

Indukcija apoptoze i nekroptoze u stanicama tumora mokraćnog mjehura pod utjecajem šikonina

Svaguša, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:370284>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Biološki odsjek

Karla Svaguša

**INDUKCIJA APOPTOZE I NEKROPTOZE U STANICAMA TUMORA
MOKRAĆNOG MJEHURA POD UTJECAJEM ŠIKONINA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Biološki odsjek

Karla Svaguša

**INDUKCIJA APOPTOZE I NEKROPTOZE U STANICAMA TUMORA
MOKRAĆNOG MJEHURA POD UTJECajem ŠIKONINA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen pod vodstvom doc. dr. sc. Jelene Korać Prlić u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

INDUKCIJA APOPTOZE I NEKROTOZE U STANICAMA TUMORA MOKRAČNOG MJEHURA POD UTJECajem ŠIKONINA

Karla Svaguša

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Šikonin, prirodni spoj izoliran iz korijena biljke *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc., od davnina se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za liječenje dermatitisa, rana, ospica i opeklina, a danas je poznat po svojem protutupalnom, antioksidativnom i protutumorskom djelovanju. U ovom radu ispitivano je protutumorsko djelovanje šikonina na stanice tumora mokraćnog mjehura. Ispitivan je njegov utjecaj na stanično preživljenje ovisno o koncentraciji, gustoći nasijanih stanica i volumenu u kojem su stanice tretirane, a indukcija određenog oblika stanične smrti ispitivana je mjerenjem ekspresije proteina i gena karakterističnih za apoptozu i nekrotozu. S obzirom da apoptoza i nekrotoza mogu biti inducirane preko TNF α /TNFR signalnog puta, pomoću inhibitora apoptoze (ZVAD) i inhibitora nekrotoze (Nec1s), ispitivano je može li se određena stanična smrt inhibirati i preusmjeriti iz jednog oblika u drugi. Rezultati su pokazali da šikonin uspješno djeluje na tumorske stanice mokraćnog mjehura inhibirajući staničnu proliferaciju te inducira i apoptozu i nekrotozu. Uspješno preusmjerenje stanične smrti pomoću tretmana šikoninom može biti ključno u prevenciji tumora rezistentnih na kemoterapeutike koji induciraju apoptozu.

Rad sadrži: 40 stranica, 16 slika, 2 tablice, i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: tumor, mokraćni mjehur, stanična smrt, protutumorsko djelovanje, kemotapeutik

Voditelj: Doc. dr. sc. Jelena Korać Prlić

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenjitelji: 1. Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

2. Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

3. Doc dr.sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 27.05.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

SHIKONIN INDUCTION OF APOPTOSIS AND NECROPTOSIS IN BLADDER CANCER CELLS

Karla Svaguša

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Shikonin, a natural compound isolated from the roots of the plant *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc., has long been used in traditional Chinese medicine to treat dermatitis, wounds, measles and burns, and today is known for its anti-inflammatory, antioxidant and antitumor effects. In this thesis the antitumor effect of shikonin on bladder cancer cells was investigated. How it effects cell survival depending on the concentration, density of seeded cells and the volume in which the cells were treated and the induction of a different forms of cell death which was examined by measuring the expression of proteins and genes characteristic for apoptosis and necroptosis. Since apoptosis and necroptosis can both be induced through the TNF α / TNFR signaling pathway, apoptosis inhibitors (ZVAD) and necroptosis inhibitors (Nec1s) have been investigated to determine whether a particular cell death can be inhibited and redirected from one form to another. The results showed that shikonin successfully acts on bladder cancer cells by inhibiting cell proliferation and inducing both apoptosis and necroptosis. Successful redirection of cell death by shikonin treatment may be crucial in the prevention of tumors resistant to other apoptosis-inducing chemotherapeutics.

Thesis consists of: 40 pages, 16 figures, 2 tables and 40 references. Original language: Croatian.

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: tumor, bladder, cell death, antitumor effect, chemotherapeutic

Supervisor: Dr. sc. Jelena Korać Prlić, Assist. Prof.

Co-supervisor: Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Reviewers: 1. Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

2. Dr. sc. Inga Urlić, Assoc. Prof.

3. Dr. sc. Sofia Ana Blažević, Assist. Prof.

Thesis accepted: 27.05.2021.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Tumor mokraćnog mjehura	1
1.1.1. Epidemiologija i faktori rizika	1
1.1.2. Klasifikacija tumora mokraćnog mjehura.....	3
1.1.3. Simptomi i liječenje	5
1.2. Stanične linije.....	6
1.2.1. MB49	6
1.2.2. T24.....	7
1.2.3. TCC SUP	7
1.3. Tipovi stanične smrti	8
1.3.1. Apoptoza	8
1.3.2. Nekroptoza	9
1.3.3. Ostali tipovi stanične smrti.....	10
1.4. Šikonin.....	11
1.4.1. Biosinteza šikonina	11
1.4.2. Učinak šikonina na tumore.....	12
2. Cilj istraživanja.....	14
3. Materijali i metode.....	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Eksperimentalne stanice	15
3.1.2. Osnovne kemikalije	15
3.1.3. Puferske otopine	16
3.1.4. Osnovne otopine	17
3.1.5. Protutijela.....	17
3.1.6. Medij	18
3.2. Metode	18
3.2.1. Određivanje broja i postotka živih stanica	18
3.2.2. Analiza western blot.....	18
3.2.3. Imunofluorescencija	19
3.2.4. Izolacija RNA.....	19
3.2.5. Priprema qRT-PCR	20

3.2.6. Statistika	21
4. Rezultati.....	22
4.1. Šikonin smanjuje broj tumorskih stanica ovisno o koncentraciji, staničnoj konfluentnosti i volumenu	22
4.2. Šikonin inhibira staničnu proliferaciju	28
4.3. Šikonin inducira apoptozu i nekroptozu tumorskih stanica mokraćnog mjehura	28
4.4. Utjecaj inhibitora Nec1s i ZVAD	32
5. Rasprava.....	34
6. Zaključak.....	37
7. Literatura.....	38
ŽIVOTOPIS	41

POPIS KRATICA

BSA – Albumin goveđeg seruma, engl. *Bovine Serum Albumin*

DAMPs - Molekularni obrasci povezani s oštećenjem, engl. *Damage associated molecular patterns*

ddH₂O - Redestilirana voda, engl. *Double distilled water*

DMEM - Dulbeccov modificirani medij Eagle, engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EtOH - Etanol

FADD - Protein koji vezuje Fas s domenom smrti, engl. *Fas-associated protein with death domain*

FBS – Fetalni goveđi serum, engl. *Fetal Bovine Serum*

MLKL – Miješani protein sličan domeni kinaze, engl. *Mixed lineage kinase domain-like protein*

Nec1s - Nekrostatin-1s

NF- κ B - Nuklearni faktor kapa B

PAMPs - Molekularni obrasci povezani s patogenom, engl. *Pathogen associated molecular patterns*

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom, engl. *Phosphate-buffered saline*

RIPK - Receptorska serin/treonin proteinska kinaza, engl. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*

qRT-PCR – Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, engl. *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*

SDS - Natrijev dodecil sulfat, engl. *Sodium dodecyl sulfate*

TNF - Faktor nekroze tumora, engl. *Tumor necrosis factor*

TRADD - engl. *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*

TRAIL - ligand koji inducira apoptozu povezanu s čimbenicima nekroze tumora, engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

ZVAD - Benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon

1. UVOD

1.1. Tumor mokraćnog mjehura

Tumor mokraćnog mjehura, engl. *bladder cancer* (BC), po učestalosti u svijetu deveti je najčešće dijagnosticirani oblik tumora i drugi najčešći genitourinarni zloćudni tumor s globalno rastućom populacijom preživjelih (Antoni i ostali 2016; Bhanvadia 2018). Najčešće se javlja kod osoba u kasnijoj životnoj dobi, točnije između 50-te i 70-te godine života (Watt 1986). Trećina oboljelih su muškarci, no u većini zemalja stopa incidencije kod muškaraca se stabilizirala ili je u opadanju dok je kod žena zabilježen sve veći porast. Tumor mokraćnog mjehura po smrtnosti zauzima 13. mjesto, a stope opadanja smrtnosti zabilježene su u razvijenim zemljama gdje je osviještenost o pušenju i bolje organizirano zdravstvo uvelike pridonijelo tome (Antoni i ostali 2016). Jedan od glavnih uzročnika nastanka tumora mokraćnog mjehura je konzumacija duhana. Također tome se može pridodati i izloženost određenim kemikalijama povezanih s profesionalnim zanimanjem u što spada izloženost aromatskim aminima i policikličkim ugljikovodicima (Martinez Rodriguez i ostali 2017).

Tumori mokraćnog mjehura većinom su urotelnog tipa te glavnina tumora spada u neinvazivne (čak njih 75%) za razliku od mišićno invazivnih ili diseminiranih na koje otpada 25% dijagnoza. Najvažniji prognostički čimbenik je stanični stupanj tumora, stoga je bitno naglasiti kako je polovica neinvazivnih tumora niskog stupnja povezana s boljim ishodom i smanjenom stopom recidiva, dok je kod mišićno invazivnih ili diseminiranih tumora stopa smrtnosti i recidiva značajno veća. Sve veća svijest o posljedicama samog tumora, kvalitete života, dijagnoze, liječenja i nadzora uvelike pridonose smanjenju ove statistike (Bhanvadia 2018).

1.1.1. Epidemiologija i faktori rizika

Tumor mokraćnog mjehura deveti je po zastupljenosti u svijetu u prosjeku s 430 000 novooboljelih u svijetu. Naviše obolijevaju muškarci iz južne i zapadne Europe, sjeverne Amerike i zapadne Azije. Godišnje od tumora mokraćnog mjehura umre 165 000 ljudi te je po smrtnosti 13. po redu od svih zloćudnih tumora. U zemljama s visokim stupnjem humanog razvoja javlja se 55% slučajeva, a najviše oboljelih su muškarci, čak trećina njih (Antoni i ostali 2016). Unatoč tome muškarci umiru samo dva puta više nego žene, a razlog je povezan s lošom dijagnozom kod žena gdje se hematurija u urinu često zamjenjuje s infekcijama urinarnog trakta te se ne vrše daljnje pretrage. Stoga im se tumor dijagnosticira u

uznapredovanom stadiju kada je izlječenje i preživljenje izrazito smanjeno. Dokazano je i da na tumor mokraćnog mjehura uvelike mogu utjecati i hormonalne promjene u trudnoći pa je tako kod žena roditelja rizik za razvoj tumora smanjen u odnosu na žene koje nisu rodile. Pretpostavlja se i da rizik opada s brojem trudnoća (Kirkali i ostali 2005).

Utjecaj na razvoj tumora mokraćnog mjehura imaju okolišni i nasljedni čimbenici. Glavni okolišni čimbenici nastanka raka su konzumacija duhanskih proizvoda, profesionalno zanimanje, kronične infekcije urinarnog trakta, kemoterapeutici, radioterapija, šistosomijaza, umjetna sladila i kava.

Pušenje se navodi kao vodeći čimbenik nastanka tumora mokraćnog mjehura. Unatoč tome postoje populacije s visokom zastupljenošću pušenje kod kojih je mala incidencija tumora mokraćnog mjehura, i u tu skupinu spadaju muškarci polinezijskog podrijetla. To potvrđuje da je za rizik nastanka tumora mokraćnog mjehura uvelike zaslužan metabolizam kancerogena iz duhanskih proizvoda. Pojedinci sa sporim acilatorima N- aciltransferaze-2 imaju veći rizik za nastanak tumora mokraćnog mjehura u odnosu na pojedince s brzim acilatorima. U svakom slučaju trend incidencije tumora mokraćnog mjehura prati trend pušenja te je u zapadnim zemljama zabilježen pad incidencije tumora (Kirkali i ostali 2005).

Uz pušenje, još jedan od vodećih uzročnika nastanka tumora mokraćnog mjehura je i profesionalno zanimanje. Oko 20% od ukupne incidencije tumora mokraćnog mjehura čini izloženost kemikalijama. Najugroženije su osobe koje rade u industriji guma, tekstila i boja, kao i u kemijskoj industriji, kožarskoj industriji, postolari i slikari. Kod ovih zanimanja izloženost štetnim kemikalijama je veća pa je samim time i rizik za razvoj tumora mokraćnog mjehura veći. Dokazano je da NL-naftilamin, 4-aminobifenil (ABP) i benzidin induciraju tumor mokraćnog mjehura, a uz to se s tumorom mokraćnog mjehura još povezuju i ortotoluidin, aromatični amini, poliklorirani bifenil, formaldehid, azbest, benzen i metilenklorid. Među radnicima spomenutih industrija i zanimanja potrebno je kontinuirano pratiti rizik od nastanka tumora mokraćnog mjehura i poduzeti preventivne mjere.

Kronična infekcija urinarnog trakta je također jedan od čimbenika koji uzrokuju nastanak mokraćnog mjehura. Kronični cistitis najčešće se javlja kod ozljeda leđne moždine gdje bakterije nakupljaju nitrata i nitrozamine uzrokujući upalne procese i staničnu proliferaciju pa su stanice podložne većem broju genetičkih mutacija. Ovaj tip kronične infekcije povezan je s nastankom tumora pločastih stanica mokraćnog mjehura. Osim kronične infekcije urinarnog trakta, uz tumor pločastih stanica mokraćnog mjehura povezuje se i bolest šistosomijaza koja nastaje djelovanjem parazita *Schistosoma haematobium*.

Kemoterapeutici, npr. ciklofosfamid, lijek za maligne neoplazme, uzrokuje nastajanje urotelnog oblika tumora mokraćnog mjehura. Njegovo djelovanje toksično je za mukožu mokraćnog mjehura jer uzrokuje nastanak staničnih abnormalnosti u epitelu.

Istraživanja su pokazala i da radioterapija može povećati rizik za nastanak tumora mokraćnog mjehura. Žene koje su imale tumor jajnika i koje su liječene radioterapijom imale su povećani rizik za nastanak tumora mokraćnog mjehura u odnosu na one kojima je tumor uklonjen kirurški. Također žene koje su liječene radioterapijom u kombinaciji s kemoterapeuticima imale su još veći rizik za nastanak tumora mokraćnog mjehura.

Od ostalih okolišnih čimbenika koji se dovode u korelaciju za razvojem tumora mokraćnog mjehura su kava, umjetna sladila i boje za kosu no za njih još uvijek nema čvrstih dokaza (Farling 2017; Kirkali i ostali 2005).

1.1.2. Klasifikacija tumora mokraćnog mjehura

Postoji nekoliko histoloških tipova tumora mokraćnog mjehura, a najučestaliji, u prosjeku 90%, su tumori prijelaznih epitelih stanica, odnosno urotelni oblik tumora mokraćnog mjehura, 7% čine tumori pločastih stanica i 1% do 2% su adenokarcinomi. Manje zastupljeni i vrlo rijetki su sarkomi, miješani mezodermalni tumori i primarni tumori (Watt 1986).

Tumor mokraćnog mjehura može različito invadirati u tkivo, odnosno u različite vrste tkiva. Osnovna podjela tumora mokraćnog mjehura je na tumore koji ne invadiraju u mišićni sloj, engl. *nonmuscle-invasive bladder cancer* (NMIBC), na njih otpada 70 – 80% ukupnih karcinoma, i na one koji invadiraju u mišićni sloj, engl. *muscle-invasive bladder cancer* (MIBC). Daleko opasniji i teži pothvat prilikom liječenja predstavljaju tumori koji invadiraju u mišićni sloj te je mogućnost trajnog izlječenja znatno manja u odnosu na one koji ne invadiraju u mišićni sloj (Farling 2017).

Nadalje, detaljnija podjela i stupnjevanje tumora mokraćnog mjehura određeno je prema TNM klasifikaciji koju je odredilo Europsko udruženje za urologiju. Prema TNM klasifikaciji, prikazanoj u Tablici 1., tumori se dijele/stupnjuju prema: nastanku primarnih tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i prisutnosti metastaza (M). Stoga bi prvi korak pri liječenju bila uspostava dijagnoze i određivanje stupnja tumora kako bi se što djelotvornije mogao odrediti tretman i proces liječenja samog tumora (Martinez Rodriguez i ostali 2017).

Tablica 1. TNM klasifikacija tumora mokraćnog mjehura

Kategorija T: Primarni tumori (T)
<i>Tx</i>: Primarni tumor se ne može ocijeniti <i>T0</i>: Nema dokaza primarnog tumora <i>Tis</i>: Karcinom <i>in situ</i>: „ravni tumor“ <i>Ta</i>: Neinvazivni papilarni tumor <i>T1</i>: Tumor invadira u laminu propriju <i>T2</i>: Tumor invadira u mišićni sloj <i>T2a</i>: Zahvaćenost površinskog dijela mišićnog sloja <i>T2b</i>: Tumor invadira duboko u mišićni sloj <i>T3</i>: Tumor invadira u prevezikalno masno tkivo <i>T3a</i>: Mikroskopski <i>T3b</i>: Makroskopski <i>T4</i>: Tumor invadira u sljedeće strukture: prostatu, maternicu, vaginu, stjenku zdjelice, trbušnu stjenku <i>T4a</i>: Tumor invadira u prostatu, maternicu ili vaginu <i>T4b</i>: Tumor invadira u zdjeličnu ili trbušnu stjenku
Kategorija N: Zahvaćenost limfnih čvorova (N)
<i>Nx</i>: Regionalni limfni čvorovi se ne mogu ocijeniti <i>N0</i>: Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima <i>N1</i>: Metastaze u jednom limfnom čvoru; promjera ≤ 2 cm <i>N2</i>: Metastaze u jednom limfnom čvoru; $2\text{ cm} < \text{promjer} \leq 5\text{ cm}$, ili u više limfnih čvorova, nijedna promjera $> 5\text{ cm}$ <i>N3</i>: Metastaze u jednom limfnom čvoru; promjera $> 5\text{ cm}$
Kategorija M: Metastaze (M)
<i>Mx</i>: Udaljene metastaze se ne mogu ocijeniti <i>M0</i>: Udaljene metastaze nisu prisutne <i>M1</i>: Udaljenje metastaze prisutne

1.1.3. Simptomi i liječenje

Najčešći simptom koji se javlja kod 80% pacijenata je bezbolna hematurija koja može biti mikroskopska (vidljiva pod mikroskopom) ili makrohematurija (vidljiva u urinu). Stupanj hematurije nije povezan s ozbiljnošću bolesti. Hematurija nije nužno uvijek povezana s tumorom mokraćnog mjehura jer često može nastati kao posljedica drugih medicinskih stanja kao što su tumor prostate, renalni tumor, intestinalni cistitis, benigne hiperplazije prostate ili kao posljedica neke traume (Farling 2017). U praksi je uvaženo da svi pacijenti s hematurijom odu na pregled kod urologa kako bi se tumor mokraćnog mjehura u potpunosti isključio. Nažalost često je tumor mokraćnog mjehura zamijenjen s dijagnozom s drugim spomenutim stanjima te bude otkriven u kasnijim fazama što u konačnici ima puno lošiji ishod. Ovo se najčešće događa kod žena pa zato i je veliki broj smrtnosti u odnosu na muškarce koji obolijevaju u puno većem broju. Osim hematurije, kao najučestalijeg simptoma, javljaju se i drugi poput učestalog mokrenja, bolnog mokrenje i disurije. Kod bolesnika s uznapredovanim stadijem i metastazama javlja se bol u bokovima uzrokovana začepljenjem uretra, nastanak edema u donjim ekstremitetima i opipljivih zdjeličnih masa, gubitak kilograma i bolovi u trbuhu i kostima (Kirkali i ostali 2005).

Ovisno o stadiju tumora određuju se terapija i liječenje. Kod neinvazivnih (površinskih) tumora primjenjuje se transuretralna resekcija kojom se kroz mokraćnu cijev ulazi u mokraćni mjehur gdje se u cijelosti odstranjuju tumori. S obzirom da je rizik od ponovnog obolijevanja i progresije u mišićno invazivni tumor vrlo velik, transuretralna resekcija često je popraćena i s kemoterapeuticima, poput mitomicina C, što smanjuje rizik od ponovnog obolijevanja za 48 - 37% (Farling 2017). Također tumor mokraćnog mjehura može se liječiti i imunoterapijom s *Calmette-Guerin bacillus* (BCG) koji vrlo učinkovito stimulira imunološki odgovor i sprječava rast tumora. Ukoliko ipak dođe do ponovnog obolijevanja preporuča se radikalna cistektomija kojom se u potpunosti odstranjuje mokraćni mjehur (Martinez Rodriguez i ostali 2017). Mišićno invazivni tumori, s velikom stopom smrtnosti od 85% predstavljaju veći izazov u liječenju. Kod njih se primjenjuje radikalna resekcija kojom se uklanja mokraćni mjehur i zdjelični limfni čvorovi s ili bez neoadjuvantne kemoterapije. Ovisno o spolu uklanjaju se i neki okolni organi. Kod muškaraca se osim mokraćnog mjehura uklanja prostata, sjemeni mjehurići i okolno masno tkivo, a kod žena maternica s cerviksom, jajnici, jajovod i prednji vaginalni zid (Farling 2017). Ukoliko iz nekih razloga nije moguća radikalna resekcija ili bolesnik odbija odstranjivanje mokraćnog mjehura, primjenjuje se radioterapija

koja je znatno uspješnija u kombinaciji s kemoterapeuticima (Martinez Rodriguez i ostali 2017). Još jedan način uspješnog liječenja predstavlja imunoterapija s protutijelima anti-PD-L1. PD-L1 molekula izražena je na raznim tumorskim stanicama, kao i na nekim staničnim populacijama imunološkog sustava. Izražaj ove molekule povećan je u brojnim tumorima pa tako i kod tumora mokraćnog mjehura. PD-L1 se veže na PD-1 (engl. *programmed death 1*) receptor na T regulatornim stanicama i potiče antigen-specifičnu apoptozu ili anergiju T regulatornih stanica čim se ostvaruje imunosupresivni učinak. Imunoterapijom protutijelima s anti-PD-L1 prevladava se ili blokira interakcija između PD-L1 i PD-1 te se na taj način potiče aktivacija imunološkog sustava protiv stanica raka (Vandever i ostali 2018). Iako se najnovija imunoterapija pokazala relativno uspješnom, samo oko 20% pacijenata pokazuje dobar odgovor na nju stoga postoji potreba za budućim poboljšanjima te terapije i razvijanju novih terapijskih pristupa.

1.2. Stanične linije

Do danas je razvijen veliki broj stanica za istraživanje tumora mokraćnog mjehura, no samo neke od njih se učestalo koriste. Stanice mogu biti uzgojene direktno u uvjetima *in vitro* iz tkiva pacijenta kod kojih je dijagnosticiran tumor ili se mogu uzgojiti implantacijom tumorskih stanica bolesnika u imunodeficientne mišve iz kojih se izoliraju nakon nekoliko pasaža. Pri odabiru modela stanica bitno je poznavati profil stanica, prednosti i ograničenja stanica i njihovu autentičnost (Zuiverloon i ostali 2018). Stanične linije koje se koriste u ovom radu su mišja stanična linija MB49 i dvije humane stanične linije T24 i TCC SUP (Slika 1.).

1.2.1. MB49

MB49 je mišja stanična linija koja se koristi kao model urotelnog mokraćnog mjehura. Ova stanična linija nastala je transformacijom urotelnih stanica mokraćnog mjehura 24-satnim djelovanjem kancerogena DMBA (12-dimetilenzantacen), stanice su ortotopski transplantirane u C57BL/6J muškoga miša. Tumori nastali od ovih stanica nalikuju mišićno invazivnim tumorima. S obzirom da su nastale pod utjecajem DMBA (12-dimetilenzantacen) imaju različit mutacijski profil od stanica koje su inducirane s BBN-om (N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin) kao i od humanih stanica (Zuiverloon i ostali 2018). Često se koriste kao singenični model te su dobar životinjski model za proučavanje antitumorskog djelovanja *Calamette-Guerin bacillus*-a (Chen i ostali 2009). Iz njih su izvedene i MB49-I stanice s invazivnijim fenotipom te se pokazalo da tumori nastali od ovih stanica mogu razviti

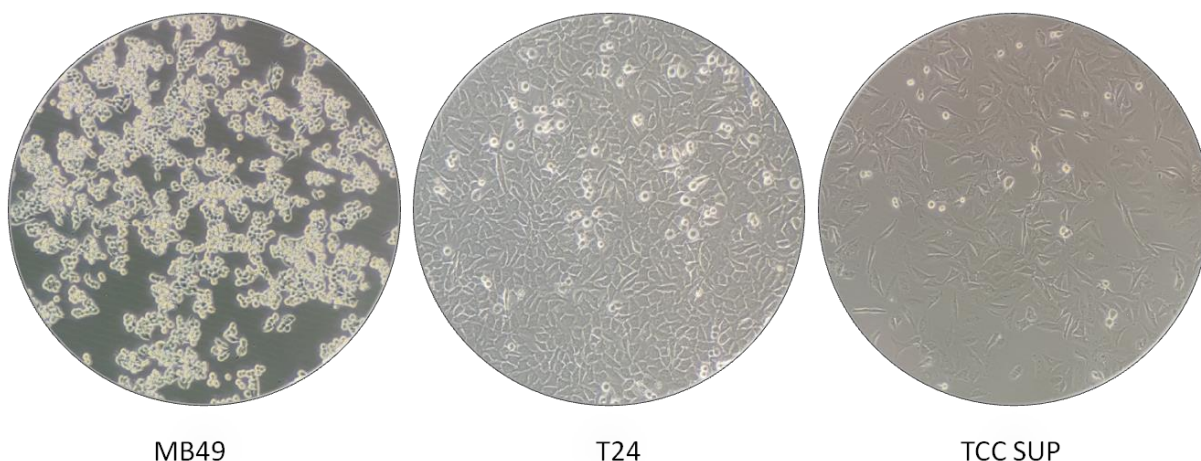
metastaze pa se smatraju vrlo zanimljivim modelom za buduća istraživanja (Albertó i ostali 2019).

1.2.2. T24

T24 je humana stanična linija izolirana iz 82-godišnje pacijentice kojoj je dijagnosticiran papilomatozni tumor mokraćnog mjehura trećeg stupnja (Bubeník i ostali 1973). Spadaju u skupinu prijelaznih tumorskih stanica urotelnog porijekla. Imaju mješovitu morfologiju, pokazuju osobine epitelnih i fibroblastnih stanica. Mogu rasti u jednom ili više slojeva, hipotetraploidne su, a generacijsko vrijeme im je 19 h. Slabo su diferencirane i imaju veliki potencijal za metastaziranje (Peng i ostali 2006). Sadrže onkogen *HRAS*, te imaju učestale mutacije gena *TERT* i *TP53* (Peng i ostali 2006; Zuiverloon i ostali 2018).

1.2.3. TCC SUP

TCC SUP je još jedna humana stanična linija urotelnog tipa izolirana iz nediferenciranog tumora prijelaznih stanica. Izolirane su iz 67-godišnje pacijentice kojoj je dijagnosticiran anaplastični tumor prijelaznih stanica, stadija IV. Kod pacijentice su zabilježene i metastaze na kostima. Kao i T24 stanice posjeduju antigene povezane s tumorima, no smatra se da je njihov izražaj smanjen ili izmijenjenog oblika jer ih nisu ubile limfoidne stanice koje su lizirale T24 staničnu liniju. Morfološki su miješanog tipa, fibroidnog i epitelnog oblika (Nayak i ostali 1977). Hipotetraploidne su te imaju zastupljene mutacije u genima *PIK3CA*, *TERT* i *TP53* (Zuiverloon i ostali 2018).



Slika 1. Tumorske stanične linije MB49, T24, TCC SUP. Povećanje 100X. Autor: Karla Svaguša

1.3. Tipovi stanične smrti

1.3.1. Apoptoza

Apoptoza je programirani oblik stanične smrti kojim se uklanjaju neželjene ili oštećene stanice. Nužna je za održavanje homeostaze tako što održava broj stanica u organizmu konstantnim. Također bitna je i za embrionalni razvitak gdje se uklanjanjem stanica razvija funkcionalni organizam. Morfološke promjene koje nastupaju uslijed apoptoze su skupljanje stanice, odvajanje oštećene stanice od zdravih, kondenzacija kromatina, propadanje jezgre i bubrenje membrane. Sve ovo rezultira formiranjem apoptotskih tjelešaca kojima se stanica u potpunosti razgrađuje. Dva su osnovna puta kojima se apoptoza može aktivirati: intrinzični (mitohondrijski put) i ekstrinzični (put receptora smrti) put.

Intrinzični put se aktivira djelovanjem toksičnih tvari, virusnih infekcija, oštećenja DNA, zračenja i slično. Započinje permabilizacijom membrane do koje dolazi uslijed umetanja proapoptotskih faktora Bax i Bak. Antiapoptotski faktori Bcl-2, Bcl-xl i Mcl-1 vežu se na Bax i Bak formirajući heterodimere i na taj način inhibiraju njihovo djelovanje. Bid, Bim, Noxa i Puma, također proapoptotski faktori, vežu spomenute antiapoptotske faktore i oslobađaju Bax i Bak koji dalje promoviraju apoptozu. Bax i Bak se umeću u membranu, uzrokuju stvaranje pora i permabilizaciju membrane. Kroz novonastale pore na mitohondrijskoj membrani dolazi do curenja citokroma c u citoplazmu što u konačnici potiče aktivaciju Apaf 1, faktor aktiviranja apoptotske proteaze 1, te oni zajedno formiraju apoptosom. Daljnji slijed događaja je aktivacija kaspazne kaskade koja u ovom slučaju započinje proteolitičkim cijepanjem kaspaze 9 i daljnjom aktivacijom izvršnih kaspaza. Osim citokroma c, iz mitohondrija se također oslobađa i endonukleaza G i AIF koji se translociraju u jezgru i tamo uzrokuju kondenzaciju kromatina i fragmentaciju DNA. Ove morfološke pojave izraženije su u kasnijim fazama apoptoze.

Ekstrinzični put ili put receptora smrti, kao što i sam naziv ukazuje, započinje aktivacijom membranskih receptora iz TNF familije koji imaju karakteristične domene smrti DD, engl. *death domain*. Do aktivacije ovih receptora dolazi uslijed vezanja specifičnih liganada na njih, pa tako u ovu skupinu ubrajamo parove: TNF/TNF R1, Fas ligand/FasR, TRAIL/TRAIL R1 i Apo2L/DR4. Vezanjem ovih liganda na njihove receptore uzrokuje vezanje i aktivaciju njihove podjedinice domene smrti, a kao rezultat svega dolazi do aktivacije pro-kaspaze 8. Nakon što je kaspaza 8 aktivirana moguća su tri ishoda: direktna

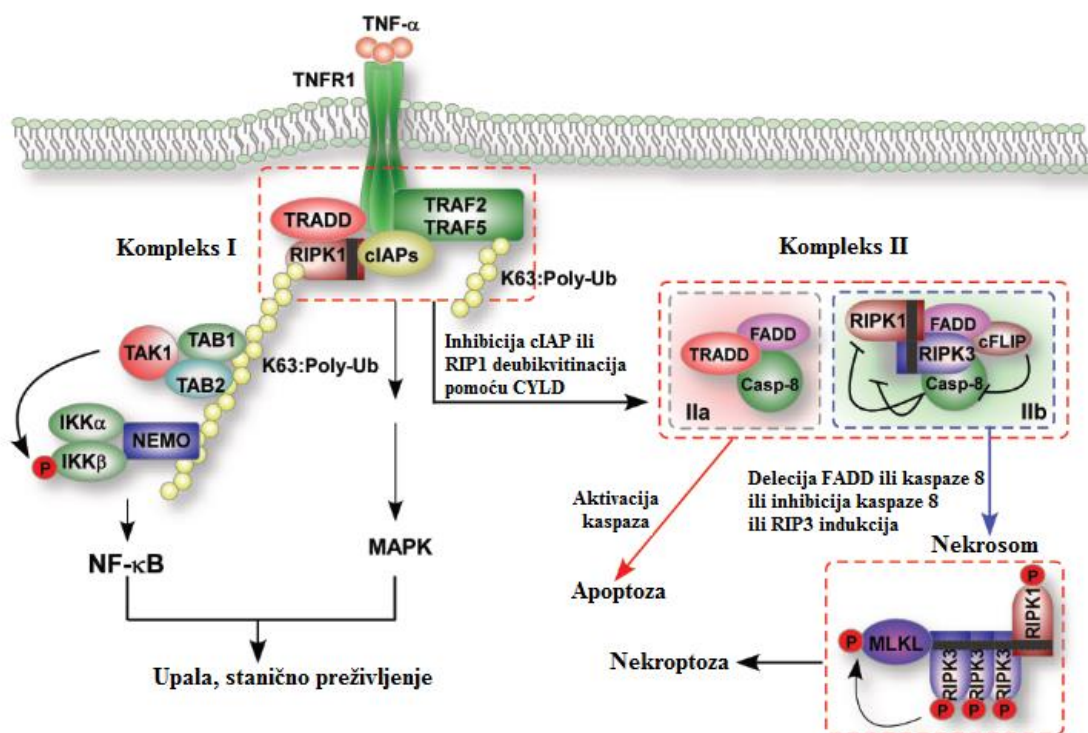
aktivacija apoptoze, aktivacija Bad faktora ili aktivacija kaspaze 3 te u konačnici aktivacija apoptoze (Green i Llambi 2015; Kiraz i ostali 2016).

1.3.2. Nekroptoza

Nekroptoza je regulirani oblik nekroze koji se javlja kao odgovor na izniman stres, blokiranu apoptozu ili se može inducirati upalnim citokinima i kemoterapeutima. Morfološki se razlikuje od apoptoze, a promjene koje se uočavaju kod nekroptoze su bubrenje stanice, oštećenje stanične membrane i curenje staničnog sadržaja u vanstanični prostor uslijed čega dolazi do imunološkog odgovora. Nekroptoza se može aktivirati preko različitih signalnih putova koji uključuju receptore iz TNF obitelji, kao što su TNF/TNF R1, Fas ligand/FasR, TRAIL/TRAIL R1 i preko drugih receptora IFNR i TLR. Najbolje opisan oblik aktivacije nekroptoze jest signalni put preko TNFR receptora (Slika 2.). Tri su moguća ishoda ovog staničnog puta: stanično preživljavanje, apoptoza ili nekroptoza (Zhu i ostali 2019).

TNFR aktivira se vezanjem komplementarnog liganda TNFa. Uslijed aktivacije dolazi do formiranja membranskog kompleksa I koji uključuje regrutaciju molekula RIPK1, TRADD, cIAPs i TRAF2 i TRAF5. Uloga ovog kompleksa, točnije cIAPs u kombinaciji s E3 ubikvitin ligazom, je ubikvitinacija RIPK1 što potiče aktivaciju NF- κ B signalnog puta i stanično preživljenje. Inhibicijom molekula cIAPs, RIPK1 se otpušta s kompleksa I u citoplazmu gdje se deubikvitinira uz pomoć CYLD. Dalje se RIPK1 regrutira zajedno s TRADD, FADD i pro-kaspazom 8 u kompleks IIa te dolazi do cijepanja pro-kaspaze 8 u njenu aktivnu formu kaspazu 8 što za ishod ima aktivaciju apoptoze. Inhibicijom kaspaze 8, RIPK 1 vezat će se u kompleks IIb zajedno s RIPK3 preko njihovih RHIM domena te će zajedno s MLKL tvoriti nekrosom. Uloga nekrosoma je aktivacija RIPK3 koji dalje posreduje fosforilaciju proteina MLKL, njegovu oligomerizaciju i translokaciju na staničnu membranu. Ugradnjom MLKL u membranu nastaju pore kroz koje dolazi do curenja organela i molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjima, engl. *damage associated molecular patterns* (DAMP), što u konačnici izaziva upalni odgovor (Meng i ostali 2016; Najafov i ostali 2017; Zhu i ostali 2019).

Osim RIPK1 i neke druge molekule sadrže aktivne domene RHIM pomoću kojih mogu aktivirati RIPK3. Tako se nekroptoza inducirana s TLR aktivira vezanjem TRICAM1 (TRIF), koji djeluje kao adaptor u signalnom putu TLR3 i TLR4, a nekroptoza izazvana virusom inducira se pomoću DAI / ZBP1 / DLM-1 koji reagira na egzogeni DNA. Ovim se potvrđuje da su ključne molekule za aktivaciju i izvršenje nekroptoze proteini RIPK3 i MLKL (Qin i ostali 2019).



Slika 2. TNF α /TNFR1 signalni put. Vezanjem liganda TNF α na TNFR1 dolazi do regrutacije proteina koji čine kompleks 1 (TRADD, RIPK1, cIAPs, TRAF2 i TRAF5). Ubikvitinacijom RIPK1 dolazi do aktivacije NF- κ B i MAPK što uzrokuje upalu i stanično preživljenje. Inhibicijom cIAPs, RIPK1 se otpušta u citosol gdje ga CYLD deubikvitinira te zajedno s TRADD, FADD i kaspazom 8 formira kompleks IIa što uzrokuje aktivaciju kaspaze 8 i indukciju apoptoze. Ukoliko je aktivacija kaspaze 8 inhibirana, RIPK1 stupa u interakciju s RIPK3 te zajedno s MLKL formiraju nekrosom čime se inducira nekroptoza (preuzeto i modificirano prema Meng i ostali (Meng i ostali, 2016)).

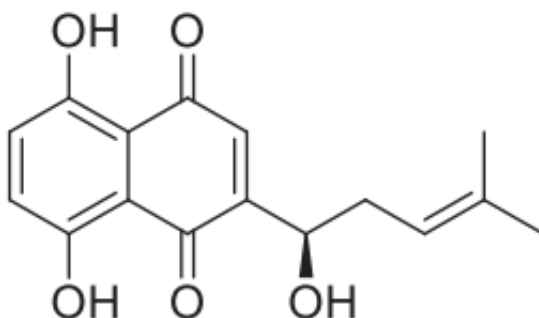
1.3.3. Ostali tipovi stanične smrti

Osim dobro opisane i istražene apoptoze i novootkrivene nekroptoze postoje i drugi oblici stanične smrti. U njih spadaju piroptoza, ferroptoza i entoza. Piroptoza je još jedan programirani oblik nekroze koji je za razliku od nekroptoze ovisan o kaspazama (kaspaza 1, 4, 5 i 11). Javlja kao odgovor na mikrobnu infekciju, a promjene koje se zapažaju su bubrenje, brza liza membrane i oslobađanje unutarstaničnog sadržaja što izaziva protuupalni odgovor (Bergsbaken i ostali 2009). Ferroptoza je programirani oblik oksidativne stanične smrti ovisne o željezu, a genetski, morfološki i biokemijski se razlikuje od apoptoze i nekroptoze. Nastaje kao posljedica nakupljanja letalnog lipidnog ROS-a (Dixon i ostali 2012). Entoza je oblik stanične smrti koji uključuje invaziju jedne stanice u drugu. Do ovoga dolazi zbog nedostatka hranjivih tvari, u odsustvu glukoze, pa stanice konkuriraju i proždiru jedna drugu. Osim u stanju gladi, do entoze može doći i uslijed odvajanja stanica od vanstaničnog matriksa (Hamann i ostali 2017). Autofagija je inače proces staničnog preživljavanja kojim stanica

uklanja oštećene organele, proteinske agregate i zarazne organizme te se javlja kao odgovor na stres. U situacijama kada stanica ne uspijeva prevladati stres i kada on postane letalan autofagija također može promovirati staničnu smrt neovisnu o kaspazama (Green i Llambi 2015).

1.4. Šikonin

Šikonin, punim nazivom 5,8-dihidroksi-2-(1-hidroksi-4-metil-3-pentenil)-1,4-naftokinon (Slika 3.), prirodni je spoj kojeg se može naći u korijenu biljke *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. iz porodice *Boraginaceae* (Boulos i ostali 2019). Od davnina se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za liječenje rana, dermatitisa, ospica i opekлина (Liu i ostali 2019), a danas je poznat po svojim protuupalnim, antioksidativnim i protutumorskim svojstvima. Također je učinkovit i u prevenciji jetrene fibroze, liječenju ozljeda kralježnične moždine, prevenciji plućne hipertenzije, zaštiti i prevenciji hipoksije i reoksidativnih oštećenja srca i mozga, itd (Wang i ostali 2019). Naglasak u ovome radu je na njegovo protutumorsko djelovanje kojim se želi utjecati na tumor mokraćnog mjehura.



Slika 3. Kemijska struktura šikonina.

Preuzeto od Wang i ostali (Wang i ostali 2019).

1.4.1. Biosinteza šikonina

Pretpostavlja se da se šikonin sintetizira putem koji je sličan biosintezi ubikinona s kasnijim reakcijama zatvaranja prstena. Ključne molekule u biosintezi šikonina su 4-hidroksibenzojeva kiselina (4-HBA), dobiva se šikatnim putem, i geranil difosfat (GPP) koji se dobiva mevalonskim putem. Uz njih nekoliko je bitnih enzima, a jedan od važnijih je 4-hidroksibenzoat geraniltransferaza. Uloga 4-hidroksibenzoat geraniltransferaze je da potiče vezanje aromatskog perkusora 4-HPB na izoprenoidni perkusor GPP što rezultira nastajanjem

3-geranil-4-hidroksibenzoata, specifičnog intermedijera u biosintezi šikonina. S obzirom da se enzimi za biosintezu šikonina nalaze u netopljivim membranskim vrećicama endoplazmatskog retikuluma pretpostavlja se da se i biosinteza šikonina također odvija u endoplazmatskom retikulumu. Pokazano je i da biosintezi šikonina iz sekundarnih metabolita pogoduje prisustvo magnezija i pH uvjeti između 7,1 i 9,3. Daljnja identifikacija i razumijevanje biogenih enzima i uvjeta mogu poboljšati alternativne strategije za proizvodnju šikonina za kliničku upotrebu (Boulos i ostali 2019; Wang i ostali 2019).

1.4.2. Učinak šikonina na tumore

Brojna istraživanja usmjerena su na proučavanje šikonina kao spoja koji učinkovito djeluje u borbi protiv tumora. Do sada je dokazano, u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, da šikonin uspješno suzbija tumor dojke, crijeva, endometrija, nazofarinksa, jednjaka, limfome, rak pluća, gušterače, mokraćnog mjehura i neke druge tipove tumora (Boulos i ostali 2019).

Jedan od načina na koji šikonin uspješno ubija tumorske stanice i tako smanjuje volumen tumora jest aktivacija stanične smrti. Do sada je dokazano kako potiče aktivaciju apoptoze u tumorskim stanicama crijeva (Liang i ostali 2017), tumorskim stanicama endometrija (Huang i Hu 2018) i u tumorskim stanicama dojke (Lin i ostali 2018), dok je nekroptoza dokazano aktivirana pod utjecajem šikonina u tumorskim stanicama nazofarinksa (Liu i ostali 2019), stanicama glioma (Ding i ostali 2019), kao i kod tumorskih stanica pluća (Kim i ostali 2017). Nadalje, šikonin inhibira proliferaciju i diferencijaciju stanica, suzbija rast i razvoj tumora, potiče aktivaciju autofagije te inhibira metastaziranje i angiogenezu.

Sinergističkim djelovanjem šikonin potpomaže funkciju lijekova na koje su stanice postale manje osjetljive ili rezistentne. Npr., zajedno s cisplatinom poboljšano ubija tumorske stanice mokraćnog mjehura, a u kombinaciji s gemcitabinom ubija tumorske stanice gušterače. I kod jednih i kod drugih, nadilazi otpornost stanica na apoptozu tako što inducira nekroptozu (Chen i ostali 2017; Wang i ostali 2018). Također povećava i senzibilizaciju gefitibina kod tumorskih stanica pluća smanjujući i sprječavajući njihovu proliferaciju, aktivirajući apoptozu i inhibirajući metastaze (Tang i ostali 2018).

Na molekularnoj razini, kao što je već spomenuto, uključuje se u razne metaboličke i signalne putove i utječe na pojedine proteine koji su ključni faktori u provođenju istih. Tako djeluje na signalni put RAS/RAF/MEK/ERK gdje inhibira kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom, engl. *extracellular signal - regulated kinase* (ERK) čijom fosforilacijom i translokacijom u jezgri se potiče transkripcija onkogeno c-Myc i drugih gena koji promoviraju

staničnu proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i metastaziranje tumora. Osim inhibicije, šikonin također pospješuje i aktivaciju ERK, što je poželjno kada ERK uzrokuje transkripciju gena c-Jun i na taj način promovira aktivaciju apoptoze.

U signalnom putu PI3K/AKT/mTOR/PTEN šikonin djeluje na dvije molekule. Inhibira fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K) i povišuje razine homologa fosfataze i tenzina (PTEN) te tako zaustavlja daljnju progresiju puta i aktivaciju proteina AKT/PKB zaslužnog za stanični rast, diferencijaciju, migraciju stanica i angiogenezu.

Kod signalnog puta JNK, poznatog i kao puta smrti, regulira stresom izazvanu apoptozu kojom uspješno ubija tumorske stanice dojke i žučnog mjehura.

Nadalje, dokazano je i da šikonin utječe na smanjenje razine izozim piruvat kinaze M2 (PKM2), važnog proteina koji regulira metabolizam stanica. Točnije PKM2 regulira posljednju fazu glikolize gdje potiče iskorištavanje glukoze za dobivanje ATP-a i tako promovira rast i razvoj tumorskih stanica. Promoviranje tumorskog metabolizma pod utjecajem PKM2 poznato je i pod nazivom Warburgov efekt. Inhibicijom ovog proteina zaustavlja se progresija tumora.

Još jedan od signalnih putova kojima suzbija rast i razvoj je i uključivanje u smanjenje razine transkripcijskog faktora STAT3. Inhibicijom STAT3 djeluje na smanjene HIF1a koji djeluje na cikline, regulatore staničnog ciklusa. Točnije HIF1a djeluje na ciklin kinazu D1 koja zaustavlja stanični ciklus u G0/G1 fazi. Inhibicijom staničnog ciklusa zaustavlja se i rast i širenje tumora (Wang i ostali 2019).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati utjecaj šikonina na tumorske stanice mokraćnog mjehura. Utvrdit će se utjecaj šikonina na stanično preživljenje u ovisnosti o koncentraciji šikonina i gustoći nasijanih stanica kao i u ovisnosti o ukupnom broju molekula šikonina. Stanične linije MB49, T24 i TCC SUP, nasijavat će se različitom gustoćom, tretirat će se s različitim koncentracijama šikonina i različitim volumenima iste koncentracije šikonina te će se pratiti njihovo preživljenje.

Različitim metodama ispitat će se indukcija apoptoze i nekroptoze pod utjecajem šikonina te će se provjeriti koji je od ta dva oblika stanične smrti dominantan. Ekspresija proteina karakterističnih za ove tipove stanične smrti ispitat će se metodom imunofluorescencije i western blot metodom, dok će se ekspresija gena ispitati metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* -PCR).

Aktivacija apoptoze i nekroptoze pod utjecajem šikonina dodatno će se potvrditi pomoću inhibitora apoptoze ZVAD-a (benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon) i inhibitora nekroptoze nekrostatin-1s-a te će se ispitati može li se stanična smrt preusmjeriti iz jednog oblika u drugi.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Eksperimentalne stanice

U eksperimentima su korištene MB49, T24 i TCC SUP tumorske stanične linije. Stanice su nasađene u ploču od 10 cm u 10 ml DMEM medija uz dodatak 10% FBS-a, 100 U/ml penicilina te 100 µg/L streptomycina. Rasle su i množile se u inkubatoru na 37°C 2 do 3 dana. Uslijed 90%-tne konfluentnosti, stanicama je odsisan medij, isprane su PBS-om te im je dodan 1 ml Tripsin-EDTA. Nakon 10-ak min dodano je 5 ml DMEM-a s FBS-om kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Stanice su resuspendirane, izmjerena im je koncentracija te su nasađene u ploču s 12 jažica (engl. *12-well plate*) u 1 ml medija istog sastava. Za imunofluorescentnu analizu, prije nasađivanja, u jažice su postavljena stakalca za imunofluorescenciju. Tretman stanica uslijedio je 24 sata od nasađivanja kada bi stanice postigle određenu konfluentnost. Ovisno o eksperimentu, stanice su tretirane s dimetilsulfoksidom, DMSO (kontrola), različitim koncentracijama šikonina (2 µM, 4 µM, 6 µM), te inhibitorima Nec1s (10 µM) i zVAD (50 µM) u 500 µL medija. Važno je naglasiti da u ekperimentu gdje su stanice tretirane s inhibitorima, tretman inhibitorima prethodio je 1 sat tretmanu šikoninom.

3.1.2. Osnovne kemikalije

2-propanol (Kemika)

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich)

Akril amid (AppliChem)

Albumin goveđeg seruma (BSA) (Roth)

Brom fenol plavo (Kemika)

Dimetil sulfoksid (DMSO) (Roth)

Etanol (Kemika)

Glicerol (Kemika)

Glicin (Roth)

Kalcijev klorid (Kemika)

Komplet za reverznu transkripciju (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems)

Komplet za RT-PCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems)

Luminol Western blotting luminol reagent (Solution A i Solution B) (Santa Cruz Biotechnology)

Magnezijev klorid (Fermentas)

Metanol (Sigma)

Mlijeko u prahu (Roth)

N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Roth)

Natrijev azid (Kemika)

Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Roth)

Natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (Kemika)

Natrijev klorid (Kemika)

Nekrostatin-1s (MedChemExpress)

Penicilin-streptomycin (GIBCO)

Ponceau S (Roth)

Protein Marker VI (10-245) prestained (AppliChem)

Šikonin (MedChemExpress)

Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich)

Tris (Sigma)

Triton-X-100 (Roth)

Voda bez nukleaza (Invitrogen)

ZVAD (MedChemExpress)

β -merkaptetanol (Fluka)

3.1.3. Puferske otopine

1X pufer za elektroforezu („running buffer“) pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS u ddH₂O)

1X pufer za prijenos („transfer buffer“) pripremljen iz koncentrirane otopine 10X (250 mM Tris, 2M glicin, 20% v/v metanol u ddH₂O)

Pufer za blokiranje TBS-BSA (5% BSA, 0,1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS-u, pH 7,4 u ddH₂O)

1X TBS pufer pripravljen iz koncentrirane otopine 10X (500 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5 u ddH₂O) Pufer za ispiranje membrana (1X TBS, 0,05% Tween, pH 7,4 u ddH₂O)

1X PBS napravljen iz 10X koncentrirane otopine (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2 mM KH₂PO₄)

6X pufer za nanošenje uzoraka (Leammler) (4% SDS, 10% β-merkaptetanol, 0,1% Tris, pH 6,8, 20% glicerol, 0.005% bromfenol plavo)

RIPA pufer za lizu (500 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0,5% Triton, 0,5% DOC, 0,1% SDS, pH 7,4, 50 mM NaF, Roche protease inhibitors, Roche Phospo STOP)

3.1.4. Osnovne otopine

Otopina za fiksaciju i permeabilizaciju stanica (2%-tna otopine paraformaldehida uz dodatak 0,15% Triton X-100 napravljena u 1X PBS-u)

Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0,5% v/v Ponceau S u dH₂O)

3.1.5. Protutijela

1) Primarno protutijelo

- anti-p-MLKL (Cell Signaling, 91689S)
- anti-p-MLKL ((Abcam, ab196436)
- anti-cleaved caspase 3 (Cell Signaling, 9661S)
- anti-p-histon H2A.X (Cell Signaling, 2577S)
- anti-PARP (Cell Signaling, 9542S)
- anti-Cyclin D1 (Dako, M3642)
- anti-vinculin (Sigma-Aldrich, V9131)

2) Sekundarno protutijelo

- anti-rabbit HRP (Dako, P0448)
- anti-mouse HRP (Bio Rad, 170-6516)

anti-rabbit (Alexa fluor 488 Conjugate, 4412S)

3.1.6. Medij

Za uzgoj stanica MB49, T24 i TCC SUP u kulturi korišten je DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) medij (Sigma-Aldrich) uz dodatak 10% FBS-a (engl. *Fetal Bovine Serum*) (PAA Laboratories Inc), 100 U/ml penicilina (GIBCO) te 100 µg/L streptomicina (GIBCO).

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje broja i postotka živih stanica

Nakon tretmana od 24h, medij, koji sadrži mrtve stanice, prebačen je u čiste epruvete od 1,5 ml. Stanice su isprane s PBS-om te su tripsinizirane 2 min s 300 µl Tripsin-EDTA. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodatkom medija iz prethodno spomenutih tubica. Stanice su dobro resuspendirane, prebačene u epruvete i centrifugirane na 500 x g, 5 min na sobnoj temperaturi. Supernatant je odsisan, a stanice su resuspendirane u 1 ml PBS-a. 10 µl stanične suspenzije pomiješano je s 10 µl 0,4% Trypan blue boje te je nanoseno 10 µl uzorka na višekratni brojač. Kod eksperimenta s inhibitorima broj i postotak živih stanica mjeren je direktno iz jažica nakon tripsinizacije i dodatka medija do ukupnog volumena od 1 ml. Koncentracija i postotak živih stanica izmjereni su pomoću brojača Countess II FL Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific).

3.2.2. Analiza western blot

Stanice su sakupljene i lizirane 10 minuta u puferu za lizu RIPA. Lizati su centrifugirani na 15000 x g, 20 min na 4°C, supernatant je zajedno s Laemmli puferom prokuhan u uređaju Thermomix 5 min na 95°C. Jednake količine uzoraka nanešene su na 12% ili gradijentni (4% i 15%) SDS-poliakrilamidni gel te su nakon elektroforeze transferirani na nitroceluloznu membranu. Membrane su blokirane 1 h na sobnoj temperaturi u otopini TBS-BSA 5% s 0,1% Na-azidom. Nakon toga su inkubirane preko noći na 4°C s različitim primarnim protutijelima, anti-p-MLKL (Cell Signaling, 91689S, 1:1000) ili anti-p-MLKL (Abcam, ab196436, 1:1000), anti-cleaved caspase 3 (Cell Signaling, 9661S, 1:1000), anti-p-histon H2A.X (Cell Signaling, 2577S, 1:500), anti-PARP (Cell Signaling, 9542S, 1:1800), anti-Cyclin D1 (Dako, M3642, 1:1000) ili anti-vinculin (Sigma-Aldrich, V9131, 1:1000). Sutradan isprane su s otopinom TBS-Tween 0,05% 3x po 10 min te su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sekundarnim protutijelima, anti-rabbit (Dako, P0448, 1:5000) ili anti-

mouse (Bio Rad, 170-6516, 1:5000). Nakon inkubacije membrane su ponovno isprane otopinom TBS-Tween 0,05% 3x po 10 min i 1x otopinom TBS. Imunoreaktivni proteini vizualizirani su kemiluminiscencijom u uređaju ChemiDoc (BioRad). Rezultati su analizirani u Image Lab, a intezitet signala normaliziran je u odnosu na vinkulin.

3.2.3. Imunofluorescencija

Stanice na stakalcima isprane su s PBS-om i fiksirane 20 min u 2% paraformaldehidu. Nakon ispiranja u otopini PBS-Tween 0,05% permabilizirane su 10 min u otopini PBS-Triton 0,2%. Nakon ponovnog ispiranja blokirane su 1 h u otopini PBS-BSA 3% na sobnoj temperaturi. Ostavljene su preko noći na 4°C da se inkubiraju u primarnim protutijelima anti-p-MLKL (Cell Signaling, 91689S, 1:50), anti-cleaved caspase 3 (Cell Signaling, 9661S, 1:200) ili anti-p-histon H2A.X (Cell Signaling, 2577S, 1:200). Sutradan isprane su s otopinom PBS-Tween 0,05% puferom 3x po 10 min te su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u mraku sa sekundarnim protutijelom, anti-rabbit (Alexa fluor 488 Conjugate, 4412S, 1:300). Nakon inkubacije stanice su ponovno isprane s otopinom PBS-Tween 0,05% 3x po 10 min i 1x s otopinom PBS. Kako bi se izbjeglo stvaranje kristalića staklaca su prethodno stavljena u ddH₂O, zatim fiksirana s Mounting medijem u koji je dodan DAPI (1:1000), te ostavljena na zraku da se suše. Mikroskopske fotografije snimljene su pomoću imunofluorescencijskog mikroskopa Olympus BX43 (Olympus Corporation). Odabrano je pet nasumičnih polja u kojima je određen broj pozitivnih stanica.

3.2.4. Izolacija RNA

Nakon tretmana stanice su sakupljene u tubice, centrifugom (500 x g, 5 min, sobna temperatura) su se istaložile, odsisan im je medij te su direktno resuspendirane u Qiazol-u. Potom je dodan kloroform te su stanice centrifugirane na 12000 x g, 10 min na 4°C kako bi se odvojile 3 faze. Gornja faza, koja sadrži RNA, prebačena je u nove tubice. Uz dodatak izopropanola nakon centrifugiranja na 12000 x g, 10 min na 4°C RNA se istaložila na dno tubice, a višak soli uklonjen je 75% EtOH-om. Pelet je ponovno izdvojen centrifugom na 7500 x g, 5min na 4°C. Ostavljen je na zraku par minuta da se suši te je resuspendiran u vodi koja ne sadrži DNaze i RNaze. Koncentracije RNA izmjerene su pomoću Nanodrop uređaja (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Jedan µg RNA preveden je u komplementarnu DNA (cDNA) koristeći High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

3.2.5. Priprema qRT-PCR

PCR u realnom vremenu pripremljen je koristeći cDNA i smjesu za svaki gen (sadrži SYBR Green, polimerazu, smjesu dNTP-a, *Forward* i *Reverse* početnice i vodu). Početnice korištene za qRT-PCR prikazane su u Tablici 2. Za lančane reakcije polimerazom korišten je RT-PCR uređaj (7500 Real Time PCR System Applied Biosystems Foster City, CA, SAD). Prilikom obrade podataka svaki gen standardiziran je u odnosu na aktin. Rezultati izražaja gena Ripk3 u različitim vrstama stanica prikazani su kao relativni izražaj gena i računaju se prema formuli $2^{-\Delta Ct}$ (Ripk3-Aktin). Promjena izražaja gena nakon tretmana sa šikoninom računaju se prema formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$ gdje je $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (Šikonin) – ΔCt (DMSO), a $\Delta Ct = Ct$ (gen od interesa) – Ct (Aktin).

Tablica 2. Korištene početnice, njihove sekvence i broj nukleotida.

Gen	Sekvence početnica (5' → 3')		Broj nukleotida
<i>RIPK1</i>	F	GCAGTTGTGAAGAGAATGCAG	21
	R	GAAGGAGCAAACCAGGACTC	20
<i>RIPK3</i>	F	AACTGGAACACCAAGTCCTG	20
	R	CACCCCAGAGCAGTTGTATATG	22
<i>MLKL</i>	F	GTGGGAAAGAAGGTGGAAGAG	21
	R	ACCGTTTGTGGATGACCTG	19
<i>BCL-XL</i>	F	GGGGTAAACTGGGGTCGCATT	21
	R	ACCTGCGGTTGAAGCGTTC	19
<i>CyclinD1</i>	F	ACGAAGGTCTGCGCGTGTT	19
	R	CCGCTGGCCATGAACTACCT	20
<i>ACTIN</i>	F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	20
	R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	20

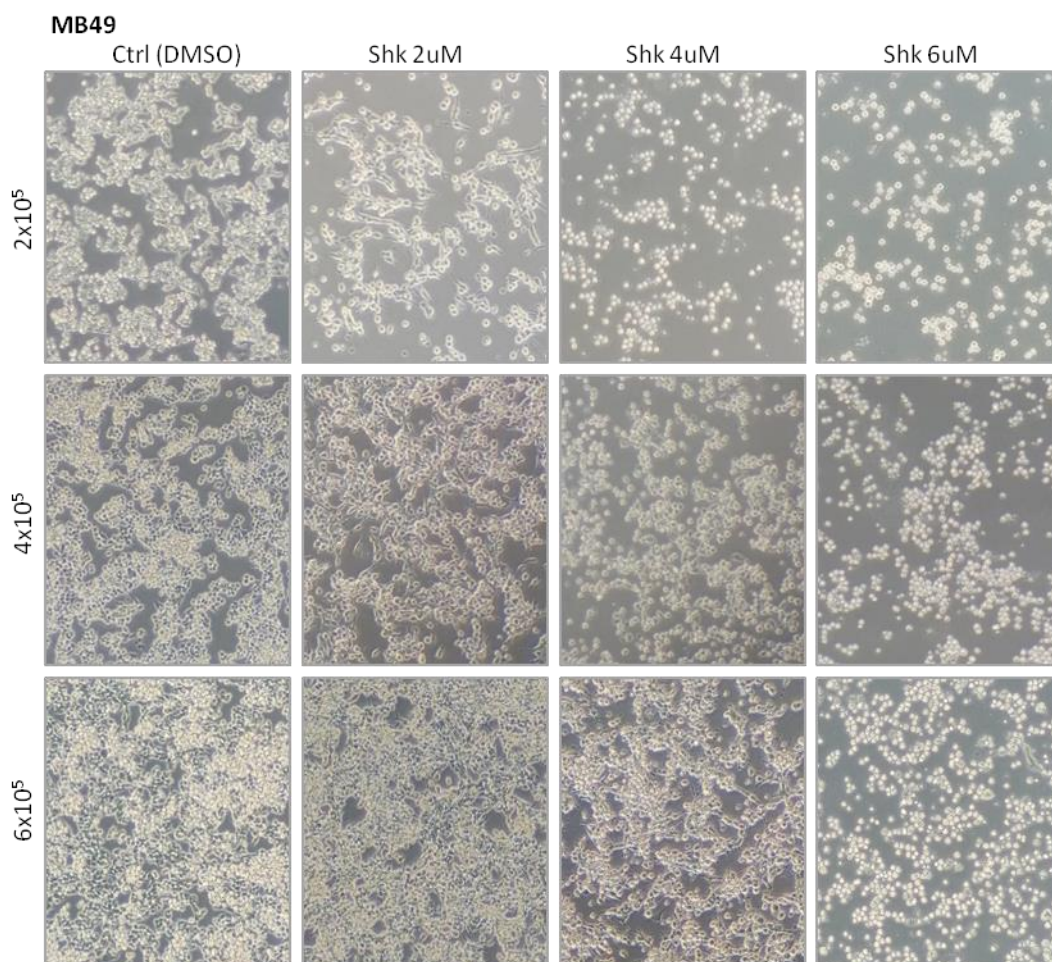
3.2.6. Statistika

Statistička obrada podataka analizirana je pomoću računalnog programa GraphPad Prism 9. Normalnost distribucije uzoraka provjerena je Shapiro Wilk testom. Rezultati broja stanica i postotka stanica analizirani su studentovim t-testom, a razina ekspresije gena *Ripk3* analizirana je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) sa post-hoc Tukey testom. Vrijednost od $p < 0.05$ smatrana je statistički značajnom. Pojedinačni statistički testovi prikazani su za svaki eksperiment u legendi slike. Svi su podaci prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

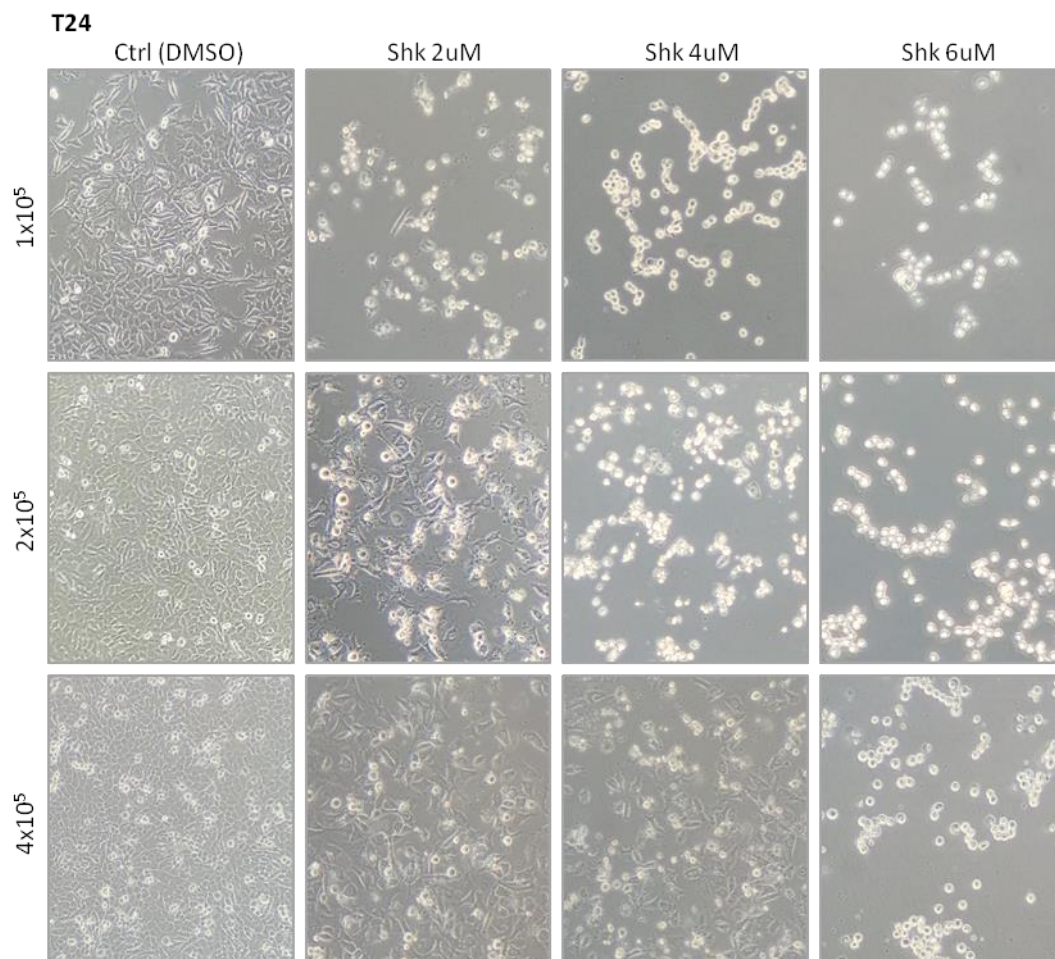
4. Rezultati

4.1. Šikonin smanjuje broj tumorskih stanica ovisno o koncentraciji, staničnoj konfluentnosti i volumenu

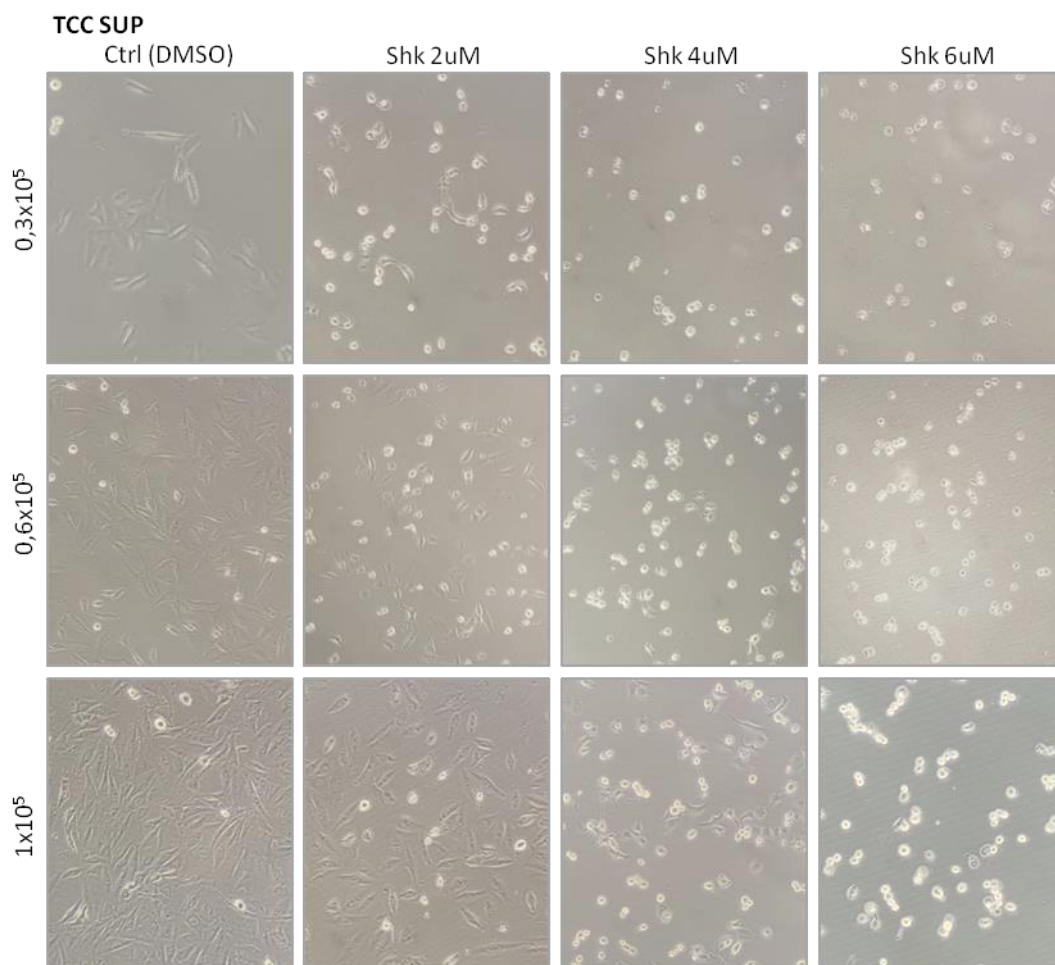
Da bi se istražio utjecaj šikonina na stanice tumora mokraćnog mjehura, nasijan je različiti broj stanica triju staničnih linija MB49, T24 i TCC SUP ($2 \times 10^5/ml$, $4 \times 10^5/ml$, $6 \times 10^5/ml$) i tretirane su 24 h s različitim koncentracijama šikonina ($2 \mu M$, $4 \mu M$ i $6 \mu M$). Rezultati su pokazali da su stanice, koje su postigle veću konfluentnost, otpornije na djelovanje šikonina te da tretman s manjim koncentracijama šikonina ima slabije djelovanje. Tako je kod stanica nasijanih $2 \times 10^5/ml$ učinak šikonina vidljiv već pri koncentraciji od $2 \mu M$, a kod stanica nasijanih $4 \times 10^5/ml$ i $6 \times 10^5/ml$ učinak je djelotvoran tek pri koncentracijama šikonina od 4 i $6 \mu M$. Sve tri stanične linije, MB49, T24 i TCC SUP, pokazale su sličan trend (Slika 4., 5. i 6.).



Slika 4. Učinak šikonina na staničnu liniju MB49. Stanice različite gustoće nasijane su u ploče s 12 jažica (engl. 12-*well plate*). Nakon što su postigle određenu konfluentnost tretirane su sa šikoninom (2 μ M, 4 μ M i 6 μ M) 24h. Kontrolne stanice tretirane su s DMSO-om.



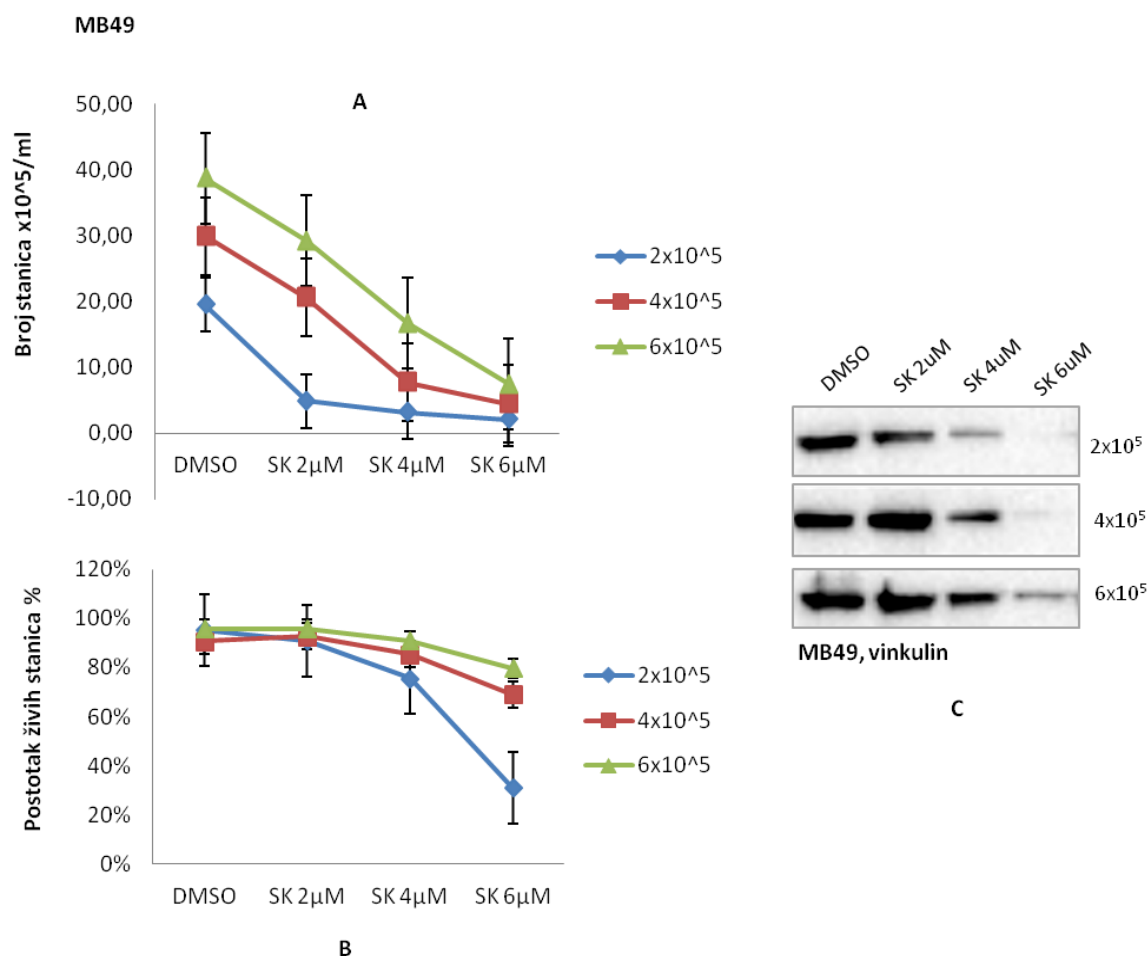
Slika 5. Učinak šikonina na staničnu liniju T24. Stanice različite gustoće nasijane su u ploče s 12 jažica (engl. 12-*well plate*). Nakon što su postigle određenu konfluentnost tretirane su sa šikoninom (2 μ M, 4 μ M i 6 μ M) 24h. Kontrolne stanice tretirane su s DMSO-om.



Slika 6. Učinak šikonina na staničnu liniju TCC SUP. Stanice različite gustoće nasijane su u ploče s 12 jažica (engl. 12-well plate). Nakon što su postigle određenu konfluentnost tretirane su sa šikoninom (2 μ M, 4 μ M i 6 μ M) 24h. Kontrolne stanice tretirane su s DMSO-om.

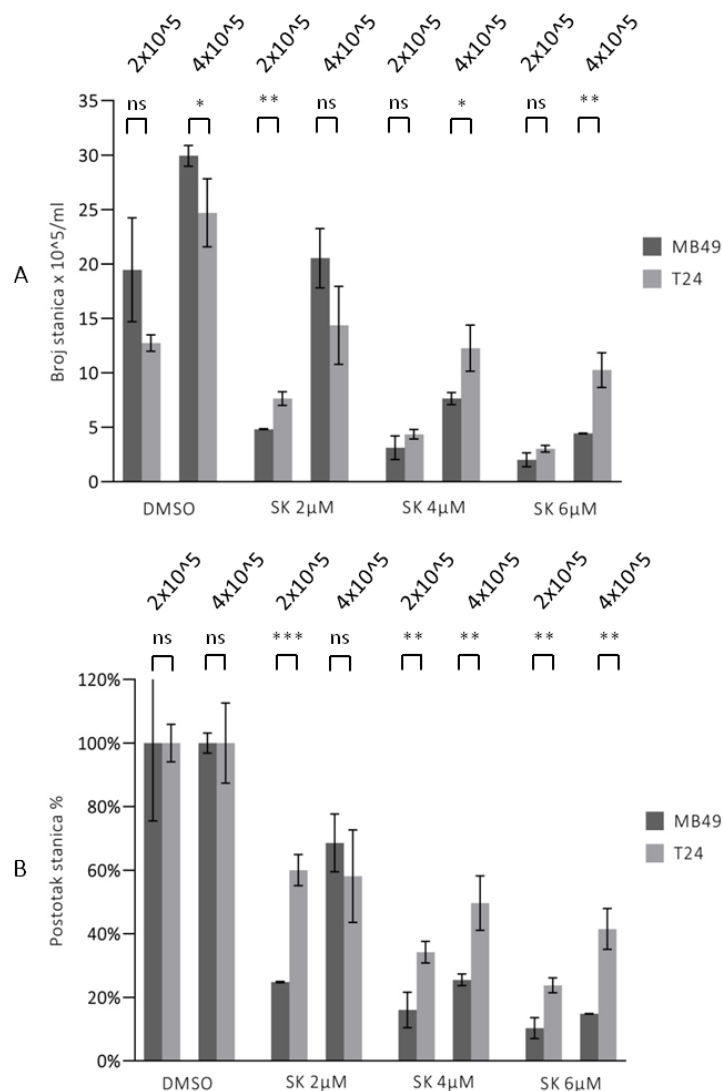
Sukladno tome, stanice su prebrojane te je iz grafa (Slika 7A.) vidljiv značajan pad broja stanica nasijanih 2 $\times 10^5/ml$ već pri tretmanu s 2 μ M šikoninom, dok se pad broja stanica nasijanih 4 $\times 10^5/ml$ i 6 $\times 10^5/ml$ postupno smanjivao u odnosu na povećanje koncentracije šikonina. Također, postotak živih stanica neznatno je promijenjen kod stanica nasijanih 4 $\times 10^5/ml$ i 6 $\times 10^5/ml$, dok je pad postotka živih stanica nasijanih 2 $\times 10^5/ml$ značajno vidljiv pri najvećoj koncentraciji šikonina u odnosu na kontrolu (Slika 7B.).

Učinak šikonina na različito konfluentne stanice vidljiv je i iz rezultata dobivenih western blotom. Analizirani su proteini izolirani iz stanične linije MB49. Ekspresija vinkulina, koji je korišten kao mjera količine proteina na gelu, smanjila se povećanjem koncentracije šikonina te je pri koncentraciji od 6 μ M kod stanica nasijanih 2 $\times 10^5/ml$ u potpunosti nestala (Slika 7C.).



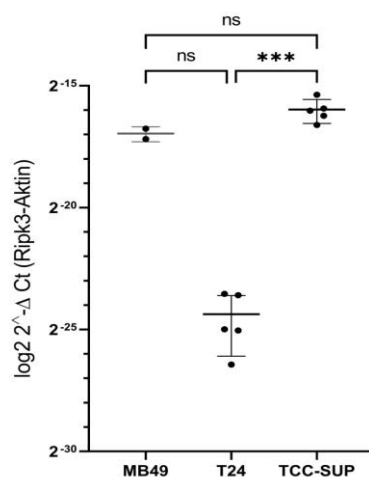
Slika 7. Učinak šikonina na MB49 staničnu liniju. **(A)** Broj stanica i **(B)** postotak živih stanica u ovisnosti o koncentraciji šikonina (2, 4, 6 μ M). Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SD ($n=3$). **(C)** Ekspresija vinkulina, gena stalne ekspresije u stanica, određena metodom western blot. DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

Usporedbom dviju staničnih linija MB49 i T24 pokazano je da tijekom 24 h MB49 imaju brži rast u odnosu na stanice T24 te da je tretman šikoninom uzrokovao smanjeni rast u odnosu na kontrolu (stanice tretirane sa dimetilsulfoksidom) (Slika 8A.). Ista koncentracija šikonina imala je jači utjecaj na stanice MB49 što je vidljivo iz manjeg postotka stanica u odnosu na kontrolu (Slika 8B.). Ukupan postotak stanica MB49 statistički je značajno manji od postotka stanica T24 pri svim koncentracijama šikonina i za stanice nasijane $2 \times 10^5/ml$ i $4 \times 10^5/ml$, osim pri koncentraciji šikonina 2 μ M kod stanica nasijanih $4 \times 10^5/ml$ gdje podaci nisu bili statistički značajni.



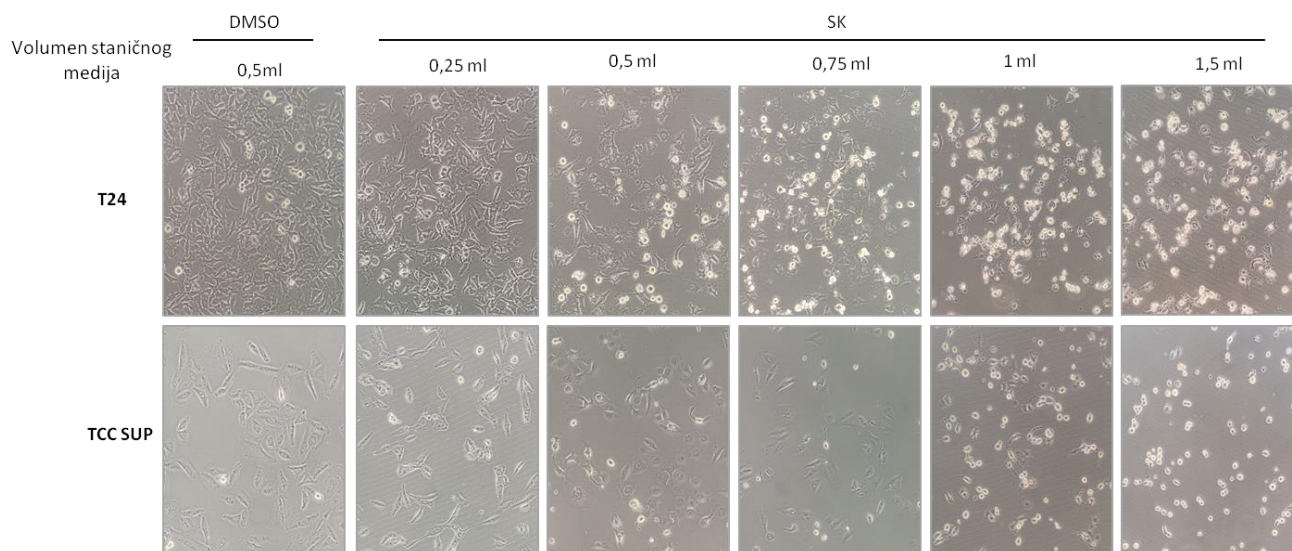
Slika 8. Usporedba učinka šikonina na dvije stanične linije, MB49 i T24, pri jednakom broju nasijanih stanica. Stanice su nasijane 2x10⁵/ml i 4x10⁵/ml te su tretirane različitim koncentracijama šikonina (2, 4, 6 μM). (A) Usporedba broja stanica i (B) postotka stanica. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 student t-test. Podaci prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n=3). DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) mjerena je razina ekspresije gena *Ripk 3*, ključnog medijatora nekroptoze, u netretiranim staničnim linijama MB49, T24 i TCC SUP. Rezultati su pokazali da je ekspresija *Ripk 3* statistički značajno smanjena kod stanične linije T24 u odnosu na TCC SUP, dok između MB49 i TCC SUP nema značajne razlike. Iako statistički nepotvrđeno, razlika u ekspresiji *Ripk3* pokazuje tendenciju ka smanjenu ekspresije kod T24 u odnosu na MB49. (Slika 9.).



Slika 9. Razina izražaja gena *Ripk3* u tri stanične linije. Svaka točka predstavlja jedan uzorak. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA sa post-hoc Tukey testom. Podaci prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD ($n=3$).

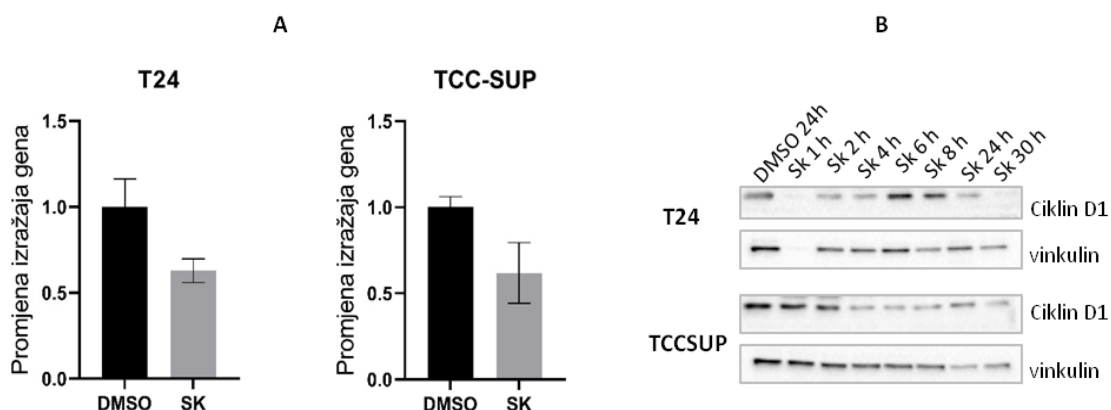
Osim konfluentnosti i koncentracije šikonina, i volumen tvori kojim tretiramo stanice utječe na njihovo preživljenje. Rezultati eksperimenta gdje su stanice tretirane s jednakom koncentracijom šikonina ($2 \mu\text{M}$) u različitom ukupnom volumenu staničnog medija pokazali su da što je ukupni volumen medija manji to je djelovanje šikonina slabije. Odnosno sa Slike 10. vidljivo je da je pri najmanjem ukupnom volumenu od 0,25 ml djelovanje šikonina najslabije. Kao kontrola stanice su tretirane s dimetilsulfoksidom u ukupnom volumenu od 0,5 ml.



Slika 10. Učinak ukupnog broja molekula šikonina na stanice. Dvije stanične linije, T24 i TCC SUP, tretirane su 24h sa šikoninom koncentracije 2 μ M u različitom ukupnom volumenu staničnog medija od 0,25, 0,5, 0,75, 1 i 1,5 ml. DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

4.2. Šikonin inhibira staničnu proliferaciju

Stanična proliferacija inhibirana je djelovanjem šikonina. Stanične linije T24 i TCC SUP tretirane su 2 μ M šikoninom. Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) određena je ekspresija gena ciklin D1 kod stanica tretiranih sa šikoninom u odnosu na kontrolu dimetilsulfoksid. Rezultati su pokazali da je ekspresija ciklina D1 smanjena nakon tretmana sa šikoninom 6 h (Slika 11A). Rezultati su potvrđeni western blot metodom nakon tretmana šikoninom koncentracije 2 μ M u različitim vremenskim periodima nakon 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h i 30 h gdje se ekspresija proteina ciklina D1 također smanjila. Uspoređujući ekspresiju ciklina D1 u odnosu na ekspresiju vinkulina, kod TCC SUP ekspresija proteina ciklin D1 smanjuje se nakon 4h, a kod T24 nakon 24 h (Slika 11B).

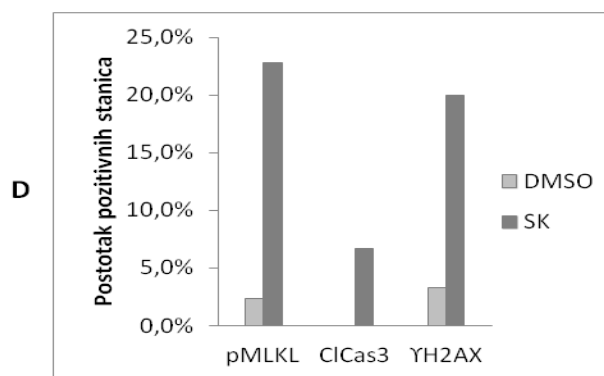
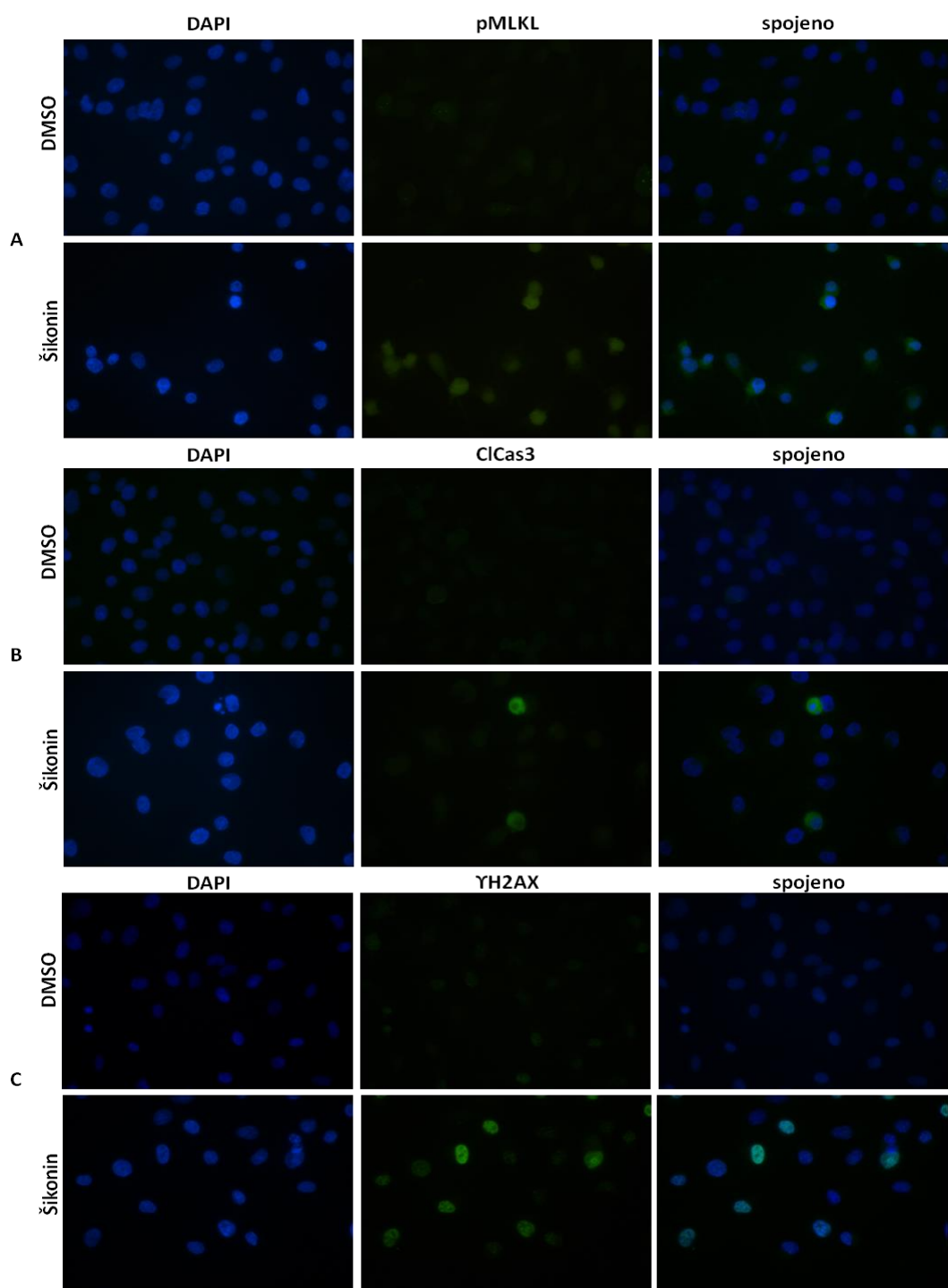


Slika 11. Promjena izražaja ciklin D1 nakon tretmana sa šikoninom. (A) Kvantitativnom analizom lančane reakcije polimerazom u stvarnim vremenu određena je ekspresije gena ciklin D1. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SD (n=3). (B) Western blot analiza ekspresije proteina ciklina D1 i vinkulina. DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

4.3. Šikonin inducira apoptozu i nekroptozu tumorskih stanica mokraćnog mjehura

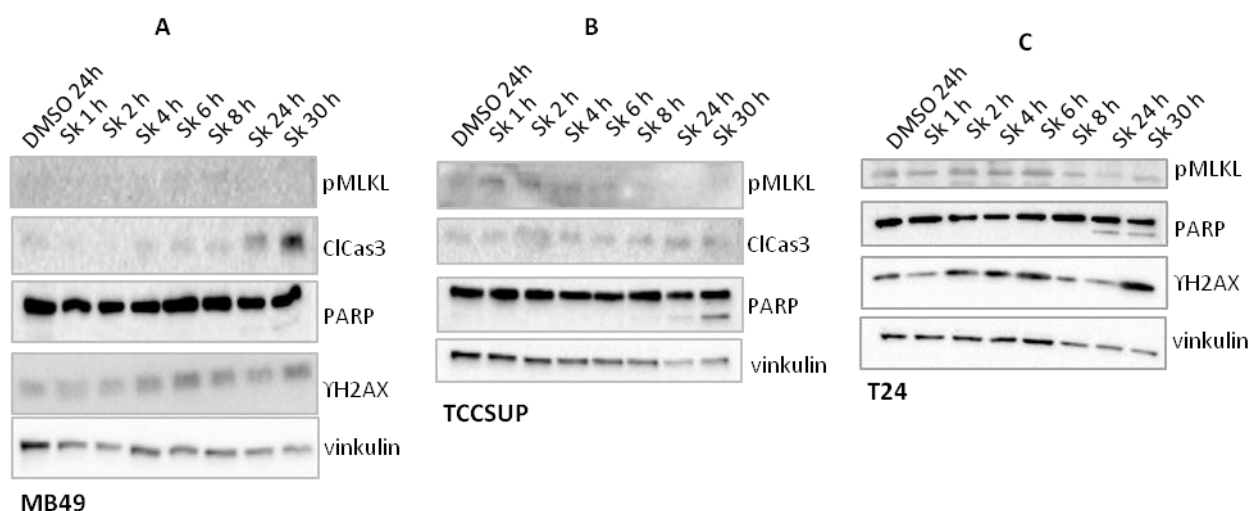
Metodom imunofluorescencije potvrđena je prisutnost apoptoze i nekroptoze kod stanične linije T24. U tretmanu sa šikoninom (4 μ M) nakon 6 h zabilježena je ekspresija fosforiliranog oblika proteina MLKL kod 22,8% stanica dok je kontrola DMSO imala 2,3%

pozitivnih stanica (Slika 12A.). Ekspresija aktiviranog pocijepanog oblika proteina kaspaze 3 (ClCas3) zabilježena je kod tretmana sa šikoninom (2 μ M) nakon 16 h gdje je bilo 6,7% pozitivnih stanica u odnosu na DMSO, 0% (Slika 12B.). Također u tretmanu sa šikoninom (2 μ M) nakon 16 h zabilježen je i raspad jezgri, a kao dokaz zabilježena je ekspresija preteina H2A.X, 20% pozitivnih stanica u tretmanu sa šikoninom, a kod kontrole DMSO 3,3% (Slika 12C.).



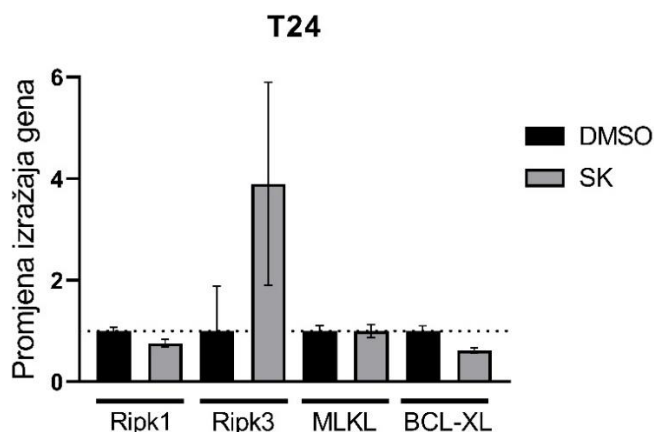
Slika 12. Aktivacija apoptoze i nekroptoze u stanicama T24. Metodom imunofluorescencije zabilježena je (A) ekspresija pMLKL nakon 6 h, (B) ClCas3 nakon 16 h i (C) YH2AX nakon 16 h kod kontrole i nakon tretmana sa šikoninom. (D) Postotak pozitivnih stanica određen brojanjem u pet nasumičnih polja. DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

Osim imunofluorescencijom, indukcija stanične smrti potvrđena je i metodom *western blot*. Stanične linije MB49, TCC SUP i T24 tretirane su sa šikoninom koncentracije 2 μ M u različitom vremenskom periodu: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h i 30 h. Signali za ispitivana protutijela mogu se vidjeti na Slici 13. Kod sve tri stanične linije signal za ClCas3 i pocijepani PARP javlja se nakon 24 h i 30 h, pMLKL uočen je nakon 2 h, 4 h i 6 h kod TCC SUP i T24, a kod MB49 javlja se nakon 6 h i 8 h. Signal za YH2AX postepeno raste kod MB49 i T24 stanične linije. Ekspresija vinkulina korištena je kao mjera količine proteina na gelu.



Slika 13. Aktivacija apoptoze i nekroptoze. Stanice su tretirane sa šikoninom 2 μ M te su sakupljene u različitim vremenskim periodima. Signali za karakteristična protutijela pMLKL, ClCas3, PARP, YH2AX i vinkulin zabilježeni su na trima različitim linijama (A) MB49, (B) TCC SUP i (C) T24. DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

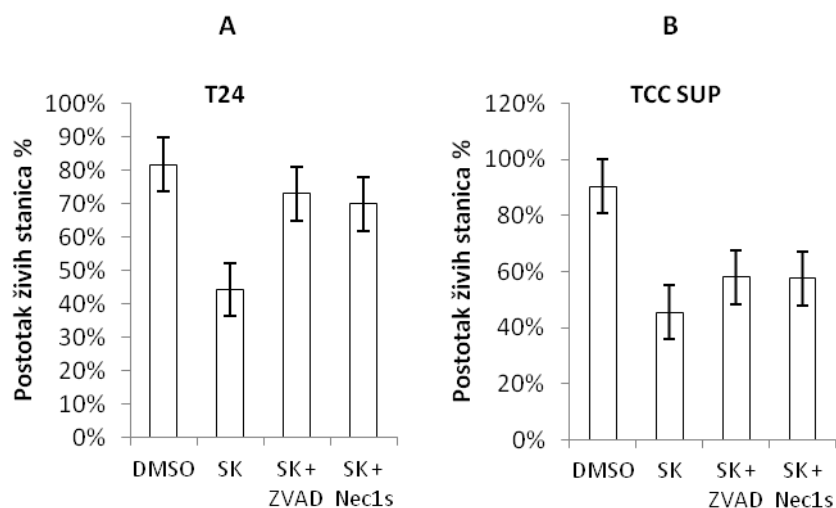
Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) određena je ekspresija gena karakterističnih za nekroptozu i apoptozu. Stanična linija T24 tretirana je 6 h sa šikoninom koncentracije 2 μ M. Rezultati su prikazani na Slici 14. Ekspresija ključnog nekroptotskog gena *Ripk3* je značajno porasla, dok je ekspresija *MLKL* ostala nepromijenjena nakon tretmana sa šikoninom. Ekspresija *Ripk1*, povezanog s apoptozom i nekroptozom, nije se značajno promijenila, a ekspresija *Bcl-xl*, negativnog regulatora apoptoze, se smanjila. Eksperimenti su rađeni na T24 staničnoj liniji.



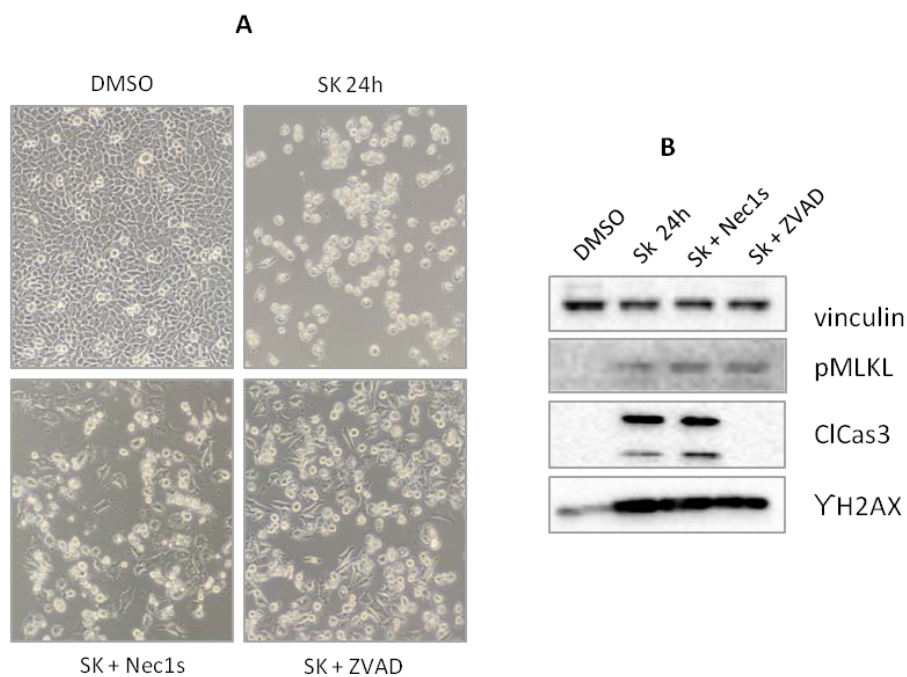
Slika 14. Promjena izražaja nekroptotskih i apoptotskih gena. Ekspresija gena određenih *Ripk 1*, *Ripk3*, *MLKL* i *Bcl-xl* određena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) u stanicama T24 6 h nakon tretmana sa šikoninom koncentracije 2 μM u odnosu na kontrolu dimetilsulfoksid. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SD (n=3). DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

4.4. Utjecaj inhibitora Nec1s i ZVAD

Stanice T24 i TCC SUP tretirane su 24 h sa šikoninom (2 μM) i u kombinaciji s inhibitorima ZVAD (50 μM) ili Nec1s (10 μM) kako bi se spriječila indukcija određenog oblika stanične smrti. Metodom brojanja određen je postotak živih stanica koji je kod stanica koje su bile tretirane sa šikoninom i jednim od inhibitora bio veći u odnosu na tretman samo sa šikoninom (Slika 15.). Također tehnikom western blot analizirani su proteini izolirani iz stanične linije T24 nakon tretmana sa šikoninom (2 μM) i u kombinaciji s inhibitorima ZVAD (50 μM) ili Nec1s (10 μM). Signal za ClCas3 inhibiran je u kombinaciji šikonina s inhibitorom apoptoze ZVAD u odnosu na tretman samo sa šikoninom dok količina signala za pMLKL nije značajno promijenjena kod tretmana s inhibitorom nekroptoze Nec1s. Signal za γH2AX zabilježen je kod tretmana sa šikoninom i u kombinaciji šikonina s inhibitorima (Slika 16B.). Na slici 16A. može se vidjeti korelacija rezultata s western blotom gdje je stanični rast smanjen kod tretmana sa šikoninom, a kombinacija šikonina i inhibitora sprječava djelovanje samog šikonina, posebice u kombinaciji šikonina s inhibitorom apoptoze ZVAD-om.



Slika 15. Utjecaj inhibitora ZVAD i Nec1s na stanično preživljenje. Stanice T24 i TCC SUP su tretirane 24 h sa šikoninom (2 μ M) i u kombinaciji s inhibitorima ZVAD (50 μ M) ili Nec1s (10 μ M). Metodom brojanja određen je **(A)** postotak živih stanica u T24 i **(B)** u TCC SUP staničnoj liniji. Vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ SD (n=3). DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.



Slika 16. Inhibicija stanične smrti pod utjecajem inhibitora. Stanice T24 su tretirane 24 h sa šikoninom (2 μ M) i u kombinaciji s inhibitorima ZVAD (50 μ M) ili Nec1s (10 μ M). **(A)** Prikaz stanica T24 pod mikroskopom; povećanje 100X. **(B)** Western blot analiza ekspresije proteina pMLKL, CICas3, γ H2AX i vinkulina.. DMSO – dimetilsulfoksid, SK – šikonin.

5. Rasprava

Tumor mokraćnog mjehura vrlo je zastupljen u svijetu i godišnje od njega obolijeva veliki broj ljudi stoga su istraživanja novih lijekova i drugih čimbenika vrlo aktualna. Jedan od spojeva koji je pokazao vrlo učinkovito protutumorsko djelovanje je šikonin (Wang i ostali 2019). Brojni znanstveni radovi dokazuju mehanizme kojima šikonin utječe na razne tumore pa tako između ostalog i na tumor mokraćnog mjehura (Wang i ostali 2018). Konkretno u ovom radu promatralo se djelovanje šikonina u *in vitro* uvjetima gdje su se tumorske stanične linije mišjeg i humanog porijekla izlagale njegovom djelovanju. Rezultati su pokazali da postoji puno čimbenika koji mogu utjecati na to. Broj nasijanih stanica i različite koncentracije šikonina pokazale su da što su stanice rjeđe nasijane (postigle manju konfluentnost) i što je koncentracija šikonina veća to je i njihova rezistencija manja te su podložnije njegovom djelovanju. Još jedan bitan čimbenik je i ukupan volumen tvari kojom su stanice tretirane. Naime što je veći ukupan volumen kojim su stanice tretirane veći je broj molekula koje dopiru u pojedinu stanicu, također i što su stanice manje konfluentne, manje su zaštićene i veća je izloženost tvari. Usporedbom rezultata za različite stanične linije pokazalo se da iako imaju isti trend (povećanjem koncentracije i smanjenjem konfluentnosti smanjeno je i preživljenje stanica) stanice mogu biti različito rezistentne pa je tako T24 stanična linija bila otpornija u odnosu na MB49. Ovo se može objasniti i činjenicom da su T24 imale smanjenu ekspresiju gena RIPK3 koji je nužan za indukciju nekroptoze i suzbijanje tumora (Chen i ostali 2017). Šikonin inhibira proliferaciju stanica tako što zaustavlja stanični ciklus inhibicijom ciklin kinaza koje vrše regulaciju staničnog ciklus. Tang i ostali dokazali su da šikonin inhibira signalni put EGFR/PI3K/AKT/mTOR čiji je nizvodni supstrat HIF1 α koji djeluje na ciklin kinazu D1 i zaustavlja stanični ciklus u G0/G1 fazi (Tang i ostali 2018). Ovo istraživanje pokazalo je inhibitorni učinak šikonina na ciklin kinazu D1 što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa i u konačnici inhibicijom proliferacije tumorskih stanica mokraćnog mjehura.

Pretpostavlja se da indukcija stanične smrti može biti ključna u suzbijanju tumora stoga je ovo istraživanje za cilj imalo pokazati utjecaj šikonina na indukciju stanične smrti. Apoptoza kao proces kojim se uklanjaju neželjene i oštećene stanice uvelike može doprinijeti smanjenju tumora. Šikonin ima sposobnost indukcije apoptoze različitim signalnim putovima. Huang i Hu (2018) dokazali su da šikonin inhibira aktivnost miR-106 koji smanjuje PTEN te da na taj način dolazi do povećanja PTEN-a i indukcije apoptoze preko signalnog puta PTEN/AKT/mTOR (Huang i Hu 2018). Apoptoza može biti inducirana i posredovana

mitohondrijskim putem ukoliko dođe do povećanja ROS-a, a dokazano je da šikonin utječe na njegovo nakupljanje čime dolazi do depolarizacije mitohondrijskog potencijala i smanjenja razine antiapoptotskih faktora Bcl-xl i Bcl-2. Sve ovo rezultira aktivacijom kaspaza i indukcijom apoptoze tumora crijeva (Liang i ostali 2017). Ovo istraživanje pokazalo je da šikonin uzrokuje cijepanje kaspaze 3, odnosno njenog nizvodnog supstrata, PARP, što potvrđuje da šikonin inducira apoptozu u tumorskim stanicama mokraćnog mjehura. Osim apoptoze šikonin može inducirati i nekroptozu. Glavni posrednici nekroptoze su RIPK3 i MLKL, a nekoliko radova je pokazalo da šikonin povećava ekspresiju ovih gena. Tako su Liu, Sun i Cao dokazali da šikonin inducira nekroptozu u tumoru nazofarinksa povećanjem ROS-a i pojačanom ekspresijom RIPK1, RIP3 i MLKL, a Ding i ostali su dokazali da šikonin potiče ekspresiju MLKL i tako inducira nekroptozu u gliomima (Ding i ostali 2019; Liu i ostali 2019). Povišene razine fosforiliranog oblika MLKL dokazane su i u ovome istraživanju na tumorskim stanicama mokraćnog mjehura. Nadalje ova dva tipa stanične smrti javljaju se u različitim vremenskim periodima te da je nekroptoza dominantan oblik s većim postotkom pozitivnih stanica na pMLKL u odnosu na ClCas 3. Također u istraživanju *in vivo* provedenom na subkutanom modelu sa stanicama MB49 dokazano je da se oba oblika stanične smrti javljaju na različitim mjestima u tkivu te da je apoptoza dominantna s povećanjem apoptotskih stanica za 300%, dok je broj nekroptotskih stanica bio uvećan za 50% (Haupt 2020). I jedna i druga stanična smrt mogu se inducirati signalnim putem TNFR čiji su posrednici RIPK1 i RIPK3. Koji oblik stanične smrti će nastupiti ovisi o razini RIPK1 i RIPK3 te o njihovoj interakciji (Chen i ostali 2017). Kako bismo utvrdili je li moguće inhibicijom određenih faktora preusmjeriti staničnu smrt koristili smo pan kaspazni inhibitor ZVAD kako bi potvrdili i inhibirali apoptozu i inhibitor proteina RIPK1, Nec1s kojim smo htjeli spriječiti nekroptozu. Rezultati su pokazali da oba inhibitora sprječavaju djelovanje šikonina jer je postotak preživjelih stanica tretiranih sa šikoninom u kombinaciji s inhibitorima bio veći nego samo sa šikoninom. ZVAD je spriječio cijepanje kaspaze 3, dok Nec1s nije inhibirao fosforilaciju MLKL. Moguće da je razlog tome neadekvatna koncentracija Nec1s te bi u daljnjim eksperimentima trebalo povećati i prilagoditi koncentraciju istog. Wang i ostali dokazali su da šikonin inducira nekroptozu u T24 cisplatin rezistentnim stanicama koje su razvile otpornost na apoptozu (Wang i ostali 2018). Stoga je preusmjeravanje stanične smrti i indukcija nekroptoze od iznimnog značaja za razvoj i odabir budućih kemoterapeutika nužnih za protutumorsko djelovanje.

Oštećenja DNA, nastala endogenim (normalni fiziološki procesi mejoza ili klasne rekombinacije) ili egzogenim djelovanjem (ionizirajuće zračenje, radioterapija, kemoterapija), uzrokuju nastanak dvostrukih lomova, engl. *double stranded breaks* (DSBs) i fosforilaciju H2AX histona čiji se oblik još naziva γH2AX. Fosforilaciju vrše kinaze ATM, ATR i DNA-PK (Kuo i Yang 2008; Palla i ostali 2017). Chiu i ostali dokazali su vezu između γH2AX i indukcije apoptoze, naime blokiranjem kaspaza došlo je do smanjenja ekspresije γH2AX (Chiu i ostali 2008). Rezultati ovog istraživanja također su pokazali da su najveće razine γH2AX kada je apoptoza inducirana. Ding i ostali s druge strane dokazali su vezu između nekroptoze i γH2AX u stanicama glioma (Ding i ostali 2019). Šikonin povisuje ekspresiju MLKL što uzrokuje stvaranje mitohondrijskih superoksida i nastanak ROS-a koji onda oštećuje DNA i uzrokuje nastanak DSBs te se formira spomenuti γH2AX. Također se AIF translocira iz membrane mitohondrija u jezgru gdje se spaja s nastalim γH2AX i uzrokuje kromatolizu stanica i indukciju stanične smrti (Ding i ostali 2019).

Iz svega može se zaključiti da je šikonin novi spoj s značajnim učinkom u suzbijanju tumora. Većina radova pokazuje njegovo djelovanje na različite mehanizme u stanicama, no postavlja se pitanje kako šikonin djeluje na tumorski mikrookoliš i imunološke stanice u tumorskom mikrookolišu i tako potencijalno pospješiti imunoterapiju s anti-PD-L1. Ovisno o tome koja stanična smrt je inducirana javit će se i različit odgovor te bi se daljnja istraživanja trebala usmjeriti na djelovanje šikonina u tumorskome mikrookolišu kao stvarnom pokazatelju kemoterapeutskog potencijala ovog spoja i moguće kliničke primjene u liječenju tumora mokraćnog mjehura.

6. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Šikonin smanjuje broj tumorskih stanica ovisno o koncentraciji, broju nasijanih stanica i o dostupnosti ukupnog broja molekula šikonina kojima su stanice tretirane.
2. Šikonin zaustavlja staničnu proliferaciju.
3. Šikonin inducira dvije vrste stanične smrti - apoptozu i nekroptozu u tumorskim stanicama mokraćnog mjehura koje se aktiviraju u različito vrijeme, a dominantno je inducirana nekroptozu.
4. Inhibitori Nec1s i ZVAD smanjuju djelovanje šikonina, a ZVAD u potpunosti inhibira apoptozu te povećava nekroptozu.

7. Literatura

- Albertó, Marina, Hector Adrián Cuello, Cynthia Anabella Gulino, Marina Pifano, Denise Belgorosky, Mariano Rolando Gabri, Ana María Eiján, i Valeria Inés Segatori. 2019. „Expression of bladder cancer-associated glycans in murine tumor cell lines“. *Oncology Letters* 17(3):3141–50.
- Antoni, Sebastien, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Ariana Znaor, Ahmedin Jemal, Freddie Bray, i James Catto. 2016. „Bladder Cancer Incidence and Mortality : A Global Overview and Recent Trends“. *European Urology* 1–13.
- Bergsbaken, Tessa, Susan L. Fink, i Brad T. Cookson. 2009. „Pyroptosis: Host cell death and inflammation“. *Nature Reviews Microbiology* 7(2):99–109.
- Bhanvadia, Sumeet K. 2018. „Bladder Cancer Survivorship“. *Current Urology Reports* 19(12).
- Boulos, Joelle C., Muhammad Rahama, Mohamed Elamir F. Hegazy, i Thomas Efferth. 2019. „Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy“. *Cancer Letters* 459(January):248–67.
- Bubeník, J., M. Barešová, V. Viklický, J. Jakoubková, H. Sainerová, i J. Donner. 1973. „Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen“. *International Journal of Cancer* 11(3):765–73.
- Chen, Congying, Wenqin Xiao, Li Huang, Ge Yu, Jianbo Ni, Lijuan Yang, Rong Wan, i Guo Yong Hu. 2017. „Shikonin induces apoptosis and necroptosis in pancreatic cancer via regulating the expression of RIP1/RIP3 and synergizes the activity of gemcitabine“. *American Journal of Translational Research* 9(12):5507–17.
- Chen, Fanghong, Guangjian Zhang, Yanli Cao, Martin J. Hessner, i William A. See. 2009. „MB49 Murine Urothelial Carcinoma: Molecular and Phenotypic Comparison to Human Cell Lines as a Model of the Direct Tumor Response to Bacillus Calmette-Guerin“. *Journal of Urology* 182(6):2932–37.
- Chiu, Shu Jun, Jui I. Chao, Yi Jang Lee, i Tzu Sheng Hsu. 2008. „Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells“. *Toxicology Letters* 179(2):63–70.
- Ding, Ye, Chuan He, Shan Lu, Xuanzhong Wang, Chongcheng Wang, Lei Wang, Ji Zhang, Meihua Piao, Guangfan Chi, Yinan Luo, Ke Sai, i Pengfei Ge. 2019. „MLKL contributes to shikonin-induced glioma cell necroptosis via promotion of chromatinolysis“. *Cancer Letters* 467(September):58–71.
- Dixon, Scott J., Kathryn M. Lemberg, Michael R. Lamprecht, Rachid Skouta, Eleina M. Zaitsev, Caroline E. Gleason, Darpan N. Patel, Andras J. Bauer, Alexandra M. Cantley, Wan Seok Yang, Barclay Morrison, i Brent R. Stockwell. 2012. „Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death“. *Cell* 149(5):1060–72.
- Farling, Kristen Burns. 2017. „Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management“. *Nurse Practitioner* 42(3):26–33.
- Green, Douglas R., i Fabien Llambi. 2015. „Cell death signaling“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(12):1–24.
- Hamann, Jens C., Alexandra Surcel, Ruoyao Chen, Carolyn Teragawa, John G. Albeck, Douglas N. Robinson, i Michael Overholtzer. 2017. „Entosis Is Induced by Glucose Starvation“. *Cell Reports* 20(1):201–10.
- Haupt, Benedikt E. 2020. „The role of necroptosis in bladder cancer“.
- Huang, Caimei, i Guohua Hu. 2018. „Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway“. *Bioscience Reports* 38(2):1–13.

- Kim, Hyo Jin, Ki Eun Hwang, Do Sim Park, Seon Hee Oh, Hong Young Jun, Kwon Ha Yoon, Eun Taik Jeong, Hak Ryul Kim, i Young Suk Kim. 2017. „Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells“. *Journal of Translational Medicine* 15(1):1–12.
- Kiraz, Yağmur, Aysun Adan, Melis Kartal Yandim, i Yusuf Baran. 2016. „Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis“. *Tumor Biology* 37(7):8471–86.
- Kirkali, Ziya, Theresa Chan, Murugesan Manoharan, Ferran Algaba, Christer Busch, Liang Cheng, Lambertus Kiemeney, Martin Kriegmair, R. Montironi, William M. Murphy, Isabell A. Sesterhenn, Masaaki Tachibana, i Jeff Weider. 2005. „Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis“. *Urology* 66(6 SUPPL. 1):4–34.
- Kuo, Linda J., i Li Xi Yang. 2008. „ γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks“. *In Vivo* 22(3):305–10.
- Liang, Wenquan, Jianxin Cui, Kecheng Zhang, Hongqing Xi, Aizhen Cai, Jiyang Li, Yunhe Gao, Chong Hu, Yi Liu, Yixun Lu, Ning Wang, Xiaosong Wu, Bo Wei, i Lin Chen. 2017. „Shikonin induces ROS-based mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer“. *Oncotarget* 8(65):109094–106.
- Lin, Kuo Hua, Ming Yii Huang, Wei Chung Cheng, Shu Chi Wang, Shih Hua Fang, Hung Pin Tu, Chia Cheng Su, Yung Li Hung, Po Len Liu, Chi Shuo Chen, Yu Ting Wang, i Chia Yang Li. 2018. „RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment“. *Scientific Reports* 8(1):1–11.
- Liu, Tiancong, Xun Sun, i Zhiwei Cao. 2019. „Shikonin-induced necroptosis in nasopharyngeal carcinoma cells via ROS overproduction and upregulation of RIPK1/RIPK3/MLKL expression“. *OncoTargets and Therapy* 12:2605–14.
- Martinez Rodriguez, Roberto Hugo, Oscar Buisan Rueda, i Luis Ibarz. 2017. „Bladder cancer: Present and future“. *Medicina Clínica (English Edition)* 149(10):449–55.
- Meng, Mao Bin, Huan Huan Wang, Yao Li Cui, Zhi Qiang Wu, Yang Yang Shi, Nicholas G. Zaorsky, Lei Deng, Zhi Yong Yuan, You Lu, i Ping Wang. 2016. „Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy“. *Oncotarget* 7(35):57391–413.
- Najafov, Ayaz, Hongbo Chen, i Junying Yuan. 2017. „Necroptosis and Cancer“. *Trends in Cancer* 3(4):294–301.
- Nayak, S. K., Carol O'Toole, i Z. H. Price. 1977. „A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder“. *British Journal of Cancer* 35(2):142–51.
- Palla, Viktoria-varvara, Georgios Karaolanis, Ioannis Katafigiotis, Ioannis Anastasiou, Paul Patapis, Dimitrios Dimitroulis, i Despoina Perrea. 2017. „gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor?“
- Peng, Chiung Chi, Kuan Chou Chen, Robert Y. Peng, Ching Hua Su, i Hsiu Mei Hsieh-Li. 2006. „Human urinary bladder cancer T24 cells are susceptible to the Antrodia camphorata extracts“. *Cancer Letters* 243(1):109–19.
- Qin, Xia, Dan Ma, Ye xiong Tan, Hong yang Wang, i Zhenyu Cai. 2019. „The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword?“ *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1871(2):259–66.
- Tang, Jian cai, Yong Gang Ren, Jia Zhao, Feng Long, Jian ye Chen, i Zhen Jiang. 2018. „Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway“. *Life Sciences* 204(2017Tang, J. cai, Ren, Y. G., Zhao, J., Long, F., Chen, J. ye, Jiang, Z. (2018). Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway. *Life Sciences*, 204(2017),):71–77.
- Tang, Jian Cai, Jia Zhao, Feng Long, Jian Ye Chen, Bo Mu, Zhen Jiang, Yonggan Ren, i Jian

- Yang. 2018. „Efficacy of Shikonin against esophageal cancer cells and its possible mechanisms in vitro and in vivo“. *Journal of Cancer* 9(1):32–40.
- Vandever, Amanda J., Jonathan K. Fallon, Robert Tighe, Helen Sabzevari, Jeffrey Schlom, i John W. Greiner. 2018. „Systemic Immunotherapy of Non–Muscle Invasive Mouse Bladder Cancer with Avelumab, an Anti–PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor“. *Physiology & behavior* 176(5):139–48.
- Wang, Fangfang, Xinsheng Yao, Youwei Zhang, i Jinshan Tang. 2019. „Synthesis, biological function and evaluation of Shikonin in cancer therapy“. *Fitoterapia* 134(January):329–39.
- Wang, Yonggang, Fangshi Hao, Yonghao Nan, Licheng Qu, Wanli Na, Chunshu Jia, i Xiaoliang Chen. 2018. „PKM2 inhibitor shikonin overcomes the cisplatin resistance in bladder cancer by inducing necroptosis“. *International Journal of Biological Sciences* 14(13):1883–91.
- Watt, Rosemary C. 1986. „Bladder Cancer: Etiology and Pathophysiology“. 2(4):256–59.
- Zhu, Fang, Wei Zhang, Tao Yang, i Su-dan He. 2019. „Complex roles of necroptosis in cancer *“. 20(5):399–413.
- Zhu, Fang, Wei Zhang, Tao Yang, i Su dan He. 2019. „Complex roles of necroptosis in cancer“. *Journal of Zhejiang University: Science B* 20(5):399–413.
- Zuiverloon, Tahlita C. M., Florus C. De Jong, James C. Costello, i Dan Theodorescu. 2018. „Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines“. *Bladder Cancer* 4(2):169–83.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime Karla Svaguša
Datum rođenja 04/05/1994
Adresa Put Tršćenice 9, Split

Obrazovanje:

2017 - 2021 **Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija; modul Fiziologija i imunobiologija**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (PMF),
Biološki odsjek, Zagreb (Hrvatska)

2014 - 2017 **Preddiplomski studij Nutricionizma**

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet (PMF), Split
(Hrvatska)

Iskustvo:

07/2020 – 05/2021 **Izrada diplomskog rada**

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (MEFST), Katedra za
imunologiju i medicinsku genetiku

Tema: Indukcija apoptoze i nekroptoze u stanicama tumora mokraćnog
mjehura pod utjecajem šikonina

Mentorica: Doc. dr. sc. Jelena Korać Prlić (MEFST)

Komentorica: Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić (PMF)

02/2019 – 10/2019 **Erasmus+ stručna praksa**

Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Laboratorij za imunologiju i
onkologiju; Istraživačka grupa: Identifikacija aktivacijskih i
apoptotičkih regulatora specifičnih za kontrolu autoimune T stanične
memorije i upale.

Voditelj: Dr. sc. Dimitrios Balomenos

03/2018 – 06/2018 **Laboratorijska stručna praksa**

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju

Voditelj: Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Dodatno:

2020 **HDBMB radionica: Better skills for better jobs: Excellent lab book for an excellent career**, Zagreb

2019 **Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; LabAnim A kategorija**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2018 **Znanstvena manifestacija "Noć biologije"**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb

2018 **Simpozij studenata bioloških usmjerenja (SISB)**, Zagreb

Jezici:

- Hrvatski jezik (materinski)
- Engleski jezik (aktivno u govoru i pismu)
- Španjolski jezik (pasivno u govoru i pismu)