska te je potrebna daljna obrada (30). Budući da je hematurija isprekidane prirode, mnogi autori zalažu se za cistoskopsko ispitivanje u slučaju uzorka s hematurijom čak i ako ponovljeno ispitivanje ne pokaže ništa (31). U starijih pacijenata, pušača i kod osoba izloženih karcinogenima koji su pod povećanim rizikom za razvoj raka mokraćnog mjehura, potrebno je na početku obrade napraviti cistoskopsko ispitivanje (32).

Kod mišićno-invazivnog karcinoma, zbog invazije karcinoma izvan epitela, smanjuje se kapacitet mjehura i pretjerano je aktivan, što uzrokuje iritativne simptome kao što su učestalo mokrenje, nikturija, disurija i urgencija. Iritativni simptomi su česti i kod karcinoma in situ. Opstruktivni simptomi mogu biti prisutni ako se tumor nalazi u blizini vrata mokraćnog mjehura i mokraćne cijevi. Tada pacijent može imati simptome poput slabog i isprekidanog mlaza urina, otežanog mokrenja i osjećaja nepotpunog pražnjenja mjehura (33). Kod uznapredovale bolesti prisutni su opći simptomi kao što su slabost, umor, gubitak apetita i tjelesne težine. Lokalno širenje karcinoma može dovesti do hidronefroze i limfedema (34). Karcinom najčešće metastazira u limfne čvorove, kosti, pluća, jetru i peritoneum pa se u slučaju metastaza javljaju simptomi poput abdominalne i koštane boli (35).

1.2.4. Dijagnostika

Cistoskopija je temeljna dijagnostička pretraga za otkrivanje karcinoma mokraćnog mjehura. Učinkovita je i invazivna pretraga kojom se uz pomoć cistoscopa vizualiziraju tumorske promjene unutar mokraćnog mjehura (36). Osjetljivost i specifičnost kreću se od 62 do 84%, odnosno 43 do 98%, ovisno o vrsti, stadiju i gradusu tumora (37). Ima nisku osjetljivost za karcinom in situ (Tis), a tumori se mogu i izostaviti jer učinkovitost ovisi o operateru, što je uglavnom slučaj kod otkrivanja recidiva (36). Ako se tijekom cistoskopije uoči abnormalno područje, treba napraviti biopsiju, a postupak koji se koristi naziva se transuretralna resekcija (TUR). Tijekom ovog postupka, liječnik uklanja tumor i dio mišića mokraćnog mjehura oko tumora. Uzorci se šalju na patohistološku analizu koja daje podatke potrebne za konačnu dijagnozu, određivanje stadija i gradusa karcinoma, temeljeg čega se određuje prognoza i liječenje (33).

Citologija urina je neinvazivna dijagnostička metoda kojom se urin ispituje na odljuštene maligne stanice pomoću mikroskopa. Ima visoku osjetljivost (veću od 90%) za urotelne tumore visokog stupnja i karcinom in situ, ali nisku osjetljivost za tumore niskog stupnja, stoga negativni nalazi ne isključuju malignost (38). U urinu se mogu detektirati i različiti tumorski markeri uz pomoć testova kao što su *UroVysion test*, *ImmunoCyt test* ili *NMP-22 test*. Testovi traže specifične tvari (proteini, metaboliti) čija se prisutnost ili razlika u ekspresiji može povezati s karcinomom mokraćnog mjehura (39, 40).

Potrebno je napraviti i slikovne testove kojim se utvrđuje proširenost karcinoma na tkiva i organe u blizini mokraćnog mjehura, na obližnje limfne čvorove ili na udaljene dijelove tijela. Pritom se koriste različite radiološke pretrage kao što su ultrazvuk urotrakta, intravenska urografija, kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR) (41).

1.2.5. Stupnjevanje bolesti

Stadij tumora i histološki gradus najbitniji su parametri koji se koriste u prognostičke i terapijske svrhe. TNM klasifikacija (eng. *tumor, lymph nodes, metastasis*) izdana od Američkog udruženja za rak (engl. American Joint Comitee on Cancer, AJCC) služi za procjenu stadija proširenosti karcinoma mokraćnog mjehura (tablica 1.) (42).

Tablica 1. TNM-klasifikacija mokraćnog mjehura prema AJCC.

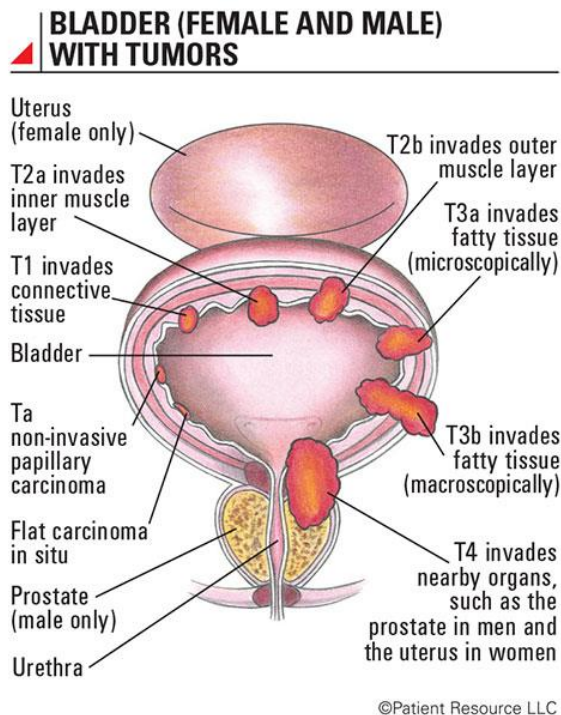
Primarni tumor (T)	
Tx	Tumor se ne može procijeniti
T0	Nema dokaza tumora
Ta	Neinvazivni papilarni karcinom
Tis	Karcinom in situ
T1	Invazija tumora u subepitelno vezivno tkivo
T2	Invazija tumora u mišićni sloj
T2a	Invazija tumora u površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
T2b	Invazija tumora u duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	Invazija tumora u perivezikalno tkivo
T3a	Mikroskopska invazija tumora u perivezikalno tkivo
T3b	Makroskopska invazija tumora u perivezikalno tkivo
T4	Invazija tumora u stromu prostate, sjemene mjehuriće, maternicu, vaginu, zdjeličnu ili trbušnu stjenku
T4a	Invazija tumora u stromu prostate, sjemene mjehuriće, maternicu ili Vaginu
T4b	Invazija tumora u zdjeličnu ili trbušnu stjenku
Regionalni limfni čvorovi (N)	
NX	Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
NO	Nema metastaza u regionalne limfne čvorove
N1	Jedan zahvaćen regionalni limfni čvor zdjelice
N2	Više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici (hipogastričnom, opturatornom, vanjskom ilijakalnom ili presakralnome limfnom čvoru)
N3	Metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima (hipogastričnim, opturatornim, vanjskim ilijakalnim ili presakralnim limfnim čvorovima)
Udaljene metastaze (M)	
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljenje metastaze

Tumori mokraćnog mjehura mogu biti površinski, koji su zastupljeni oko 70%, i mišićno-invazivni (43).

Površinski tumor su tumori stadija Ta (70%), T1 (20%) i Tis (10%) (44). 50-70% površinskih tumora čine recidivi, a 10-20% će ih prodrijeti kroz mišićni sloj (45). Recidivi su najčešći kod stadija Ta, dok je progresija glavna prijetnja stadija T1 i Tis (13). Tumori koji prodiru kroz mišićni sloj su invazivni, stadija T2, T3 i T4 (45) (Slika 2).

Petogodišnje preživljavanje za stadij T1 je 75%, za T2 50%, a T3 20%. Općenito, loši prognostički faktori su limfovaskularna invazija, prisutnost karcinoma in situ, recidivi, velika veličina tumora i multicentričnost (46). Trajanje od TUR-a do prvog recidiva i učestalost

prethodnih recidiva dramatično utječu na rizik od recidiva tumora. Od pacijenata bez recidiva pri prvom praćenju cistoskopije, 79% nije imalo recidiva prilikom sljedećeg praćenja. Međutim, u bolesnika s recidivom nakon 3 mjeseca, samo u 10% nije bilo recidiva tijekom praćenja od 1 godine (47). Zaključno, mišićno ne-invazivni tumori imaju bolju prognozu od onih koji pokazuju znakove mišićne invazije, ali česti recidivi uvjetuju dugoročno praćenje.



Slika 2. Stadiji tumora mokraćnog mjehura: Ta, Tis, T1, T2, T2a, T2b, T3a, T3b i T4. (preuzeto s: https://www.patientresource.com/Bladder_Cancer_Staging.aspx)

Određivanje gradusa tumora prema stupnju diferenciranosti, odnosno prema stupnju zloćudnosti je bitan pokazatelj prognoze tumora. Trenutno za određivanje histološkog gradusa postoje 2 klasifikacije, klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO) iz 1973. i 2004. Klasifikacija iz 1973. preferirana je od nekih autora jer omogućuje usporedu rezultata, robusna je, vremenski testirana i reproducibilna. Tumor se klasificira u 3 gradusa ili stupnja zloćudnosti ovisno o staničnoj i jezgrinoj abnormalnosti i mitotskoj aktivnosti tumorskih stanica:

G1: dobro diferencirani tumor

G2: srednje diferencirani tumor

G3: loše diferencirani tumor (48, 49)

1.2.6. Liječenje

Liječenje karcinoma mokraćnog mjehura ovisi o patološkom opsegu bolesti u vrijeme provođenja transuretralne resekcije TUR-a i stadiju prema klasifikacijskom sustavu tumor-limfni čvor-metastaza (TNM klasifikacija). Razlikuje se za površinske i mišićno-invazivne tumore.

Liječenje površinskih karcinoma mokraćnog mjehura započinje TUR-om, koja uklanja sve vidljive tumore, no visoka stopa recidiva (60-90%) i progresije nakon TUR-a zahtijeva uporabu pomoćnih tretmana (50). Adjuvantna terapija uključuje intravezikalnu primjenu kemoterapeutika (mitomicina-C, doksorubicina ili epirubicina) ili imunoterapiju instilacijom bacilom Calmette-Guérin (BCG) (51, 52). BCG je živo atenuirano cjepivo razvijeno protiv tuberkuloze, a Pearl je 1929. primijetio da ima antineoplastični učinak (53). Odluka o uvođenju BCG i /ili kemoterapije temelji se na riziku progresije ili recidiva raka (51, 52). Vjerojatnost recidiva i progresije može se izračunati pomoću tablica rizika Europske organizacije za istraživanje i liječenje karcinoma (engl. European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) korištenjem 6 parametara (gradus, stadij, veličina tumora, brzina recidiva, prisutnost istodobnog CIS-a i broj tumora) (54). Za tumore niskog rizika preporučuje se TUR s trenutnim ubrizgavanjem kemoterapije kao cjelovita terapija, što smanjuje izgled recidiva tumora za 39% (33, 52, 55). Učinkovitost kemoterapije je u primjeni u roku od 6 sati od vremena TUR-a i značajno se smanjuje ako se daje nakon 24 sata (56). Pacijenti s površinskim karcinomom visokog rizika imaju oko 50% šanse za recidiv s mišićno-invazivnom bolešću ako se liječe samo TUR-om, pa se liječe i intravezikalnim BCG-om (poželjno) ili mitomicinom C (33, 46, 52). Preporuka je ponoviti TUR 2-6 tjedana nakon dijagnoze da bi se utvrdilo je li u međuvremenu došlo do invazije karcinoma u mišićni sloj (46, 52). Ako u ponovljenom TUR-u nema infiltracije mišićnog sloja liječenje BCG-om započinje najranije za 2 tjedna kako bi se izbjegle nuspojave (57). Neuspjeh terapije BCG-om definiran je kao prisutnost visokog gradusa površinskog tumora u 6 mjeseci od vremena TUR-e (ili u 3 mjeseca ako je početni tumor T1G3 / T1 visoki gradus) ili bilo kakvog pogoršanja bolesti (viši gradus, stadij, broj recidiva ili pojava CIS-a) dok su na terapiji BCG-om i tada je potrebno napraviti cistektomiju (58).

Mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura liječi se radikalnom cistektomijom s bilateralnom limfadenektomijom i neoadjuvantnom kemoterapijom koja se temelji na cisplatinu (59). Ekstenzivna disekcija limfnih čvorova povezana je s poboljšanjem ukupnog preživljavanja i povećanjem perioda bez progresije (60). Radioterapija se može smatrati dijelom multimodalnog pristupa očuvanja mjehura ili palijacijom u bolesnika koji nisu kandidati za

cistektomiju (51, 59). Kemoterapija je preferirano liječenje bolesnika s metastatskom bolešću. Dva dostupna tretmana, GC (kombinacija gemcitabina i cisplatina) i MVAC (kombinirani metotreksat, vinblastin, doksorubicin i cisplatin) povezani su s medijanom vremena preživljavanja od oko 14 mjeseci (51).

Najčešće korištena strategija praćenja uključuje cistoskopiju i citologiju svakih 3-6 mjeseci sljedeće 2 godine, a svaka sumnjiva ili pozitivna cistoskopija zahtjeva biopsiju. Uz to potrebno je snimanje gornjeg urinarnog trakta svako jednu do dvije godine. Za stadij T2 i više stadije potrebno je i snimanje grudnog koša, abdomena i zdjelice CT-om ili MR-om svakih šest do 12 mjeseci tijekom dvije do tri godine (52, 59).

1.3. RNaza (ribonukleaza)

Ribonukleaze (RNaze) su hidrolitički enzimi koji kataliziraju cijepanje fosfodieterskih veza u RNA. Imaju ključnu ulogu u RNA metabolizmu, uklanjanjem viška stanične RNA i sazrijevanju svih vrsta RNA. RNaze su heterogena skupina enzima uglavnom klasificirana u dvije kategorije prema mehanizmu obrade RNA: egzoribonukleaze koje cijepaju RNA na krajevima i endoribonukleaze koje cijepaju RNA na unutarnjim mjestima. Obuhvaćaju više potklasa od kojih svaka ima svoju ulogu (61). Uključene su u biološke aktivnosti poput obrane domaćina, antitumorskog djelovanja, sazrijevanja stanica i fiziološke smrti stanica. U vezi s tim pružaju terapijski potencijal za liječenje tumora (62).

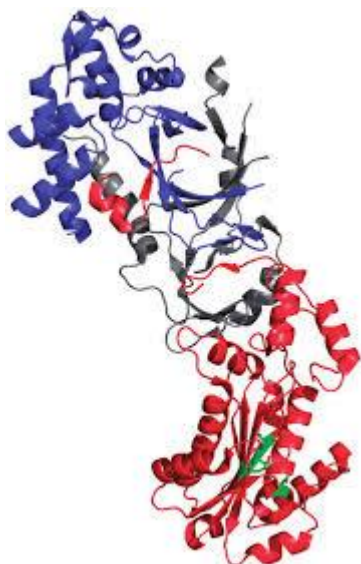
1.3.1. RNazaH2

Endonukleaze ribonukleaze H (RNaze H) razgrađuju RNA lanac RNA/DNA hibrida koji nastaje tijekom različitih staničnih fizioloških procesa. Hibridi se formiraju prilikom sinteze RNA početnica diskontinuiranog lanca tijekom DNA replikacije, produženja telomera, pogrešne ugradnje ribonukleozidnih trifosfata (rNTP) u DNA i formiranja R-omči tijekom transkripcije (63).

RNaze H mogu se naći u gotovo svim organizmima, od bakterija do eukariota. Eukarioti imaju dvije klase staničnih enzima RNaze H: tip 1 i 2. RNazaH1 neophodna je za replikaciju mitohondrijske DNA i njeno uklanjanje u miša uzrokuje embrionalnu smrt (64). RNazaH2 je dominantan izvor aktivnosti RNaze H u stanicama sisavaca i jedina je nukleaza za koju se zna da može hidrolizirati pojedinačne ribonukleotide koji su pogrešno ugrađeni tijekom genomske replikacije (63).

1.3.1.1. Struktura RNaze H2

RNazaH2 je trimer koji se sastoji od tri različite podjedinice, jedne katalitičke podjedinice (A) i dvije pomoćne podjedinice (B i C). U ljudi RNazeH2A, H2B i H2C sastoje se od 301, 308 i 166 aminokiselina, a RNaza H2A sadrži aktivno mjesto koje se sastoji od četiri negativno nabijena aminokiselinska ostatka, poznata kao motiv DEDD (65) (Slika 3). Nabijeni ostatci vežu jedan ili dva metalna iona koji su potrebni za katalizu; u fiziološkim uvjetima to su magnezijevi ioni, ali i mangan obično podržava enzimsku aktivnost (66). Točna uloga pomoćnih podjedinica nije u potpunosti definirana; međutim smatra se da služe za sastavljanje RNazaH2 kompleksa i za moduliranje njegove interakcije s drugim proteinima. RNazaH2B veže PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*) koja ima ulogu u uređivanju i popravljanju DNK tijekom replikacije (67).



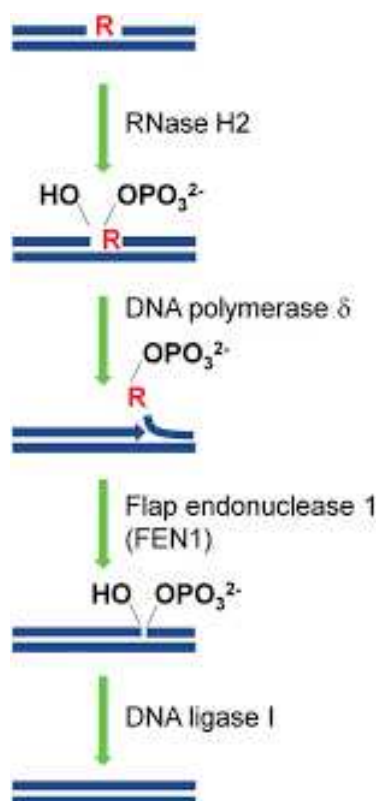
Slika 3. Struktura RNaze H2. Podjedinice A, B i C prikazane su crvenom, plavom i sivom bojom. Motiv DEDD u podjedinici A prikazan je zelenom bojom. (preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30010711>).

1.3.1.2. Uloga RNaze H2

In vitro studije su pokazale da RNazaH2 djeluje zajedno s FEN1 (eng. *flap-structure-specific Endonuclease 1*), polimerazom δ i DNA ligazom u procesu nazvanom popravak ekscizije ribonukleotida, RER (eng. *ribonucleotide excision repair*). Ribonukleozid trifosfat (rNTP) je inkorporiran u dvostruku uzvojniju DNA molekule na svakih nekoliko tisuću parova

baza te je koncentracija rNTP-a 100 puta veća od deoksinukleozid trifosfata (dNTP), što rezultira u obilju rNTP-a u genomskoj DNA (68). RER put pokreće RNaze H2 koja katalizira hidrolizu fosfodiesterne veze na 5' kraju rNTP-a ugrađenog u DNA. rNTP se uklanja uz FEN1, a DNA polimeraza δ u kompleksu s PCNA pokreće sintezu DNA na tom mjestu. DNA ligaza 1 na kraju povezuje 3'-hidroksilni s 5'-fosfatnim krajem (69,70) (Slika 4).

Taj je mehanizam analogan sazrijevanju Okazakijevih fragmenata. Tijekom replikacije DNA novi diskontinuirani ili tromi lanac sintetizira se iz kratkih fragmenata DNA koje nazivamo Okazakijevi fragmenti. Sintezu započinju kratke RNA početnice (eng. *primeri*), prosječno u duljini od 10 nukleotida (71). RNA početnice se uklanjaju prije spajanja fragmenata kako bi se formirao kontinuirani lanac. Postoji nekoliko puteva za uklanjanje početnica, a biokemijske in vitro studije pokazuju kombinirano djelovanje RNaze H2 i FEN1 (72). Još jedna od uloga RNaze H2 je degradacija RNA lanca R-omče koja nastaje tijekom transkripcije kada se nastala RNA hibridizira na dvolančanu DNA (73).



Slika 4. RER put: popravak ekscizije ribonukleotida (eng. *ribonucleotide excision repair*). RNazaH2 djeluje zajedno s FEN1 (eng. *flap-structure-specific Endonuclease 1*), polimerazom δ i DNA ligazom u popravljaju lezije ribonukleotida.

(preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30010711>)

Akumulacija R-omči te ugrađivanje ribonukleozidnih trifosfata u DNA uzrokuju prekid DNA. Dvolančani lom smatra se primarnom lezijom u kromosomskoj aberaciji, koja dovodi do mutacije i smrti stanica, tumora i drugih genetskih bolesti (69,70). Kod miševa knock-out gen RNazeH2 uzrokovao je embrionalnu smrtnost kao posljedicu nakupljanja rNTP-a u genomskoj DNK i povezan je s povećanjem pojavljivanja oštećenja DNA (64). U čovjeka mutacija gena RNazeH2 uzrokuje Aicardi-Goutières sindrom (AGS), teški neuroinflamatorni poremećaj. Karakterizira ga progresivna encefalopatija slična prirođenim virusnim infekcijama i imunološka obilježja slična onima koja se javljaju kod sistemske eritematozne lupusne bolesti (74).

1.3.1.3. Povezanost RNaze H2A i karcinoma

Kao što je već spomenuto, ljudski RNazaH2 kompleks ima kritičnu ulogu u više bioloških procesa. RNazaH2 prepoznaje pojedinačne ribonukleotide krivo ugrađene u DNA i tako smanjuje pojavu dvolančanih lomova. Nedavno je pronađeno da replikativne DNA polimeraze uključuju značajan broj ribonukleotida tijekom sinteze DNK pa je uloga RNaze H2 u njihovom uklanjanju mogla biti presudna za održavanje genomske stabilnosti (68). Poremećaj funkcije RNazeH2 uzrokuje nakupljanje R-omči, što rezultira povećanom osjetljivošću DNA na štetna sredstva, aberacije kromosoma te oštećenja integriteta genoma, u konačnici olakšavajući pojavu i napredovanje karcinoma. Nestabilnost genoma, važno obilježje progresije karcinoma, proizlazi iz kvarova u održavanju i popravka oštećenja genoma. Dakle, ljudski RNaze H2 kompleks djeluje kao supresor tumora održavanjem stabilnosti genoma u normalnim fiziološkim uvjetima (75).

Podjedinica RNazaH2A ima važnu ulogu u patofiziološkom procesu različitih vrsta karcinoma među kojima je i karcinom mokraćnog mjehura (76). RNazaH2A je među 2 % gena koji pokazuju značajnu povezanost s profilima svih poznatih uspješnih ciljeva antitumorskih lijekova (77). Prekomjerno je eksprimirana u brojnim vrstama raka i pruža potencijalno široke terapijske mogućnosti. Biološka hipoteza za ovaj gen kao cilj antitumorskih lijekova uključuje njegovu ulogu u održavanju stabilnosti genoma.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

Ciljevi istraživanja:

1. Pomoću qRT-PCR metode odrediti izražaj gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s uzorcima urotelnih tumora koji neće recidivirati pacijenata koji su podvrgnuti transuretralnoj resekciji te prikazati moguću povezanost.
2. Pomoću qRT-PCR metode odrediti izražaj gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s uzorcima urotelnih tumora recidiva kod istih pacijenata koji su podvrgnuti transuretralnoj resekciji te prikazati moguću povezanost.
3. Izražaj gena RNazeH2A koristiti kao biljeg vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura u usporedbi s tumorom koji neće recidivirati.

Hipoteza:

Izražaj gena RNazeH2A će biti veći kod uzoraka urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s tumorima koji neće recidivirati i bit će još veći kod tumora recidiva te će se moći koristiti kao biljeg vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura.

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

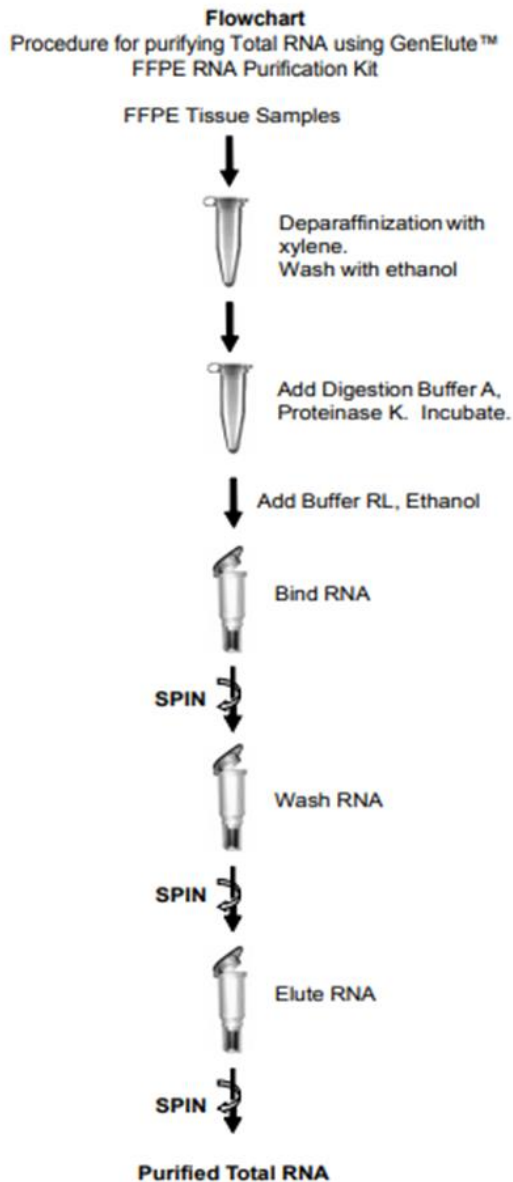
3.1. Ispitanici

Analiza uključuje uzorke pacijenata koji su bili podvrgnuti transuretralnoj resekciji tumora mokraćnog mjehura (engl. Transurethral Resection of Bladder Tumor, TURBT) na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju u Splitu i na Odjelu patologije i citologije u Šibeniku. U skladu s Helsinškom Deklaracijom dobiveno je odobrenje od strane Etičkog odbora Sveučilišne bolnice u Splitu i Šibeniku te Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Splitu Medicinskog fakulteta. Nakon patološke obrade uzoraka uklopljenih u parafin, dani su na korištenje u svrhu ovog istraživanja.

3.2. Postupak izolacije RNA iz parafinskih blokova

Za izolaciju i pročišćavanje ukupne RNA iz formalinom fiksiranih i u parafin uklopljenih uzoraka tkiva (FFPE; eng. *formalin-fixed paraffin-embedded*) korišten je GenElute™ FFPE RNA Purification kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD). Pročišćavanje se temelji na spin kromatografiji, a kao matriks za razdvajanje koristi se smola. Iz parafinskih blokova s uzorcima tkiva karcinoma mokraćnog mjehura na mikrotomu odrežu se rezovi debljine 20 µm te se ukloni se višak parafina.

Postupak prvo uključuje deparafinizaciju FFPE-a ispiranjem ksilenom i etanolom. Nakon ispiranja slijedi priprema lizata. Uzorku se dodaju Proteinaza K i Digestion Buffer A. Nakon vorteksiranja i inkubacije prvo na 55 stupnjeva, zatim na 80 stupnjeva, dodaju se Buffer RL i etanol. Dobivena otopina se nanosi na spin-kolonu pri čemu smola veže nukleinske kiseline ovisno o ionskoj koncentraciji. RNA se veže na kolonu, a ostali kontaminanti se uklone prolaskom kroz kolonu ili se zadrže na vrhu. U tom trenutku izolirana RNA minimalno je onečišćena genomskom DNA te je za maksimalno uklanjanje zaostale DNA moguće provesti dodatni neobavezni korak. Za uklanjanje DNA prvo se radi ispiranje s Wash Solution A, a zatim se dodaje pripremljena otopina DNA-ze (pripremi se dodavanjem RNaza-free DNaze u Enzyme Incubation Buffer A). Tada se vezana RNA ispere otopinom Wash Solution A za uklanjanje svih nečistoća, te se očišćena RNA eluira otopinom Elution Solution A (Slika 5).



Slika 5. Postupak izolacije RNA (Preuzeto sa stranice <https://www.sigmaaldrich.com>)

3.3. Spektrofotometrija

Spektrofotometrijska analiza koristi se za kvantificiranje nukleinskih kiselina te za određivanje njihove čistoće. Nukleinske kiseline u uzorku apsorbiraju ultraljubičasto svjetlo na valnoj duljini od 260 nanometara (nm), a fotodetektor mjeri svjetlo koje prolazi kroz uzorak. Dio UV svjetla prolazi kroz uzorak, a dio apsorbiraju nukleinske kiseline. Veća apsorbancija UV svjetla će biti kod uzoraka s većom koncentracijom nukleinskih kiselina.

NanoDrop je instrument za mikrovolumenska mjerenja, koji je razvijen kako bi omogućio korištenje što manje količine uzorka te kako bi zamijenio konvencionalne instrumente. Čistoću uzorka mjerili smo spektrofotometrijskom metodom na NanoDrop instrumentu (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, Delaware). NanoDrop-om smo odredili iz jedne kapljice uzorka koncentraciju RNA u ng/ μ l, apsorbanciju pri 260 i 280nm te omjere A260/A280 i A260/A230. Nukleinske kiseline i proteini imaju maksimum apsorbancije na 260 i 280 nm, a omjer apsorbancije na ovim valnim duljinama korišten je kao mjera čistoće prilikom njihove ekstrakcije. Idealan omjer za RNA iznosi 2.0. Kao mjera ostalih kemijskih onečišćenja koristi se asorbancija na 230 nm, a očekivane vrijednosti su u rasponu od 2.0-2.2 (78).

Tijekom postupka izolacije različita onečišćenja mogu dovesti do krivih vrijednosti koncentracija nukleinske kiselina, što dovodi do netočnih rezultata. Bitno je odrediti čistoću nukleinskih kiselina kako potencijalno onečišćenje ne bi ugrozilo i negativno utjecalo na rezultate istraživanja.

3.4. Sinteza cDNA

Nakon izolacije i određivanja čistoće mRNA, prevedena je u cDNA enzimom reverznom transkriptazom. Za sintezu cDNA je korišten kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Velika Britanija). Komponente sadržane u kitu su: 10x RT Buffer, 25x dNTP Mix(100mM), 10xRT Random Primers, MultiScribe™Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Nuclease free voda.

3.4.1. Postupak sinteze cDNA

Sve komponente kita drže se na ledu za vrijeme cijelog postupka koji započinje miješanjem sljedećih komponenti u tubici: 10x RT Buffer (2,0 μ l), 25x dNTP Mix(100mM) (0,8 μ l), 10xRT Random Primers (2,0 μ l), MultiScribe™Reverse Transcriptase (1,0 μ l), RNase Inhibitor (1,0 μ l), voda bez nukleaza (3,2 μ l), RNA (izračuna se, do 1 μ g) i doda se voda bez RNaza do 20 μ L. Navedena smjesa je dostatna za jedan uzorak, pa je smjesa načinjena za svih 62 uzorka istovremeno i podijeljena na 62 tubice u koje je naknadno dodana RNA (1 μ g) u potrebnom volumenu s vodom bez RNaza do 20 μ L. Sadržaj tubice je nježno promiješan. Nakon toga slijede 4 koraka inkubacije: 10 minuta na 25 °C, 120 minuta na 37°C, 5 minuta na 85°C i zadnji korak ∞ na 4°C. Dobivena se cDNA u volumenu od 20 μ L razrijedi u 180 μ L vode bez RNaza. Konačno

je dobiveno 200 μ L cDNA koja je pohranjena na -20°C , a potom korištena za kvantitativni RT-PCR.

3.5. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu, qRT-PCR (engl. *Real-time PCR*) je korištena za kvantifikaciju izražaja gena. Za reakciju je pripremljena mješavina za svaki uzorak na ledu: Sybr Green master mix (Applied Biosystems, Velika Britanija) (10,0 μ L), početnice (svaka po 1,0 μ L) te po 3 μ L cDNA i 3 μ L vode što čini volumen od 15 μ L (Tablica 2). Uzorci su potom inkubirani na programu $50^{\circ}\text{C}/2\text{min}$, $95^{\circ}\text{C}/10\text{min}$, $95^{\circ}\text{C}/15\text{sek}$, $60^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ (40 ciklusa), $95^{\circ}\text{C}/15\text{sek}$, $60^{\circ}\text{C}/1\text{min}$, $95^{\circ}\text{C}/15\text{sek}$, $60^{\circ}\text{C}/15\text{sek}$. Koristili smo uređaj Bio-Rad CFX96 Real-Time System (BIORAD, Berkeley, SAD).

Tablica 2. Početnice za kvantitativnu PCR reakciju u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Početnice	Sekvenca
h-RNASEH2A	FORWARD 5'-GCT GTCTCC AAA CCT CAT CTC-3' REWERSE 5'-CCT ACG GTG TCC ACG AAT AC-3'
h-RPS 23	FORWARD 5'-TGG AGG TGC TTC TCA TGC AA-3' REWERSE 5'-AAT GGC AGA ATT TGG CTG TTT G-3'

3.6. Test efikasnosti primera (eng. *Primer efficiency test*)

3.6.1. Standardna krivulja efikasnosti početnica RNazeH2A

Test efikasnosti primera je prethodno napravljen za potrebe završnog rada *Analiza genske ekspresije RNazeH2A u urotelnim tumorima mokraćnog mjehura* Sandre Vujević također pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Vedrane Čikeš Čulić. Za izradu standardne krivulje efikasnosti korištena su serijska razrjeđenja 1:5 u rasponu od 10^7 na predlošku prethodno umnoženom klasičnim PCR-om i upotrebom početnica za RNazeH2A. Za izradu standardne krivulje efikasnosti početnice, Ct vrijednosti različitih razrjeđenja prikazane su u odnosu na razrjeđenje, te je određen pravac linearne regresije kroz točke. Efikasnost početnica (**E**) izračunava se iz koeficijenta smjera pravca linearne regresije (**A**) prema formuli: $E = 10^{(-1/A)} - 1$ te iznosi 95% (79).

3.7. Statistička analiza

Rezultati dobiveni pomoću qRT-PCR-a (PCR reakcije u stvarnom vremenu) predstavljaju Ct vrijednosti (eng. *cycle threshold*) koja definira ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadani prag detekcije. Ct-vrijednost je obrnuto proporcionalna izražaju ciljnog gena u uzorku. U ovom istraživanju uspoređivali smo tri skupine uzoraka tumorskih tkiva, uzroke tumorskih tkiva koji neće recidivirati (NR), uzorke tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) te uzorke tumorskih tkiva recidiva (R2), te su mjerene relativne promjene izražaja gena RNazeH2A. Svi uzorci ispitani su u duplikatima, a kao endogena kontrola za kvantifikaciju korišten je gen RPS 23. Srednja Ct vrijednost ciljnog i kontrolnog gena ispitivanog uzorka uspoređena je prema formuli $\Delta\Delta Ct = 2^{-(Ct \text{ kontrole (RPS)} - Ct \text{ ciljnog gena (RNazaH2A)})}$, čime su dobivena relativne vrijednosti promjena ciljnog gena u odnosu na kontrolni, odnosno vrijednosti $\Delta\Delta Ct$. Veća $\Delta\Delta Ct$ vrijednost znači veću ekspresiju ciljnog gena.

$\Delta\Delta Ct$ za tri skupine, prethodno navedene, uspoređivane su jednosmjernom analizom varijance, ANOVA testom. Izračun je rađen u programu Graph Pad Prism, 7.00.

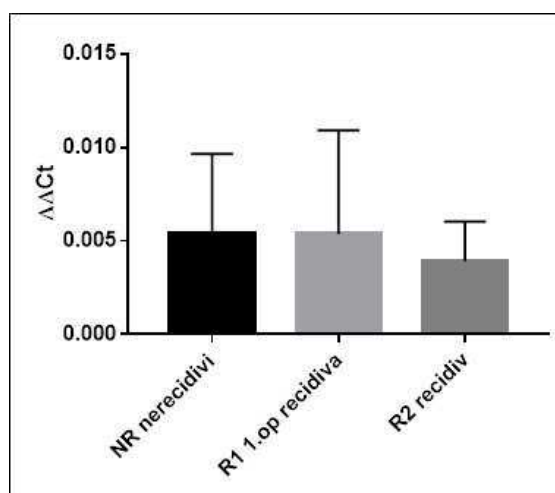
$\Delta\Delta Ct$ je uspoređena i za uzorke tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) i uzorke tumorskih tkiva recidiva (R2) od istog pacijenta. Vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ za R1 i R2 uspoređivane su uparenim T-testom, a izračun je rađen u programu Graph Pad Prism, 7.00.

4. REZULTATI

U istraživanju smo usporedili 34 uzorka tumorskih tkiva koji neće recidivirati (NR), 17 uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) te 11 uzoraka tumorskih tkiva recidiva (Tablica 3). Kao endogena kontrola za kvantifikaciju korišten je gen RPS 23. $\Delta\Delta Ct$ za tri skupine, prethodno navedene, uspoređivane su jednosmjernom analizom varijance, ANOVA testom (Grafikon 1. i Tablica 4.)

Tablica 3. Broj uzoraka po skupini, srednja vrijednost i standardna devijacija

	NR (tumor koji neće recidivirati)	R1 (tumor koji će recidivirati)	R2 (recidiv)
Number of values	34	17	11
Mean $\Delta\Delta Ct$	0,005372	0,005367	0,003924
Std. Deviation	0,00429	0,005544	0,002102



Grafikon 1. Usporedba tri skupine tumorskih tkiva (NR, R1 i R2)

Srednja vrijednost $\Delta\Delta Ct$ za NR iznosi 0,005372, za R1 0,005367, a za R2 0,003924. Srednje vrijednosti navedenih skupina ne pokazuju statistički značajnu razliku.

Tablica 4. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) usporedbe za tri skupine tumorskih tkiva (NR, R1 i R2)

Table Analyzed	Sve tri skupine				
Data sets analyzed	A : NR	B : R1	C : R2		
ANOVA summary					
F	0,4885				
P value	0,616				
P value summary	Ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R square	0,01629				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0,4338 (2, 59)				
P value	0,6501				
P value summary	Ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	8,844				
P value	0,012				
P value summary	*				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0,00001893	2	0,000009467	F (2, 59) = 0,4885	P=0,6160
Residual (within columns)	0,001143	59	0,00001938		
Total	0,001162	61			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	62				

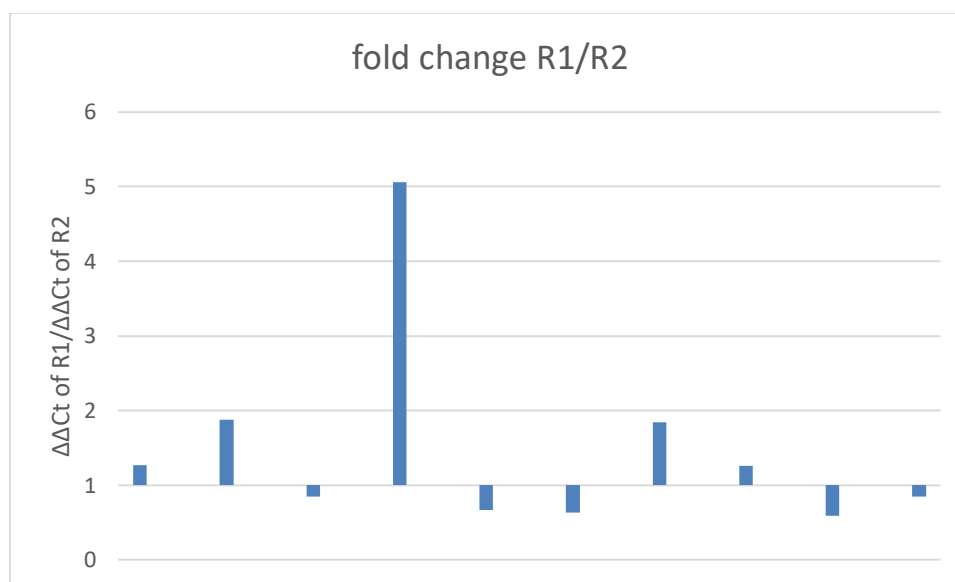
Jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) dobivena p-vrijednost iznosi 0,616 (>0,05) što nije statistički značajan rezultat.

Iz navedenog zaključujemo da nema razlike u izražaju RNazeH2A kod recidivirajućih i nerecidivirajućih uzoraka tumorskog tkiva.

U istraživanju smo usporedili i deset uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) s uzorcima tumorskih tkiva recidiva (R2) od istih pacijenata. Vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ za R1 i R2 uspoređivane su uparenim T-testom (Grafikon 2. i Tablica 5. i Tablica 6.)

Tablica 5. Broj uzoraka po skupini, srednja vrijednost i standardna devijacija

	R1 (tumor koji će recidivirati)	R2 (recidiv)
Number of values	10	10
Mean	0,005588	0,003853
Std. Deviation	0,007044	0,002202



Grafikon 2. Usporedba dvije skupine tumorskih tkiva kod istog pacijenta (R1 i R2)

Na grafikonu 2. prikazani su omjeri $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti R1 i R2 (parovi istog pacijenta). Kod polovice pacijenata ekspresija RNazeH2A bila je veća kod uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati u odnosu na recidiv (od 1,26 do 5,05 puta veća) dok je kod druge polovice pacijenata ekspresija bila neznatno veća kod recidivnog tumora nego kod tumora koji će recidivirati (od 1,17 do 1,68 puta veća).

Tablica 6. Upareni t-test usporedbe za dvije skupine tumorskih tkiva (R1 i R2)

Table Analyzed	R1 vs R2
Column B	R2 recidiv
vs.	vs,
Column A	R1 1,op recidiva
Paired t test	
P value	0,4391
P value summary	Ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0,8094 df=9
Number of pairs	10
How big is the difference?	
Mean of differences	-0,001735
SD of differences	0,006779
SEM of differences	0,002144
95% confidence interval	-0,006585 to 0,003114
R squared (partial eta squared)	0,06786
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0,2742
P value (one tailed)	0,2217
P value summary	Ns
Was the pairing significantly effective?	No

Uparenim t-testom dobivena P-vrijednost iznosi 0,4391 ($>0,05$) što nije statistički značajan rezultat.

Iz navedenog zaključujemo da nema razlike u izražaju gena RNazeH2A kod uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) i uzoraka tumorskih tkiva recidiva (R2) istog pacijenta.

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje temelji se na proučavanju izražaja gena RNazeH2A koji ima važnu ulogu u patofiziološkom procesu različitih vrsta karcinoma među kojima je i karcinom mokraćnog mjehura. Prema Brayu i sur. karcinom mokraćnog mjehura deseti je najčešći karcinom na svijetu, a njegova učestalost neprestano raste te je u 2018. procijenjeno da čini 3% dijagnoze raka (11).

Nestabilnost genoma, važno obilježje progresije karcinoma, proizlazi iz pogrešaka u održavanju i popravka oštećenja genoma. Dakle, prema Wahba i sur. ljudski RNazeH2 kompleks djeluje kao supresor tumora održavanjem stabilnosti genoma u normalnim fiziološkim uvjetima (75). Zbog uloge RNazeH2A u održavanju stabilnosti genoma, očekivana je povećana ekspresija navedenog gena u tkivu karcinoma. Navedeno potvrđuje i završni rad Vujević pod mentorstvom Vedrane Čikeš Čulić koji pokazuje da postoji statistički značajan ($P < 0,0001$) porast ekspresije gena RNazeH2A u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo (79).

Tumori mokraćnog mjehura mogu biti površinski i mišićno-invazivni. Mišićno ne-invazivni tumori imaju bolju prognozu od onih koji pokazuju znakove mišićne invazije, ali česti recidivi uvjetuju dugoročno praćenje. Prema radu od Jelović, izražaj proteina RNazeH2A jači je u skupini mišićno-invazivnih karcinoma urotela mokraćnog mjehura što potvrđuje da postoji povezanost izražaja i agresivnosti tumora (80).

Zbog svega navedenog, naše istraživanje je nastojalo naći povezanost izražaja gena RNazeH2A s recidivirajućim tumorima. Prema Babjuk i sur. recidivi su najčešći kod stadija Ta, pa bi u tim slučajevima gen RNazeH2A kao prediktivni biljeg recidiva bio od izuzetne važnosti (13). Fitzpatrick i sur. naveli su da kod pacijenata bez recidiva pri prvom praćenju cistoskopije, 79% nije imalo recidiva prilikom sljedećeg praćenja. Međutim, u bolesnika s recidivom nakon 3 mjeseca, samo u 10% nije bilo recidiva tijekom praćenja od 1 godine (47). Navedeno nam pokazuje kako postoji velika potreba za molekulom koja će omogućiti procjenu recidiviranja tumora i tako utjecati na buduće ishode liječenja. Hipoteza ovog istraživanja je bila da će izražaj gena RNazeH2A biti veći kod uzoraka urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s tumorima koji neće recidivirati i bit će još veći kod tumora recidiva. U tom slučaju bi se mogao koristiti kao biljeg vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura. Nažalost, naši rezultati nisu potvrdili ovu hipotezu i ostaje daljnja potraga za takvim biljegom.

6. ZAKLJUČCI

Navedeni rezultati nas navode na sljedeće zaključke:

1. Nema razlike u izražaju gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s uzorcima tumorskih tkiva koji neće recidivirati pacijenata koji su podvrgnuti transuretralnoj resekciji.
2. Nema razlike u izražaju gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati i uzoraka tumorskih tkiva recidiva kod istih pacijenata koji su podvrgnuti transuretralnoj resekciji.
3. Izražaj gena RNazeH2A nije moguće koristiti kao biljeg vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjerhura u usporedbi s tumorom koji neće recidivirati.

8. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Pradidarcheep W, Wallner C, Dabhoiwala NF, Lamers WH. Anatomy and histology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(202):117-48.
2. Shermadou ES, Rahman S, Leslie SW. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Bladder.* Treasure Island (FL):StatPearls Publishing; 2020.
3. Wein JA. *Campbell-Walsh Urology.* 10. izdanje. Philadelphia: Saunders; 2012. str. 74-8, 2299-320.
4. Rubin R, Strayer DS. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine.* 5. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
5. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. *Anatomija čovjeka.* Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 361-363.
6. Guyton AC, Hall JE; *Medicinska fiziologija.* 12. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. 308str.
7. Sobin LH, Wittekind C. *UICC: TNM Classification of Malignant Tumors.* 6. izdanje. New York: Wiley, 2002.
8. Mikuz G. *Clinical Pathology of Urogenital Tumors.* London: Informa Healthcare, 2007.
9. Mills S. *Histology for Pathologists.* 2. izdanje. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
10. Sánchez Freire V, Burkhard FC, Schmitz A, Kessler TM, Monastyrskaya K. Structural differences between the bladder dome and trigone revealed by mRNA expression analysis of cold-cut biopsies. *BJU International.* 2011 Jul;108(2b):E126-E135.
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2018 Nov;68(6):394-424.
12. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019 Apr 15;144(8):1941-53.
13. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E. EAU Guidelines on non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2008;54:303-14.
14. Mushtaq J, Thurairaja R, Nair R. *Bladder cancer.* *Surgery (Oxford).* 2019 Sep;37(9):529-537.
15. Freedman ND. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA.* 2011 Aug 17;306(7):737.
16. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology.* 2013

- Feb;63(2):234-41.
17. Yan H, Ying Y, Xie H, Li J, Wang X, He L, et al. Secondhand smoking increases bladder cancer risk in nonsmoking population: a meta-analysis. *CMAR*. 2018 Sep;Volume 10:3781-91.
 18. Zeegers MPA. Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occupational and Environmental Medicine*. 2001 Sep 1;58(9):590-6.
 19. Chen H, Liou S, Loh C, Uang S, Yu Y, Shih T. Bladder cancer screening and monitoring of 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) exposure among workers in Taiwan. *Urology*. 2005 Aug;66(2):305-10.
 20. Riegert-Johnson DL, Gleeson FC, Roberts M, Tholen K, Youngborg L, Bullock M, et al. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*. 2010 Dec;8(1):504-10.
 21. Casadei C, Dizman N, Schepisi G, Cursano MC, Basso U, Santini D, et al. Targeted therapies for advanced bladder cancer: new strategies with FGFR inhibitors. *Ther Adv Med Oncol*. 2019 Jan;11:175883591989028.
 22. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1259-64.
 23. Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Jan;12(1):97-111.
 24. Chiou H, Chiou S, Hsu Y, Chou Y, Tseng C, Wei M, et al. Incidence of Transitional Cell Carcinoma and Arsenic in Drinking Water: A Follow-up Study of 8,102 Residents in an Arseniasis-endemic Area in Northeastern Taiwan. *American Journal of Epidemiology*. 2001 Mar 1;153(5):411-8.
 25. Jankovic S, Radosavljevic V. Risk factors for bladder cancer. *Tumori*. 2007;93(1):4-12.
 26. Wang C, Jiang H. Meat intake and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):848-55.
 27. Sun J, Zhao L, Yang Y, Ma X, Wang Y, Xiang Y. Obesity and Risk of Bladder Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis of 15 Cohort Studies. *PLoS ONE*. 2015 Mar 24;10(3):e0119313.
 28. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder Cancer. *Epidemiology, Diagnosis, and Management*. *Cancer Pract*. 2002 Nov;10(6):311-22.
 29. Grossfeld GD, Wolf JS, Litwan MS, Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, et al.

- Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of the AUA best practice policy recommendations. *Am Fam Physician*. 2001 Mar 15;63(6):1145-54.
30. Grossfeld GD, Carroll PR. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria. *Urologic Clinics of North America*. 1998 Nov;25(4):661-76.
 31. Shirodkar SP, Lokeshwar VB. Bladder tumor markers: from hematuria to molecular diagnostics – where do we stand?. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2008 Jul;8(7):1111-23.
 32. Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE. A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. *J Urol*. 2000 Feb;163(2):524-7.
 33. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, et al. Guideline for the Management of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer (Stages Ta, T1, and Tis): 2007 Update. *Journal of Urology*. 2007 Dec;178(6):2314-30.
 34. Vrdoljak E, Krajina Z, Šamija M. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada;2006. str. 236-8.
 35. Shinagare AB, Ramaiya NH, Jagannathan JP, Fennessy FM, Taplin M, Van den Abbeele AD. Metastatic Pattern of Bladder Cancer: Correlation With the Characteristics of the Primary Tumor. *American Journal of Roentgenology*. 2011 Jan;196(1):117-22.
 36. Raitanen MP, Leppilahti M, Tuhkanen K, Forssell T, Nylund P, Tammela T. Routine follow-up cystoscopy in detection of recurrence in patients being monitored for bladder cancer. *Ann Chir Gynaecol*. 2001;90(4):261-5.
 37. Jocham D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art. *European Urology*. 2008 Jun;53(6):1138-50.
 38. Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebet T, et al. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2013 Guidelines. *European Urology*. 2014 Apr;65(4):778-92.
 39. Council C. *Understanding bladder cancer: A guide for people with cancer, their families and friends*. Australia: Cancer Council Australia Publisher; 2018.
 40. Leiblich A. Recent Developments in the Search for Urinary Biomarkers in Bladder Cancer. *Curr Urol Rep*. 2017 Dec;18(12):100.
 41. Gamulin M, Ruzic IP, Grgic M, Jazvic M, Solaric M, Zahirovic D, et al. [Clinical guidelines for diagnosing, treatment and monitoring patients with bladder cancer--Croatian Oncology Society and Croatian Urology Society, Croatian Medical Association]. *Lijecnicki vjesnik*. 2013;135(11-12):292-7.

42. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A III. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010:573–574.
43. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *The Lancet*. 2009 Jul;374(9685):239-49.
44. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005 Dec;66(6):4-34.
45. Rübben H, Lutzeyer W, Fischer N, Deutz F, Lagrange W, Giani G. Natural History and Treatment of Low and High Risk Superficial Bladder Tumors. *Journal of Urology*. 1988 Feb;139(2):283-5.
46. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *European Urology*. 2017 Mar;71(3):447-61.
47. Fitzpatrick J, West A, Butler M, Lane V, O’Flynn J. Superficial Bladder Tumors (Stage pTa, Grades 1 and 2): The Importance of Recurrence Pattern Following Initial Resection. *Journal of Urology*. 1986 May;135(5):920-2.
48. Montironi R. Classification and grading of the non-invasive urothelial neoplasms: recent advances and controversies. *Journal of Clinical Pathology*. 2003 Feb 1;56(2):91-5.
49. Krušlin B, Belicza M. Određivanje gradusa urotelnog karcinoma prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2004. *Liječ Vjesn*. 2006;128:201-6.
50. Lutzeyer W, Rübben H, Dahm H. Prognostic Parameters in Superficial Bladder Cancer: An Analysis of 315 Cases. *Journal of Urology*. 1982 Feb;127(2):250-2.
51. Bellmunt J, Orsola A, Leow J, Wiegel T, De Santis M, Horwich A. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014 Sep;25:iii40-iii48.
52. Clark PE, Agarwal N, Biagioli MC, Eisenberger MA, Greenberg RE, Herr HW, et al. Bladder Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013 Apr;11(4):446-75.
53. Coley WB. Cancer and tuberculosis. *The American Journal of Surgery*. 1929 May;6(5):679-83.
54. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. *European Urology*. 2006 Mar;49(3):466-77.
55. Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1

- bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2004 Jun;171(6 Pt 1):2186-90, quiz 2435.
56. Kaasinen E, Rintala E, Hellström P, Viitanen J, Juusela H, Rajala P, et al. Factors Explaining Recurrence in Patients Undergoing Chemoimmunotherapy Regimens for Frequently Recurring Superficial Bladder Carcinoma. *European Urology*. 2002 Aug;42(2):167-74.
57. Kavoussi LR, Torrence RJ, Gillen DP, Hudson MA, Haaff EO, Dresner SM, et al. Results of 6 Weekly Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Instillations on the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *Journal of Urology*. 1988 May;139(5):935-40.
58. Herr HW, Dalbagni G. Defining Bacillus Calmette-Guerin Refractory Superficial Bladder Tumors. *Journal of Urology*. 2003 May;169(5):1706-8.
59. Chang SS, Bochner BH, Chou R, Dreicer R, Kamat AM, Lerner SP, et al. Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline. *J Urol*. 2017 09;198(3):552-9.
60. Stimson CJ, Chang SS, Barocas DA, Humphrey JE, Patel SG, Clark PE, et al. Early and late perioperative outcomes following radical cystectomy: 90-day readmissions, morbidity and mortality in a contemporary series. *J Urol*. 2010 Oct;184(4):1296-300.
61. Condon C, Putzer H. The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res*. 2002 Dec 15;30(24):5339-46.
62. Benito A, Ribó M, Vilanova M. On the track of antitumour ribonucleases. *Mol Biosyst*. 2005 Oct;1(4):294-302.
63. Reijns MA, Rabe B, Rigby RE, Mill P, Astell KR, Lettice LA, et al. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1008-22.
64. Cerritelli SM, Frolova EG, Feng C, Grinberg A, Love PE, Crouch RJ. Failure to Produce Mitochondrial DNA Results in Embryonic Lethality in Rnaseh1 Null Mice. *Molecular Cell*. 2003 Mar;11(3):807-15.
65. Reijns MA, Bubeck D, Gibson LC, Graham SC, Baillie GS, Jones EY, et al. The structure of the human RNase H2 complex defines key interaction interfaces relevant to enzyme function and human disease. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10530-9.
66. Rychlik MP, Chon H, Cerritelli SM, Klimek P, Crouch RJ, Nowotny M. Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. *Mol Cell*. 2010 Nov 24;40(4):658-70.
67. Chon H, Vassilev A, DePamphilis ML, Zhao Y, Zhang J, Burgers PM, et al. Contributions

- of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):96-110.
68. Nick McElhinny SA, Watts BE, Kumar D, Watt DL, Lundström EB, Burgers PM, et al. Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Mar 16;107(11):4949-54.
69. Sparks JL, Chon H, Cerritelli SM, Kunkel TA, Johansson E, Crouch RJ, et al. RNase H2-initiated ribonucleotide excision repair. *Mol Cell.* 2012 Sep 28;47(6):980-6.
70. Williams JS, Kunkel TA. Ribonucleotides in DNA: origins, repair and consequences. *DNA Repair (Amst).* 2014 Jul;19:27-37.
71. Burgers PMJ. Polymerase Dynamics at the Eukaryotic DNA Replication Fork. *J Biol Chem.* 2009 Feb 13;284(7):4041-5.
72. Rossi ML, Bambara RA. Reconstituted Okazaki fragment processing indicates two pathways of primer removal. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26051-61.
73. Hamperl S, Cimprich KA. The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA Repair (Amst).* 2014 Jul;19:84-94.
74. Crow YJ, Leitch A, Hayward BE, Garner A, Parmar R, Griffith E, et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat Genet.* 2006 Aug;38(8):910-6.
75. Wahba L, Amon JD, Koshland D, Vuica-Ross M. RNase H and Multiple RNA Biogenesis Factors Cooperate to Prevent RNA:DNA Hybrids from Generating Genome Instability. *Molecular Cell.* 2011 Dec;44(6):978-88.
76. Flanagan JM, Funes JM, Henderson S, Wild L, Carey N, Boshoff C. Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2009 Jan 1;8(1):249-60.
77. Mayburd AL, Golovchikova I, Mulshine JL. Successful anti-cancer drug targets able to pass FDA review demonstrate the identifiable signature distinct from the signatures of random genes and initially proposed targets. *Bioinformatics.* 2008 Feb 1;24(3):389-95.
78. Županić K. (2018) Kvaliteta molekule RNA izolirane iz uzoraka tkiva mokraćnog mjehura uklopljenih u parafinske blokove. Završni rad. Split: Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija.
79. Vujević S. (2014) Analiza genske ekspresije RNazeH2A u urotelnim tumorima mokraćnog mjehura. Završni rad. Split: Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija.

80. Jelović M. (2014) Izražaj RNazeH2A u mišićno-invazivnom urotelnom karcinomu mokraćnog mjehura. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet.

9. SAŽETAK

Svrha: Ovo istraživanje temelji se na proučavanju izražaja gena RNazeH2A koji ima važnu ulogu u patofiziološkom procesu različitih vrsta karcinoma među kojima je i karcinom mokraćnog mjehura. Nestabilnost genoma, važno obilježje progresije karcinoma, proizlazi iz pogrešaka u održavanju i popravka oštećenja genoma. Ljudski RNazeH2 kompleks djeluje kao supresor tumora jer održava stabilnost genoma u normalnim fiziološkim uvjetima. Tumori mokraćnog mjehura mogu biti površinski i mišićno-invazivni. Mišićno ne-invazivni tumori imaju bolju prognozu od onih koji pokazuju znakove mišićne invazije, ali česti recidivi uvjetuju dugoročno praćenje. Cilj istraživanja je utvrditi mogućnost korištenja izražaja gena RNazeH2A kao biljega vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura u usporedbi s tumorom koji je nerecidivirajući.

Materijali i metode: Uzorci tumora mokraćnog mjehura su uklopljeni u parafinske blokove iz kojih je izolirana RNA koja je prevedena u cDNA te je potom korištena za qRT-PCR. Rezultati dobiveni pomoću qRT-PCR-a predstavljaju Ct (cycle threshold) vrijednosti koja definira ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadani prag detekcije. Ct-vrijednost je obrnuto proporcionalna izražaju ciljnog gena u uzorku. $\Delta\Delta Ct$ pokazuje relativne vrijednosti promjena ciljnog gena u odnosu na kontrolni, a proporcionalna je ekspresiji gena. U ovom istraživanju uspoređivali smo tri skupine tumorskih tkiva (34 uzorka tumorskih tkiva koji neće recidivirati (NR), 17 uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati (R1) te 11 uzoraka tumorskih tkiva recidiva (R2)) te su mjerene relativne promjene izražaja gena RNazeH2A. $\Delta\Delta Ct$ za tri skupine, prethodno navedene, uspoređivane su jednosmjernom analizom varijance, ANOVA testom. $\Delta\Delta Ct$ je uspoređena i za 10 uzoraka R1 i R2 od istog pacijenta. Vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ za R1 i R2 uspoređivane su uparenim T-testom.

Rezultati: $\Delta\Delta Ct$ za sve tri skupine nisu se statistički značajno razlikovale (P-vrijednost iznosi 0,616). Vrijednosti $\Delta\Delta Ct$ za R1 i R2 od istih pacijenata također nisu bile značajno različite (P-vrijednost iznosi 0,4391). Kod polovice pacijenata ekspresija RNazeH2A bila je veća kod uzoraka tumorskih tkiva koji će recidivirati u odnosu na recidiv (od 1,26 do 5,05 puta veća) dok je kod druge polovice pacijenata ekspresija bila neznatno veća kod recidivnog tumora nego kod tumora koji će recidivirati (od 1,17 do 1,68 puta veća).

Zaključak: Nema razlike u izražaju gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati u usporedbi s uzorcima tumorskih tkiva koji neće recidivirati. Nema razlike ni u izražaju gena RNazeH2A u uzorcima urotelnih tumora mokraćnog mjehura koji će recidivirati i uzoraka tumorskih tkiva recidiva kod istih pacijenata. Izražaj gena RNazeH2A nije moguće koristiti kao biljeg vjerojatnosti recidiviranja urotelnog tumora mokraćnog mjehura u usporedbi s tumorom koji neće recidivirati.

8. SUMMARY

Aim: This research is based on the study of the expression of the RNaseH2A gene, which plays an important role in the pathophysiological process of various types of cancer, including bladder cancer. Genome instability, an important feature of cancer progression, results from defects in the maintenance and repair of damaged genome. The human RNaseH2 complex acts as a tumor suppressor because it keeps genome stability under normal physiological conditions. Bladder tumors can be superficial and muscle-invasive. Muscle non-invasive tumors have a better prognosis than those showing signs of muscle invasion, but frequent recurrences require long-term follow-up. The aim of the study was to determine the possibility of using the expression of the RNaseH2A gene as a marker of the probability of recurrent urothelial tumor compared to a tumor that is non-recurrent.

Materials and methods: The samples were embedded in paraffin blocks from which RNA was isolated, converted to cDNA and then used for a qRT-PCR. The results obtained by qRT-PCR represent Ct (cycle threshold) values which defines the cycle in which the fluorescent signal exceeds the set detection threshold. The Ct-value is inversely proportional to the expression of the target gene in the sample. $\Delta\Delta\text{Ct}$ determines the relative values of changes in the target gene compared to the control and is directly proportional to the expression of the target gene in the sample. In this study, we compared three groups of tumor tissue samples (34 samples of tumor tissues that would not recur (NR), 17 samples of tumor tissues that would recur (R1) and 11 samples of tumor recurrence tissues (R2)) and the relative changes in RNaseH2A gene expression were measured. $\Delta\Delta\text{Ct}$ for the previously mentioned three groups, were compared by one-way analysis of variance, ANOVA test. $\Delta\Delta\text{Ct}$ was compared for 10 samples of R1 and R2 from the same patient. $\Delta\Delta\text{Ct}$ values for R1 and R2 were compared by paired T-test.

Results: $\Delta\Delta\text{Ct}$ for all three groups were not significantly different (P-value was 0.616). The $\Delta\Delta\text{Ct}$ values for R1 and R2 from the same patients also didn't show statistically significant difference (P-value was 0.4391). In half of the patients, RNaseH2A expression was higher in tumor tissue samples that would recur compared to tumor recurrence tissues (1.26 to 5.05 times higher), while in the other half of patients the expression was slightly higher in recurrent tumors than in tumors that would recur (1.17 to 1.68 times higher).

Conclusion: There is no difference in RNaseH2A gene expression in samples of urothelial bladder tumors that would recur compared with samples of tumor tissues that would not recur. There is also no difference in RNaseH2A gene expression in urinary bladder tumor samples that would recur and tumor recurrence tissue samples in the same patients. RNaseH2A gene expression cannot be used as a marker of the likelihood of urothelial bladder tumor recurrence

compared to a tumor that would not recur.

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Mia Beara

Datum i mjesto rođenja: 27. veljače 1997., Split, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Don Petra Katunarića 9, 21215, Kaštel Lukšić

Broj telefona: 098 181 0711

Elektronska pošta: miabeara@gmail.com

Obrazovanje:

2003.-2011. Osnovna škola "Ostrog", Kaštel Lukšić

2011.-2015. V.gimnazija "Vladimir Nazor", Split

2015.-2020. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studij Farmacija

Materinski jezik:

Hrvatski jezik

Strani jezici:

Engleski jezik – tečno

Talijanski jezik – osnovno

Aktivnosti:

Dobitnica Dekanove nagrade za izvrsnost, 2015./2016.