

# Antitumorsko djelovanje niklozamida na stanice tumora mokraćnog mjehura

---

Domjanović, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:198625>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Tina Domjanović

**Antitumorsko djelovanje niklozamida na  
stanice tumora mokraćnog mjehura**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Tina Domjanović

**The antitumor effect of niclosamide on  
bladder cancer cells**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje raka na Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jelene Korać Prlić te komentorstvom izv. prof. dr. dc. Inge Urlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Antitumorsko djelovanje niklozamida na stanice tumora mokraćnog mjehura

Tina Domjanović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tumor mokraćnog mjehura deseti je najčešće dijagnosticirani oblik tumora u svijetu s jako visokom stopom recidiva i niskom stopom preživljenja. Tradicionalne terapije najčešće imaju teške nuspojave, a pacijenti gotovo uvijek razviju otpornost na liječenje. Niklozamid je antiparazitski lijek koji se koristi za liječenje bolesti uzrokovanih trakavicama. Kod nekoliko tipova tumora pokazano je njegovo antitumorsko djelovanje induciranjem apoptoze i inhibicijom nekoliko signalnih puteva, kao što su WNT/CTNNB1, mTORC1, STAT3, NFκB, Notch i Hedgehog. Budući da su njegove nuspojave i utjecaj na organizam već dijelom istraženi, preusmjerenje niklozamida prema liječenju tumora bilo bi kraće i jednostavnije od razvoja novog lijeka. Cilj mog diplomskog rada bio je ispitati mehanizme antitumorskog djelovanja niklozamida na stanice tumora mokraćnog mjehura; inducira li apoptozu i kakve učinke ima na staničnu proliferaciju. Metodom *western blot* analizirala sam ekspresiju proteina, a protočnom citometrijom apoptozu i stanični ciklus. Rezultati pokazuju da niklozamid inducira apoptozu i zaustavlja proliferaciju stanica tumora mokraćnog mjehura. Stoga, niklozamid u kombinaciji s postojećim lijekovima može imati potencijal za liječenje tumora mokraćnog mjehura.

Ključne riječi: apoptoza, stanični ciklus, anthelmintik  
(34 stranice, 12 slika, 65 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić  
Komentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:  
izv. prof. dr. sc. Inga Urlić  
prof. dr. sc. Nada Oršolić  
izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 12.01.2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### The antitumor effect of niclosamide on bladder cancer cells

Tina Domjanović

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bladder cancer is the 10th most common cancer worldwide, with a very high recurrence rate and low survival rate. Traditional therapies often cause unpleasant side effects, and patients develop drug resistance. Niclosamide is an antiparasitic medication that has been used for many years to treat tapeworm infestations. In several types of tumors, niclosamide has been reported to exhibit antitumor effects by inducing apoptosis and inhibiting several signaling pathways, such as WNT/CTNNB1, mTORC1, STAT3, NFκB, Notch, and Hedgehog. As its adverse effects have been partially investigated, repurposing niclosamide as a treatment for cancer would be less time-consuming and less complicated than the development of a new drug. The aim of my master thesis was to examine the mechanisms of the antitumor activity of niclosamide on bladder cancer cells; does it induce apoptosis and what effects does it have on cell proliferation. Protein expression was analyzed by western blotting, apoptosis analysis, and cell cycle analysis using flow cytometry. These results demonstrate that niclosamide induces apoptosis and inhibits the proliferation of bladder cancer cells. Therefore, niclosamide in combination with existing drugs may have the potential to treat bladder tumors.

Keywords: apoptosis, cell cycle, anthelmintic  
(34 pages, 12 figures, 65 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Jelena Korać Prlić, PhD  
Co-mentor: Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

#### Reviewers:

Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD  
Prof. Nada Oršolić, PhD  
Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: 12.01.2023.

# SADRŽAJ

## POPIS KRATICA

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumor mokraćnog mjehura .....	1
1.1.1 Klasifikacija .....	1
1.1.2 Liječenje .....	3
1.2 Niklozamid .....	4
1.2.1 Mehanizam djelovanja .....	4
1.2.2 Farmakokinetika i sigurnost .....	5
1.2.3 Niklozamid i tumor .....	5
1.3 Apoptoza.....	7
1.3.1 Unutarnji put apoptoze .....	7
1.3.2 Vanjski put apoptoze .....	9
1.3.3 Poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1).....	11
1.4. Stanični ciklus.....	12
1.4.1 Regulacija staničnog ciklusa .....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>15</b>
3.1. Osnovne kemikalije.....	15
3.2 Nasađivanje i tretiranje stanica .....	17
3.3 Detekcija proteina metodom <i>western blot</i> .....	17
3.4 Analiza stanične smrti i staničnog ciklusa protočnom citometrijom.....	18
3.4.1 Detekcija stanica u apoptozi.....	18
3.4.2 Određivanje staničnog ciklusa .....	19
3.5 Statistika .....	19
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>20</b>
4.1 Citotoksični učinak niklozamida na stanice.....	20
4.2 Niklozamid inducira apoptozu stanica tumora mokraćnog mjehura .....	22
4.3 Niklozamid zaustavlja proliferaciju stanica tumora mokraćnog mjehura .....	24
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>28</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>36</b>

## **POPIS KRATICA**

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

**ddH<sub>2</sub>O** - redestilirana voda, engl. *Double distilled water*

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

**DMSO** - dimetilsulfoksid

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

**NCA** - niklozamid

**PARP1** – poli(ADP-riboza) polimeraza 1

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

**PI** – propidij jodid



## 1. UVOD

### 1.1 Tumor mokraćnog mjehura

Tumor mokraćnog mjehura druga je najčešća maligna bolest mokraćno-spolnog sustava (Bhanvadia, 2018). U svijetu je deseti najčešće dijagnosticiran tumor, s prosječno 573 000 novih i 213 000 smrtnih slučajeva godišnje (Sung i sur., 2021). U Hrvatskoj je u 2020. godini broj novodijagnosticiranih bolesnika bio 1398, od čega 1048 muškaraca i 350 žena, čineći ga kod muškaraca četvrtim najčešćim zloćudnim tumorom (Globocan).

Pokazano je da ima veću incidenciju pojave u zemljama s višim indeksom ljudskog razvoja (engl. *Human Development Index*, HDI), a smatra se da je povezana s konzumacijom duhana i većom izloženošću kemikalijama iz industrijskih postrojenja. Duhan je odgovoran za oko 50-65% novodijagnosticiranih slučajeva te povećava rizik od obolijevanja tri do četiri puta. Duhanski dim sadrži karcinogene beta-naftilamin i policiklične aromatske ugljikohidrate čiji metaboliti vezanjem za DNA uzrokuju genske mutacije i promoviraju karcinogenezu. Izloženost karcinogenima povezanim s industrijskom proizvodnjom, kao što su aromatski amini, policiklički aromatski ugljikohidrati i klorirani ugljikohidrati, odgovorna je za 18% slučajeva tumora mokraćnog mjehura (Saginala i sur., 2020).

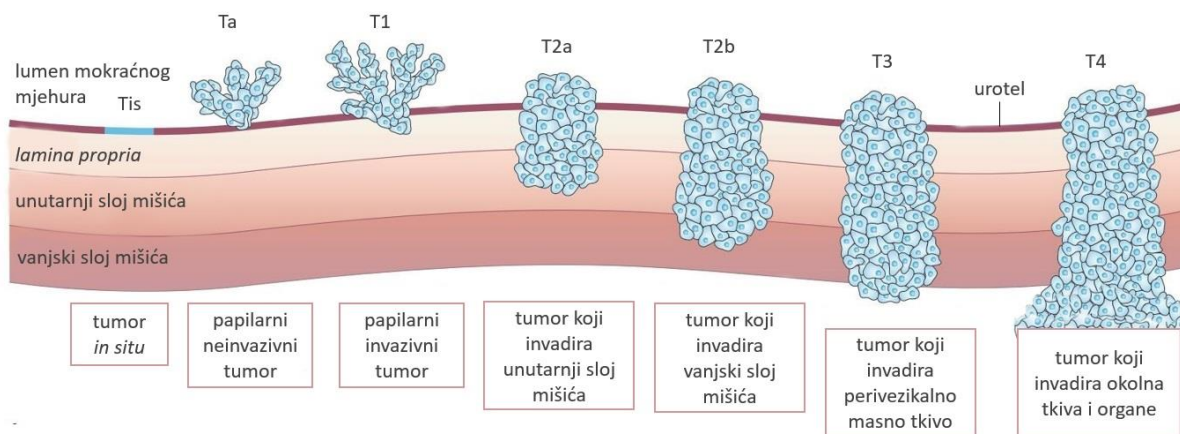
Većina tumora mokraćnog mjehura (90%) potječe od prijelaznih epitelnih stanica (urotelni oblik). Ostali tipovi su karcinom pločastih stanica (5%), adenokarcinom (2%) te sarkomi i neuroendokrini tumori (3%) (Omar i sur., 2010).

#### 1.1.1 Klasifikacija

Ovisno o tome invadira li glatki mišić unutar stijenke mokraćnog mjehura, postoji tip tumora s invazijom u mišićno tkivo (engl. *muscle-invasive bladder cancer*; MIBC) i tip tumora bez invazije u mišićno tkivo (engl. *non-muscle-invasive bladder cancer*; NMIBC). Tumori bez invazije u mišićno tkivo čini 70% dijagnosticiranih tumora mokraćnog mjehura, a obuhvaća tumor *in situ*, papilarne neinvazivne tumore i papilarne tumore koji invadiraju subepitelno vezivno tkivo. Manje su agresivni od tipa tumora s invazijom u mišićno tkivo, ali imaju veliku stopu recidiva zbog čega često zahtijevaju kirurško uklanjanje mokraćnog mjehura i cjeloživotno praćenje. Oko 20% tumora bez invazije u mišićno tkivo prijeđe u tip tumora s

invazijom u mišićno tkivo koji ima veću sklonost proširiti se na limfne čvorove i druge organe, što otežava liječenje i smanjuje preživljenje (engl. *overall survival*) (Patel i sur., 2020).

Tumor mokraćnog mjehura opisuje se prema sustavu TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) gdje T označava stupanj lokalne invazije, N zahvaćenost limfnih čvorova, a M prisutnost udaljenih metastaza. U mišićno neinvazivne tumore spada stadij Tis, Ta i T1, a u mišićno invazivne T2a, T2b, T3 i T4 (Knowles i sur., 2015) (slika 1).



**Slika 1. Prikaz različitih stupnjeva invazije tumora mokraćnog mjehura prema klasifikaciji TNM.** Tis (tumor *in situ*) - oblik tumora koji ne invadira u stijenku mokraćnog mjehura niti izrasta u lumen, Ta – papilarni neinvazivni tumor koji raste u lumen, T1 – papilarni tumor koji izrasta u lumen i invadira subepitelni sloj (*lamina propria*), T2-T4 – mišićno invazivni tipovi tumora (preuzeto i prilagođeno prema Knowles i sur., 2015).

Tradicionalna kliničko-patološka klasifikacija ne može detaljno opisati intrinzične karakteristike tumora što otežava individualan pristup pacijentima. Također, često tumori sa sličnim patološkim karakteristikama imaju različitu vjerojatnost recidiva i progresiju. S druge strane, molekularna klasifikacija tumora omogućava detaljan uvid u tumor na molekularnoj razini, a samim time i precizniju dijagnozu te razvoj novih ciljanih terapija. Molekularna klasifikacija tumora uglavnom se temelji na analizi transkriptoma pomoću sekvenciranja.

U svome opsežnom istraživanju Tan i sur. (2019) utvrdili su šest podtipova tumora mokraćnog mjehura; neuralni (engl. *neural-like, neural*), luminalni (engl. *luminal-like, LUM*), papilarni (engl. *papillary-like, PAP*), s ekspresijom proteina HER2 (engl. *HER2-like, HER2L*), skvamozni (engl. *squamous cell carcinoma-like, SCC*) i mezenhimski (engl. *mesenchymal-like,*

MES). Svi podtipovi izvedeni su iz dva osnovna tipa; luminalnog i bazalnog. Karakteriziraju ih jasno odvojeni profili ekspresije gena koji uvjetuju različitu sposobnost progresije tumora i različitu osjetljivost na liječenje (Tran i sur., 2021).

### 1.1.2 Liječenje

Prvi korak nakon dijagnosticiranja tumora mokraćnog mjehura je transuretralna resekcija (TUR), operativni postupak kojim se kroz mokraćnu cijev dolazi do mokraćnog mjehura i uklanjaju tumori, što osim terapijske ima i dijagnostičku ulogu. Patohistološkom analizom tkiva tumor se klasificira i određuje se vjerojatnost recidiva i progresije bolesti, prema čemu se određuje odgovarajuća terapija.

Kod tumora bez invazije u mišićno tkivo TUR je najčešće popraćen intravezikalnom terapijom. Kod bolesnika s niskim rizikom od recidiva bolesti primjenjuje se neposredna intravezikalna kemoterapija; jednokratno lokalno ukapavanje lijeka unutar 24 sata od operacije. Obično se koristi gemcitabin i mitomicin. Kod bolesnika sa srednjim i visokim rizikom od recidiva bolesti primjenjuje se intravezikalna imunoterapija cjepivom BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) koje sadrži oslabljenog uzročnika tuberkuloze. Antitumorsko djelovanje temelji se na aktivaciji imunološkog sustava, a točan mehanizam zasad nije poznat. Primjenjuje se jednom tjedno, minimalno 6 tjedana (Jazvić i sur., 2019; Larsen i sur., 2020).

Kod bolesnika s tumorom s invazijom u mišićno tkivo primjenjuje se radikalna cistektomija uz neoadjuvantnu kemoterapiju na bazi cisplatine ili TUR uz združenu primjenu kemoradioterapije – tzv. trimodalitetni pristup.

S obzirom na veliku učestalost recidiva i progresije bolesti uz postojeće terapije, sve se više pažnje pridaje imunoterapiji. Koriste se inhibitori imunoloških kontrolnih točaka; protutijela anti-PD-1 i anti-PD-L1. PD-1 je receptor eksprimiran na površini aktiviranih T i B limfocita i makrofaga, a njegov ligand PD-L1 na stanicama koje prezentiraju antigene i tumorskim stanicama. Ekspresija PD-L1 kod tumorskih stanica i njegovo vezanje za PD-1 adaptivni je mehanizam rezistencije tumorskih stanica kojim se blokira aktivnost T stanica i ostvaruje imunosupresivni učinak. Inhibitori proteina PD-1 i PD-L1 onemogućavaju njihovu interakciju i na taj način omogućuju reaktivaciju imunološkog sustava. Zasada su za liječenje tumora mokraćnog mjehura odobrena tri inhibitora PD-L1 i dva inhibitora PD-1 (Wołacewicz i sur., 2020; Ai i sur., 2020).

## 1.2 Niklozamid

Niklozamid (5 - kloro - N - (2 - kloro - 4 - nitrofenil) - 2 - hidroksi - benzamid) je halogenirani salicilanilid koji se koristi za liječenje infestacija goveđom (*Taenia saginata*), ribljom (*Diphyllobothrium latum*) i svinjskom (*Taenia solium*) trakavicom te kao moluscicid, pesticid kojim se suzbijaju puževi koji su vektori shistomijaze. Pokazao se djelotvornim i protiv patuljaste (*Hymenolepis nana*) i pasje (*Dipylidium caninum*) trakavice (Ofori-Adjei i sur., 2008; Al-Hadiya, 2005).

### 1.2.1 Mehanizam djelovanja

Niklozamid je protonski ionofor, lipofilna molekula koja ima sposobnost translokacije protona preko lipidnog dvosloja čime narušava membranski potencijal. Nije poznat točan mehanizam njegovog antiparazitskog djelovanja, ali je pokazano da se nakon samo 10 minuta izloženosti klozantelu, srodnom salicilanilidu, pH tegumenta parazita značajno snizi (Pax i Bennet, 1989). U istraživanju provedenom na trakavicama pokazano je da nikozamid reducira unos glukoze u organizam, što se također smatra jednim od mogućih mehanizama njegova antihelminskog djelovanja (Pampori i sur., 1984; Riviere i Papich, 2013).

Kao protonski ionofor ima mogućnost inhibiranja oksidativne fosforilacije i proizvodnje ATP-a. Oksidativna fosforilacija je proces prijenosa elektrona s molekula NADH ili FADH preko niza proteinskih kompleksa do konačnog elektron akceptora, molekule kisika. Tijekom tih redoks reakcija dolazi do oslobađanja energije koja se koristi za pumpanje vodikovih iona iz mitohondrijskog matriksa u međumembranski prostor. Na taj način stvara se elektrokemijski gradijent koji predstavlja izvor energije za sintezu ATP-a pomoću enzima ATP sintaze. Niklozamid translokacijom protona narušava nastali proteinski gradijent čime oksidacija molekula NADH i FADH više nije povezana s proizvodnjom ATP-a (Martin, 1997).

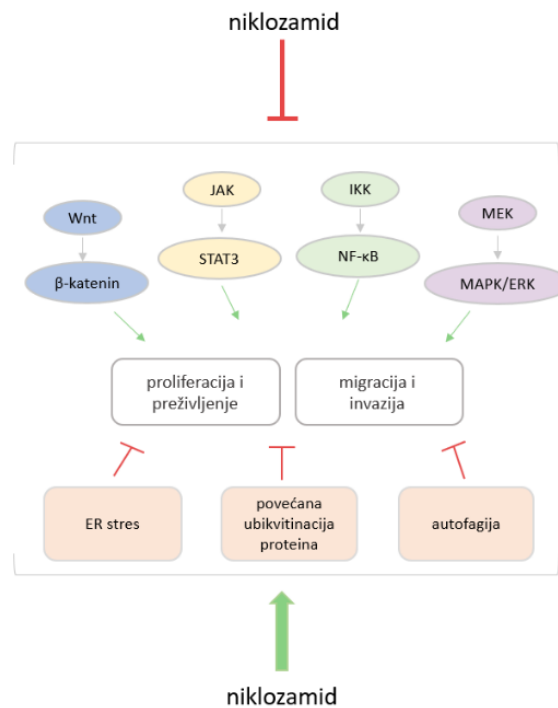
Prilikom primjene niklozamida, dolazi do uništenja skoleksa, prednjeg dijela tijela trakavice kojim se prihvaća za crijevo domaćina te proksimalnih segmenata trakavice. Na taj se način skoleks otpušta od stijenke crijeva te potpuno razgrađuje u tankome crijevu (Al-Hadiya, 2005), dok se dio parazita eliminira fecesom (Vinaud i De Souza Lino Junior, 2017).

### **1.2.2 Farmakokinetika i sigurnost**

Niklozamid se primjenjuje oralno, najčešće u jednokratnoj dozi od 2 g za odraslu osobu i 1-1,5 g za djecu. Metabolizira se brzo; prvo dolazi do nitroredukcije, a zatim do N-acetilacije. Budući da se samo mala količina primljene doze apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, nuspojave niklozamida su blage, a uključuju probavne smetnje, bol u abdomenu, dijareju, mučninu, malaksalost. Nisu zabilježeni slučajevi trovanja, dugotrajnih nuspojava i smrti (Hollingworth, 2001).

### **1.2.3 Niklozamid i tumor**

Niklozamid je pokazao inhibitorni učinak na staničnu proliferaciju (Liao i sur., 2015), epitelno-mezenhimsku tranziciju (Liu i sur., 2016), migraciju i invaziju (Yeh i sur., 2022) kod više tipova tumorskih stanica. Također je pokazano da inducira autofagiju, stres endoplazmatskog retikuluma i ubikvitinaciju proteina (Cheng i sur., 2017). Dokazano je da utječe na regulaciju nekoliko bitnih signalnih puteva, kao što su STAT3 (Ren i sur., 2010), mTORC1 (Balgi i sur., 2009), Wnt/frizzled 1 (Chen i sur., 2009), Notch (Suliman i sur., 2016), MAPK/ERK (Yeh i sur., 2022) i NF- $\kappa$ B (Jin i sur., 2010) (slika 2).



**Slika 2. Shematski prikaz djelovanja niklozamida na signalne puteve i stanične procese.** Niklozamid inhibira signalne puteve koji promoviraju proliferaciju, preživljenje, migraciju i invaziju tumorskih stanica, a aktivira procese koji dovode do zaustavljanja proliferacije i stanične smrti (prilagođeno prema Cheng i sur. 2017).

Niklozamid povećava osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju i radioterapiju (Lee i sur., 2020) što znači da bi njihova kombinacija s niklozamidom omogućila smanjenje potrebne doze kemoterapeutika i zračenja, a samim time i blaže nuspojave.

Glavni nedostatak niklozamida je njegova niska oralna bioraspodjelivost (10%) i jako slaba topljivost u vodi što može ograničiti njegovu efikasnost u djelovanju protiv tumorskih stanica. Međutim, taj problem bi se mogao zaobići sintezom topljivih derivata niklozamida, kao što je B17 koji je pokazao sličan antitumorski učinak na stanicama urotelnih tumora (Wu i sur., 2018).

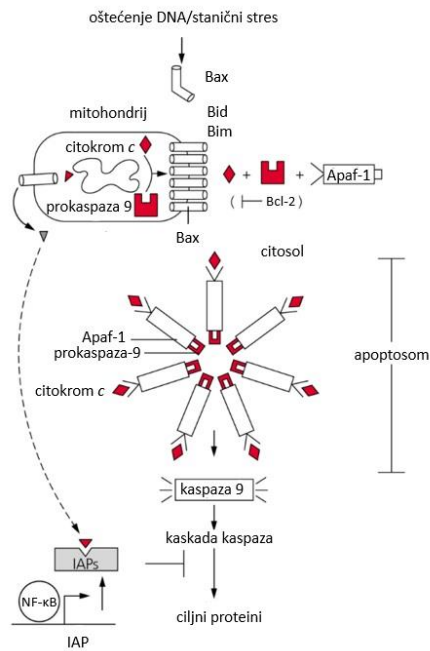
Trenutno su u tijeku četiri klinička istraživanja o upotrebi niklozamida u liječenju tumora debelog crijeva i prostate (Chen i sur., 2018).

## 1.3 Apoptoza

Apoptoza je oblik programirane stanične smrti čija je uloga održavanje konstantnog broja stanica u organizmu i uklanjanje nepotrebnih i štetnih stanica. Ukoliko je proces apoptoze poremećen, može doći do pojave tumora, raznih neurodegenerativnih, autoimunih i drugih bolesti. Postoje dva puta izvršenja apoptoze - unutarnji i vanjski, a oba završavaju aktivacijom kaspaza i morfološkim promjenama kao što su kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA i jezgre, degradacija proteina, gubitak međustaničnog kontakta, stvaranje apoptotskih tjelešaca i njihova fagocitoza (Kiraz i sur., 2016).

### 1.3.1 Unutarnji put apoptoze

Razni oblici staničnog stresa, kao što su UV i gama zračenje, kemoterapeutici, hipoksija, nedostatak faktora rasta i virusne infekcije mogu inducirati unutarnji put apoptoze. Hoće li doći do apoptoze ovisi o ravnoteži proapoptotskih i antiapoptotskih faktora koji pripadaju skupini proteina porodice Bcl-2. Među antiapoptotske proteine porodice Bcl-2 spadaju Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 i Bcl-2A1, a svoje djelovanje ostvaruju održavajući integritet mitohondrijske membrane te inhibirajući aktivnost proapoptotskih proteina Bcl-2. Proapoptotski proteini porodice Bcl-2 mogu se podijeliti u dvije skupine; skupina Bax kojoj pripadaju proteini s tri domene BH (engl. *Bcl-2 homology*) (BH1, BH2 i BH3) (Bax, Bak, Bok) i proteini samo s jednom domenom BH3 (Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa, Hrk). Kada je stanica izložena staničnom stresu, proteini s domenom BH3 pokreću unutarnji put apoptoze. To ostvaruju tako da aktiviraju proteine Bax na dva načina: njihovim vezanjem i izravnom aktivacijom ili vezanjem i inhibiranjem antiapoptotskih proteina. Kada se aktiviraju, Bax proteini se povezuju u oligomere i tvore pore u vanjskoj mitohondrijskoj membrani, čineći je permeabilnom. Na taj način dolazi do otpuštanja citokroma *c*, proteina Smac/DIABLO i endonukleaze G iz mitohondrija u citosol. Spajanjem citokroma *c*, prokaspaze-9 i adaptora Apaf-1 nastaje apoptosom koji aktivira kaspazu-9 nakon čega ona cijepa i aktivira nizvodne efektorske kaspaze (kaspazu-3 i kaspazu-7). Protein Smac veže se za skupinu proteina IAP (engl. *inhibitors of apoptosis*), a endonukleaza G je mitohondrijska nukleaza koja sudjeluje u fragmentaciji DNA neovisnoj o kaspazama (Matthews i sur., 2012; van Loo i sur., 2001) (slika 3).



**Slika 3. Prikaz unutarnjeg puta apoptoze.** Oštećenje DNA i/ili stanični stres induciraju staničnu smrt posredovanu mitohondrijima. Stvaranje pora u mitohondrijskoj membrani omogućuje translokaciju i spajanje citokroma *c* s prokaspazom-9 i proteinom Apaf-1 u apoptosom koji aktivira kaspazu 9 čime se pokreće kaskadna aktivacija ostalih kaspaza i cijepanje ostalih proteina što dovodi do apoptoze (preuzeto i prilagođeno prema Pecorino, 2012).



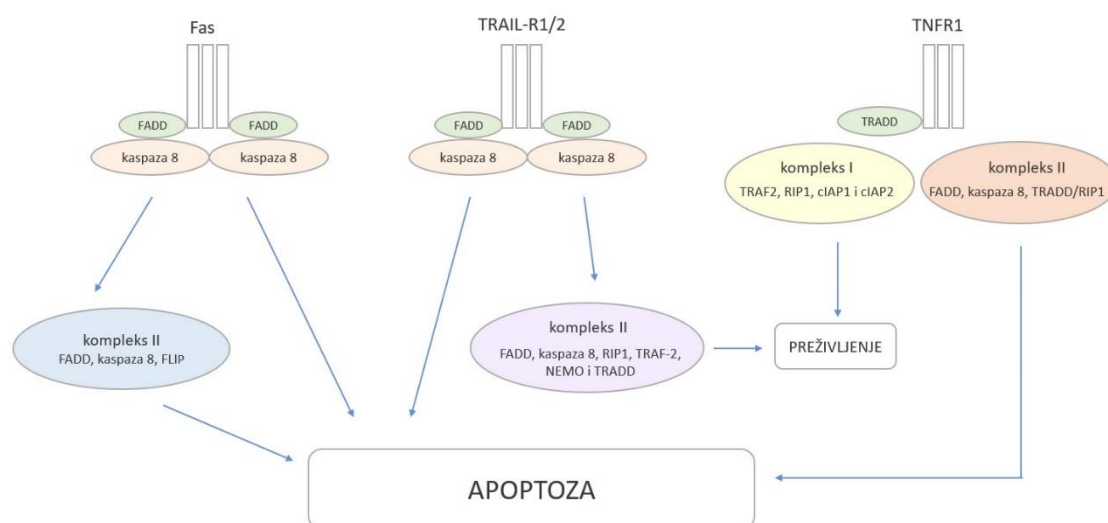
### 1.3.2 Vanjski put apoptoze

Vanjski put apoptoze uključuje receptore koji pripadaju skupini receptora TNF. Karakteriziraju ih izvanstanične domene bogate cisteinom i domena smrti (engl. *death domain*, DD) smještena u citoplazmi koju čini oko 80 aminokiselina. Domena smrti ima važnu ulogu u povezivanju vanjskog signala s unutarstaničnim signalnim putevima koji dovode do stanične smrti. Do danas su najviše proučeni Fas (CD95), TNFR1, TRAIL-R1 i TRAIL-R2 (Fulda i Debatin, 2006).

Vežanjem liganda na receptore, dolazi do njihove trimerizacije te Fas i TRAIL1/2 preko DD regrutiraju protein adaptor, FADD koji preko efektorske domene smrti (engl. *dead effector domain*, DED) regrutira prokaspazu-8. Receptor smrti (Fas ili TNFR1/2), FADD i prokaspaza-8 tvore membranski kompleks DISC. Dimerizacijom i cijepanjem katalitičke podjedinice, prokaspaza-8 prelazi u aktivni oblik kaspazu-8.

Vežanjem liganda na receptore Fas i TRAIL-R1/2 može doći i do stvaranja sekundarnog kompleksa koji nije vezan uz membranu. Aktiviran vežanjem liganda na receptor Fas, sekundarni kompleks sastoji se od FADD, c-FLIP i kaspaze-8 te ima ulogu u pojačanoj aktivaciji kaspaze. Ako je sekundarni kompleks induciran aktivacijom receptora TRAIL-R1/2 onda ga tvore FADD, kaspaza-8, RIP1, TRAF-2, NEMO i TRADD te on tada potiče stanično preživljenje preko aktivacije puta NF $\kappa$ B.

Vežanje liganda na TNFR1 primarno inducira proupalne procese koje aktiviraju imunološki sustav, preko putova JNK, p38-MAPK i NF $\kappa$ B. Nakon trimerizacije receptora, dolazi do regrutacije adaptor TRADD koji regrutira TRAF2, RIP1, cIAP1 i cIAP2 tvoreći TNFR1 membranski kompleks I koji vodi do aktivacije puta NF $\kappa$ B i preživljenja. Aktivacija receptora TNFR1 može dovesti i do stvaranja sekundarnih kompleksa IIA i IIB koji dovode do apoptoze. Kompleks IIA sastoji se od adaptor TRADD, FADD i kaspaze-8, a kompleks IIB od adaptor FADD, RIP1 i kaspaze-8 (Dickens i sur., 2012) (slika 4).



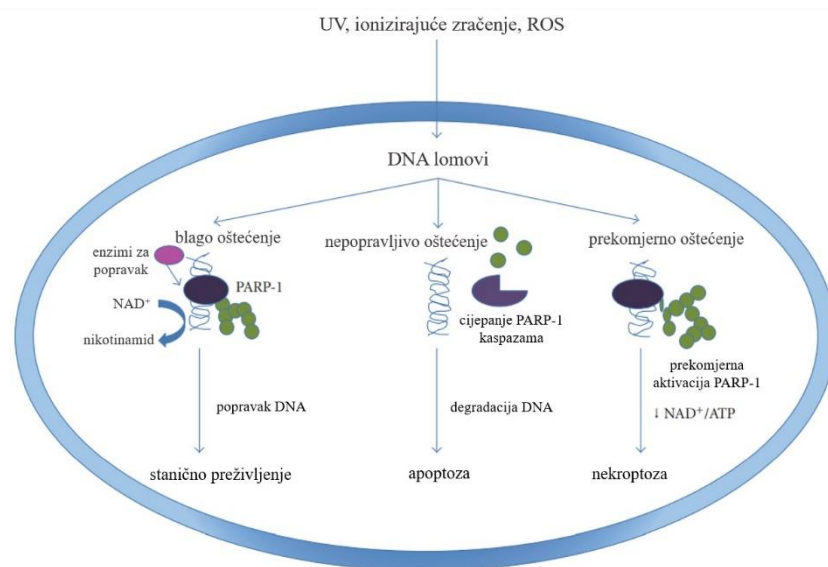
**Slika 4. Prikaz vanjskog puta apoptoze.** Vezanjem liganda na receptore dolazi do njihove trimerizacije. Receptor Fas preko adaptora FADD regrutira prokaspazu 8 (kompleks DISC) ili protein FLIP (sekundarni kompleks) što dovodi do aktivacije kaspaze 8 i izvršenja apoptoze. Trimerizacijom receptora TRAIL-R1/2 može doći do nastanka kompleksa DISC i apoptoze ili sekundarnog kompleksa (FADD, kaspaza 8, RIP1, TRAF-2, NEMO, TRADD) koji potiče stanično preživljenje. Trimerizacijom receptora TNFR1 preko adaptora TRADD dolazi do stvaranja kompleksa I (RIP1, TRAF2, cIAP1/2) koji potiče preživljenje. Ukoliko nastane sekundarni kompleks (FADD, kaspaza 8, TRADD/RIP1) dolazi do apoptoze (prilagođeno prema Dickens i sur., 2012).

Osim prokaspaze-8, pomoću proteina FADD može biti regrutirana i prokaspaza-10. Glavna uloga kompleksa DISC i kompleksa IIA i IIB je aktivacija inicijatorskih kaspaza; prokaspaze-8 ili prokaspaze-10 koje prelaze u aktivni oblik i cijepaju svoje supstrate, što posljedično dovodi do apoptoze (Dickens i sur., 2012).

Unutarnji i vanjski put apoptoze povezani su preko proteina Bid kojeg, nakon aktivacije receptora smrti kaspaza-8 cijepa te se on translocira na membranu mitohondrija i uzrokuje njegovu permeabilnost i pokretanje unutarnjeg puta apoptoze (Fulda i Debatin, 2006). Oba signalna puta rezultiraju cijepanjem kaspaze-3 što uzrokuje čitav niz nizvodnih reakcija uključujući fragmentaciju DNA, degradaciju citoskeletnih i jezgrenih proteina, stvaranje apoptotskih tjelešaca i fagocitozu (Obeng i sur., 2007).

### 1.3.3 Poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1)

Poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1) je jezgreni protein koji uz prisutnost  $\text{NAD}^+$  katalizira dodavanje ADP-ribozil lanaca na jezgrene proteine, uključujući i njega samog. Na taj način mijenja aktivnost, strukturu i/ili lokaciju proteina akceptora, što utječe na razne stanične procese kao što su detekcija i popravak DNA, replikacija DNA, transkripcija, ekspresija gena i stanična smrt (Mashimo i sur., 2021). PARP1 je jedan od supstrata kaspaze-3 i kaspaze-7. Ukoliko dođe do oštećenja DNA, aktivirat će se enzimi za popravak pomoću proteina PARP1 te će stanica preživjeti. Ukoliko je oštećenje veće, prekomjernom aktivnosti proteina PARP1 trošilo bi se mnogo kofaktora  $\text{NAD}^+$ , čime bi se smanjila količina ATP-a u stanici. Kako se to ne bi dogodilo, dolazi do cijepanja i inaktivacije proteina PARP1 pomoću kaspaza. Cijepa se na fragment veličine 89 kDa koji sadrži katalitičku domenu i fragment od 24 kDa koji sadrži domenu koja veže DNA. Manji fragment ostaje ireverzibilno vezan na DNA sprječavajući daljnje vezanje i aktivnost enzima za popravak DNA te stanica ide u apoptozu (Chaitanya i sur., 2010). Stoga se prisutnost pocijepane forme proteina PARP1 smatra markerom apoptoze. Ukoliko je oštećenje DNA preveliko, doći će do prekomjerne aktivacije proteina PARP1, količina kofaktora  $\text{NAD}^+$  i ATP-a će se značajno smanjiti te će nastupiti nekroptoza kao oblik stanične smrti (slika 5).



**Slika 5. Stanični odgovor na oštećenje DNA.** Kod oštećenja koje se može popraviti doći će do aktivacije proteina PARP1 i enzima za popravak, a kod većih oštećenja može doći do cijepanja proteina PARP1 i apoptoze ili njegove prekomjerne aktivacije i nekroptoze, ovisno o intenzitetu oštećenja (preuzeto i prilagođeno prema Surjana i sur., 2010).

## 1.4. Stanični ciklus

Kod eukariota stanični ciklus podrazumijeva strogo regulirani slijed događaja koji dovodi do udvostručavanja stanice. Stanični ciklus čine faza M i interfaza koja se sastoji od faze G1, S i G2. Faza G1 (engl. *gap 1*) je razdoblje između mitoze i replikacije DNA, kada je stanica metabolički aktivna i raste. U fazi G1 stanica odlučuje hoće li nastaviti stanični ciklus i ići u diobu ili će izaći iz staničnog ciklusa i ući u fazu G0. U fazi S se udvostručuje DNA nakon čega slijedi faza G2 (engl. *gap 2*) u kojoj se sintetiziraju proteini potrebni za mitozu te se nastavlja stanični rast, nakon čega slijedi faza M koja uključuje mitozu i citokinezu (Morgan, 2007).

U odraslom tkivu većina stanica je u fazi G0, odnosno u mirovanju. Stanica u fazi G0 može biti privremeno ili trajno - odlazak u terminalnu diferencijaciju ili senescenciju. Stanica koja je privremeno u fazi G0 uz prisustvo mitogenih faktora (hormona ili faktora rasta) može ponovno ući u stanični ciklus.

Pravilno napredovanje staničnog ciklusa osiguravaju kontrolne točke. Kontrolna točka u fazi G1 osigurava da stanica ne uđe u fazu S ukoliko je DNA oštećena, kontrolna točka u fazi G2 omogućava ulazak u fazu M samo ukoliko je DNA potpuno i pravilno replicirana, dok se u fazi M provjerava vezanje kromosoma za diobeno vreteno i njihova raspodjela u metafaznoj ploči (Cooper i Hausman, 2009).

### 1.4.1 Regulacija staničnog ciklusa

U regulaciji staničnog ciklusa glavnu ulogu imaju ciklini i kinaze ovisne o ciklinima (engl. *cyclin dependent kinases*, CDK). Kompleks ciklina i kinaza aktivira se mitogenim signalima, a inhibira aktivacijom kontrolnih točaka. Kinaze čine katalitičku podjedinicu, a ciklini regulatornu podjedinicu heterodimernog kompleksa. Oscilacije u aktivnosti kinaza posljedica su promjene količine ciklina. Budući da je količina određenog ciklina izravno povezana s odgovarajućom fazom staničnog ciklusa, formiranje različitih kompleksa ciklina i kinaza odvija se periodično. Kod ljudi je poznato 20 CDK i 29 ciklina (Ding i sur., 2020).

Kako bi stanica iz faze G0 ili G1 ušla u fazu S, potrebna je aktivacija CDK4/6 koja je pozitivno regulirana vezanjem ciklina D (D1, D2, D3). Kompleks ciklina D1 i CDK4/6 promovira progresiju kroz stanični ciklus tako da fosforilira protein Rb čime on više ne inhibira transkripcijski faktor E2F koji inducira transkripciju gena potrebnih za ulazak u fazu S, kao što

je CCNE (ciklin E). Ukoliko je prisutan genotoksični stres, ciklin D1 se degradira i stanični ciklus se zaustavlja u fazi G1 (Agami i Bernards, 2000). Tijekom kasne faze G1 ciklini E1 i E2 vežu kinazu CDK2. Fosfataza CDC25A defosforilacijom aktivira CDK2 što omogućava prelazak iz faze G1 u fazu S. Aktivna CDK2 fosforilira niz proteina potrebnih za napredovanje kroz stanični ciklus, replikaciju DNA, sintezu centrosoma i histona. Krajem faze S ciklin A ulazi u kompleks s CDK2, a ciklin E se degradira. Kompleks ciklina A i CDK2 fosforilira CDC6 i E2F1 što označava završetak faze S i ulazak u fazu G2 (Ding i sur., 2020). Tijekom faze G2 sintetizira se ciklin B koji stvara kompleks s CDK1. Kompleks ciklina B i CDK1 ključan je za prelazak iz faze G2 u M, a aktivira se defosforilacijom pomoću fosfataze CDC25. Aktivna kinaza CDK1 fosforilira brojne proteine koji potiču procese potrebne za inicijaciju mitoze kao što su kondenzacija kromatina, raspadanje jezgrine ovojnice i stvaranje diobenog vretena. Aktivnost CDK1 potiče proteolitičku razgradnju ciklina B što inaktivira CDK1, odnosno uzrokuje izlazak stanice iz mitoze i povratak u interfazu (Cooper i Hausman, 2009).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi mehanizme antitumorskog djelovanja niklozamida na stanične linije T24, 5637 i RT4.

Hipoteza istraživanja je da niklozamid u tumorskim staničnim linijama T24, 5637 i RT4 pokazuje antitumorsko djelovanje inducirajući apoptozu i zaustavljajući staničnu proliferaciju.

Stanice će tretirati različitim koncentracijama niklozamida, ovisno o staničnoj liniji, u trajanju od 48 h. Metodom *western blot* analizirat će ekspresiju proteina PARP1 i ciklina D1 te će dobivene rezultate potvrditi analizom staničnog ciklusa i apoptoze protočnom citometrijom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Osnovne kemikalije

Akrilamid (AppliChem), albumin iz fetalnog goveđeg seruma (BSA) (Roth), amonijev persulfat (APS) (Sigma), DMEM (Sigma-Aldrich), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma), etanol (Sigma), L-glutamat (Gibco), otopina *Luminol western blotting reagent* (otopina A i otopina B) (Santa Cruz Biotechnology), metanol (Sigma), mlijeko u prahu (Roth), niklozamid (MedChemExpress), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Roth), natrijev azid (Kemika), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Roth), penicilin-streptomycin (Sigma), Ponceau S (Roth), Triton-X-100 (Roth), Tween 20 (Roth), β-merkaptioetanol (Sigma), 2-propanol (Sigma), Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), propidij jodid (Sigma), Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific)

#### Puferske otopine

- 1X PBS napravljen iz 10X matične otopine (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7xH<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- RIPA pufer pH 8,1 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS)
- 6X pufer za nanošenje proteinskih uzoraka (Laemmli pufer) (pH 6,8, 125 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 5,6% SDS, 0,01% bromfenol plavo u ddH<sub>2</sub>O, uz dodatak 5% β-merkaptioetanol)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za gel za sabijanje pH 6,8 (0,5 M Tris, 0,4% SDS)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za gel za razdvajanje pH 8,8 (1,5 M Tris, 0,4% SDS)
- 1X pufer za SDS PAGE (engl. *running buffer*) pripremljen iz matične otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS)
- 1X pufer za prijenos na membranu (engl. *transfer buffer*) pripremljen iz matične otopine 10X (250 mM Tris, 2 M glicin, 20% v/v metanol)
- pufer za blokiranje TBS-BSA pH 7,4 (5% BSA, 0,1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom TBS-u)
- pufer za ispiranje membrana pH 7,4 (0,05% Tween u TBS-u)

- 1X TBS pufer pripremljen iz matične otopine pH 7,5 10X TBS (500 mM Tris, 1,5 M NaCl)
- 5%-tna otopina mlijeka u prahu pripravljena u 1X TBS puferu
- Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0,5% v/v Ponceau S)

### **Protutijela**

anti-ciklin D1 (1:1000, Dako), anti-PARP1 (1:5000, Cell Signaling Technology), anti-vinkulin (1:1500, Sigma), anti-mišje HRP (1:5000, Dako), anti-zečje HRP (1:5000, Dako)

### **Proteazni inhibitori**

Aprotinin (koncentracija matične otopine 10 mg/mL, 1000X) (Sigma); fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (koncentracija matične otopine 100 mM, 200X) (Roth); leupeptin (koncentracija matične otopine 1 mg/mL, 1000X) (Roche); natrijev ortovanadat (koncentracija matične otopine 1 M, 1000X) (Sigma); PhosStop EASYpack (razrijeđeno prema uputama proizvođača) (Roche)

### **Kompleti (engl. kits)**

*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* (BioLegend)

### **Uredaji**

*Chemi doc XRS, BD Accuri C6*



### 3.2 Nasađivanje i tretiranje stanica

Korištene su tri stanične linije tumora mokraćnog mjehura; T24, RT4 i 5637 (ATCC). Stanične linije RT4 i 5637 kultivirane su u hranjivom mediju RPMI-1640 (Sigma) s dodatkom 10%-tnog fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (Sigma), 200 mM L-glutamata (Gibco) i penicilin ( $10^4$  U/mL) – streptomicina (10 mg/mL) (Sigma), a T24 u mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma) uz dodatak 10% FBS-a i penicilin ( $10^4$  U/mL) – streptomicina (10 mg/mL).

Stanice su kultivirane u inkubatorima predviđenim za uzgoj stanica, na temperaturi od 37 °C, u zraku s 5% CO<sub>2</sub>. Nasađivala sam ih na ploče sa 6 jažica, tako da na dan tretmana budu oko 70% konfluentne. Niklozamid sam otopila u dimetil sulfoksidu tako da sam priredila matične otopine koncentracija 10 mM koje sam koristila za pripremu razrjeđenja određenih koncentracija. Stanicama sam na dan tretmana uklonila medij i dodala medij s određenom koncentracijom niklozamida. Stanice T24 tretirala sam niklozamidom koncentracija 5 μM i 10 μM, stanice 5637 20 μM i 30 μM, a stanice RT4 45 μM i 47 μM, u trajanju od 48 h. Nakon tretmana, stanicama sam uklonila medij i isprala ih u puferu PBS. Zatim sam ih lizirala u puferu RIPA uz dodatak proteaznih (PMSF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, aprotinin, leupeptin) i fosfataznih (PhosStop EASYpack) inhibitora, 20 min na ledu. Zatim je uslijedilo centrifugiranje u trajanju od 10 min, 12000 g na 4 °C. Supernatant sam prebacila u nove epruvete te su proteini denaturirani uz dodatak 6X Laemmli pufera i 5%-tnog β-merkaptetanola, u termobloku na 95 °C, 5 min. Uzorci su do nanošenja na gel pohranjeni na -20 °C.

### 3.3 Detekcija proteina metodom *western blot*

Uzorke sam nanijela na 8%-tni i 12%-tni akrilamidni gel te su proteini nakon razdavajanja denaturirajućom SDS poliakrilamidnom elektroforezom (engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) (90 min, 130 V), transferirani na nitroceluloznu membranu (sobna temperatura, 1,5 h, 200 mA). Membrane sam blokirala 1 h u otopini TBS-BSA, na sobnoj temperaturi. Zatim sam ih inkubirala preko noći, na 4 °C, u odgovarajućim primarnim protutijelima razrijeđenim u otopini TBS-BSA – anti-PARP1 (1:5000), anti-ciklin D1 (1:1000), anti-vinkulin (1:1500). Sutradan sam ih isprala s puferom za ispiranje, tri puta po 10 min te ih inkubirala 1 h u odgovarajućem sekundarnom protutijelu – anti-zečje ili anti-mišje konjugiranim s peroksidazom iz hrena (engl. *Horseradish Peroxidase*,

HRP), razrijeđenih u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka (TBS-Tween) (1:5000, Roth), na sobnoj temperaturi. Membrane sam potom ponovno ispirala puferom za ispiranje, dva puta po 10 min u TBS-Tween te jednom u otopini TBS. Nakon dodatka otopine luminola i otopine vodikovog peroksida (Solution A i Solution B) signali su vizualizirani kemiluminiscencijom u uređaju *Chemi doc XRS*, u programu ImageLab 6.0 (BioRad). Kao endogena kontrola korišten je vinkulin, u odnosu na koji su normalizirani intenziteti ostalih signala.

### **3.4 Analiza stanične smrti i staničnog ciklusa protočnom citometrijom**

Protočnom citometrijom analizirala sam apoptozu i stanični ciklus stanica T24 i 5637. Za analizu apoptoze stanice T24 sam tretirala niklozamidom koncentracije 10  $\mu\text{M}$ , a stanice 5637 koncentracijom 40  $\mu\text{M}$ . Za analizu staničnog ciklusa stanice sam tretirala niklozamidom koncentracije 10  $\mu\text{M}$ .

#### **3.4.1 Detekcija stanica u apoptozi**

Nakon što sam sa stanica uklonila medij, isprala sam ih PBS-om, tripsinizirala 5 min te resuspendirala dodatkom medija. Skupila sam ih u epruvete te ih centrifugirala 5 min, 500 g. Supernatant sam uklonila, a stanice isprala dva puta u PBS-u i resuspendirala u 100  $\mu\text{L}$  10%-tne otopine FBS-PBS. Uzorke sam dalje pripremila prema protokolu iz kompleta *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* (BioLegend); resuspendirala ih u 100  $\mu\text{L}$  otopine *Annexin V Binding Buffer*, dodala 5  $\mu\text{L}$  otopine *FITC Annexin V* i 10  $\mu\text{L}$  propidij jodida (2 ng/mL, 20X). Nakon 15 minuta inkubacije u mraku, uzrocima sam dodala 400  $\mu\text{L}$  otopine *Annexin V Binding Buffer* nakon čega je uslijedilo očitavanje rezultata na protočnom citometru i obrada u programu *FlowLogic*.

### 3.4.2 Određivanje staničnog ciklusa

Nakon što sam s tretiranih stanica uklonila medij, isprala sam ih PBS-om, tripsinizirala 5 min te resuspendirala dodatkom medija. Skupila sam ih u epruvete te ih centrifugirala 5 min, 500 g. Supernatant sam uklonila te stanice dva puta isprala u PBS-u. Stanice sam zatim resuspendirala u 50  $\mu$ L 10%-tne otopine FBS-PBS i fiksirala dodatkom 1 mL hladnog 70%-tnog etanola, kap po kap. Uzorci su zatim inkubirani 2 h na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga stanice sam centrifugirala (5 min, 500 g), uklonila etanol, dva puta isprala u PBS-u te dodala propidij jodid (2 ng/mL, 20X) (Sigma), tako da je ukupni volumen u svakom uzorku bio 200  $\mu$ L. Zatim je uslijedilo očitavanje rezultata na protočnom citometru te analiza u programu *FlowLogic*.

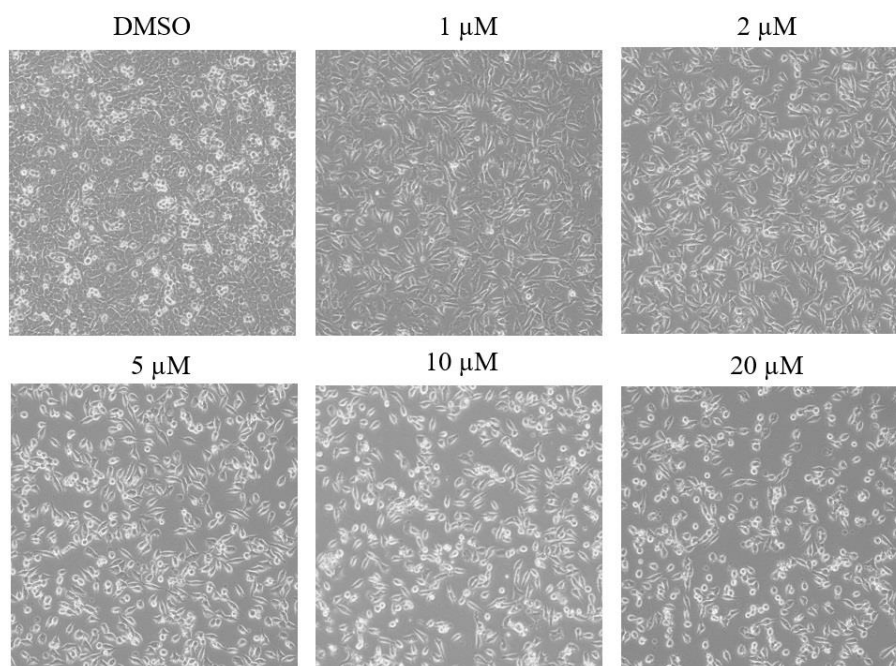
### 3.5 Statistika

Podatke sam statistički obradila pomoću računalnog programa *GraphPad Prism 9*. Normalnost razdiobe uzoraka provjerila sam pomoću Shapiro-Wilk testa. Rezultati za udio stanica u apoptozi i stanični ciklus analizirani su student *t* testom. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Vrijednost *p* je prikazana na slikama te je  $p < 0.05$  smatrana statistički značajnom.

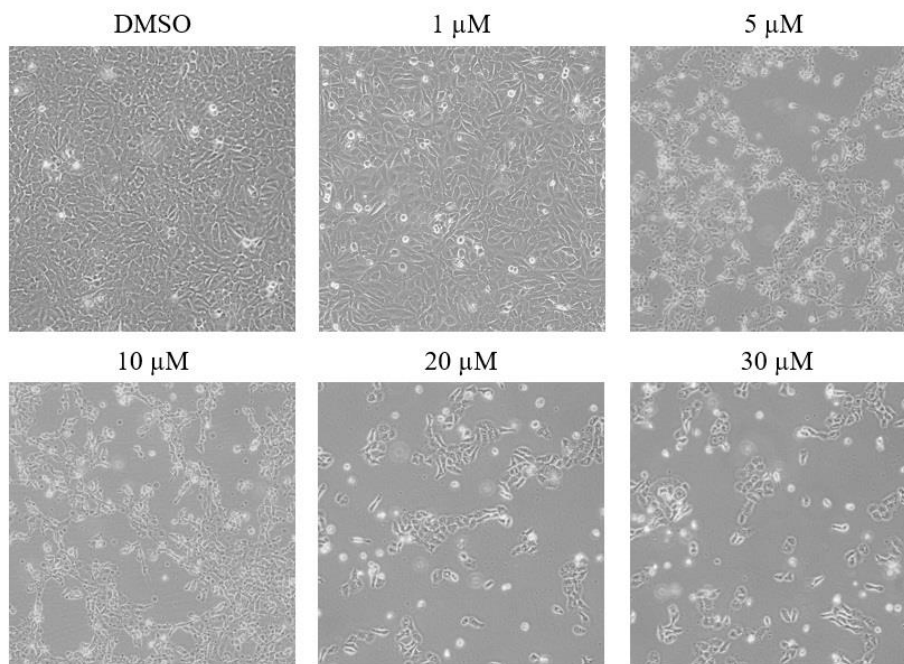
## 4. REZULTATI

### 4.1 Citotoksični učinak niklozamida na stanice

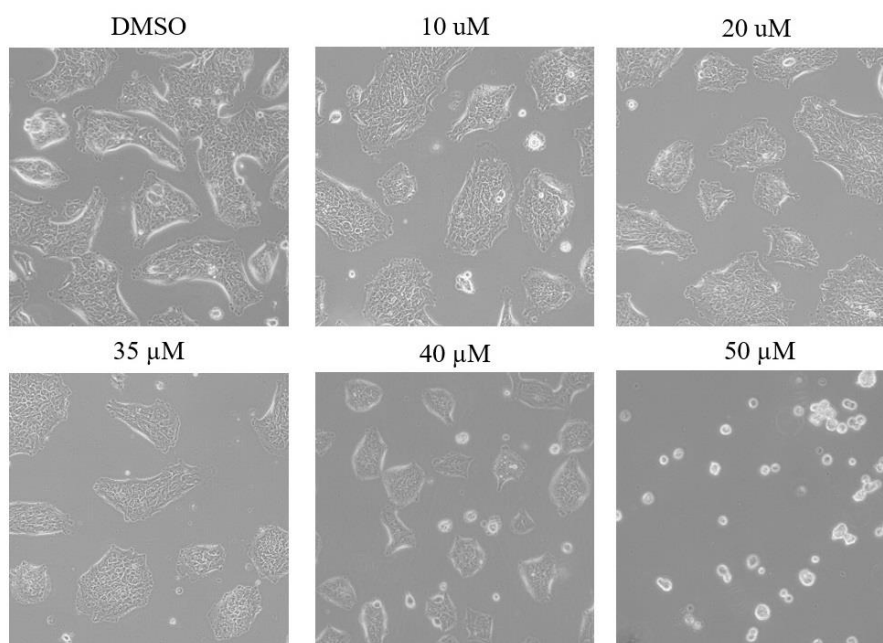
Kako bi se istražilo djelovanje niklozamida, stanice T24, 5637 i RT4 tretirane su s niklozamidom različitih koncentracija (T24 – 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M, 5637 – 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M i 30  $\mu$ M, RT4 - 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 35  $\mu$ M, 40  $\mu$ M i 50  $\mu$ M). Nakon 48 h tretmana uočeno je njegovo citotoksično djelovanje; tretirane stanice imale su smanjenu konfluentnost u odnosu netretirane te promijenjenu morfologiju (slike 6-8).



**Slika 6. Utjecaj niklozamida na stanice T24.** Stanice su tretirane niklozamidom (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 20  $\mu$ M) u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina su stanice tretirane dimetilsulfoksidom (DMSO). Stanice su na dan tretmana bile oko 70% konfluentne.



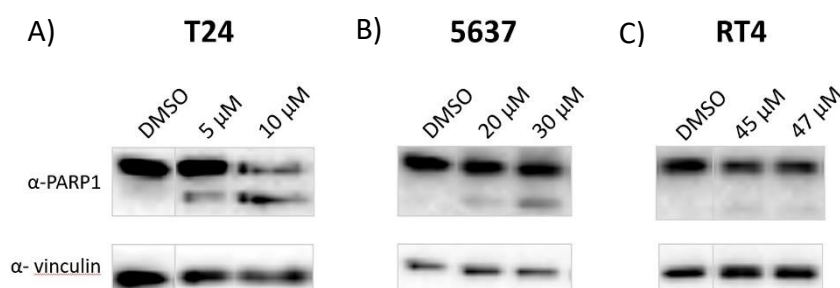
**Slika 7. Utjecaj niklozamida na stanice 5637.** Stanice su tretirane niklozamidom (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina su stanice tretirane dimetilsulfoksidom (DMSO). Stanice su na dan tretmana bile oko 70% konfluentne.



**Slika 8. Utjecaj niklozamida na stanice RT4.** Stanice su tretirane niklozamidom (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 35  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina su stanice tretirane dimetilsulfoksidom (DMSO). Stanice su na dan tretmana bile oko 70% konfluentne.

## 4.2 Niklozamid inducira apoptozu stanica tumora mokraćnog mjehura

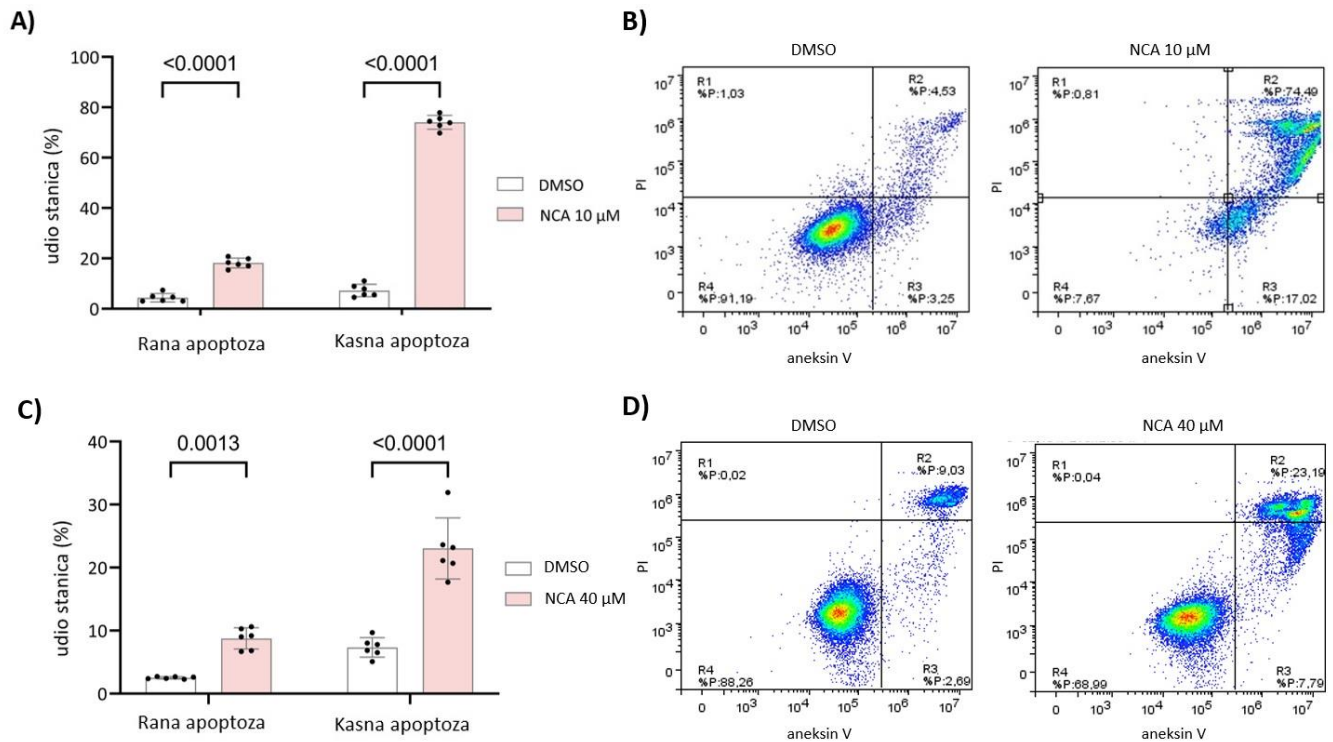
Kako bi se analizirala ekspresija proteina, iz stanica T24, 5637 i RT4 tretiranih niklozamidom različitih koncentracija (T24 – 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ , 5637 – 20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ , RT4 – 45  $\mu\text{M}$  i 47  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 48 h, izolirani su proteini, razdvojeni na poliakrilamidnom gelu elektroforezom te detektirani metodom *western blot*. Analizirala se ekspresija proteina PARP1. Rezultati pokazuju da je ekspresija pocijepanog proteina PARP1 prisutna u svim stanicama tretiranim s obje koncentracije niklozamida, u trajanju od 48 h. Detektirana količina pocijepanog proteina PARP1 u staničnoj liniji RT4 manja je nego kod ostalih staničnih linija (slika 9).



**Slika 9. Aktivacija apoptoze u staničnim linijama T24 (A), 5637 (B) i RT4 (C).** Analiza ekspresije proteina PARP1 metodom *western blot*, u stanicama T24 (5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ ), 5637 (20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ ) i RT4 (45  $\mu\text{M}$  i 47  $\mu\text{M}$ ) tretiranim niklozamidom u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina su stanice tretirane dimetilsulfoksidom (DMSO) u trajanju od 48 h. Intenzitet signala normaliziran je u odnosu na signal vinkulina. Korištena su primarna protutijela anti-PARP1 i anti-vinkulin te sekundarno anti-zečje i anti-mišje protutijelo konjugirano s HRP.

Pored analize cijepanja proteina PARP1, pojava apoptoze u stanicama T24 i 5637 nakon tretmana niklozamidom ispitana je i pomoću protočne citometrije. Stanice T24 su tretirane niklozamidom koncentracije 10  $\mu\text{M}$ , a stanice 5637 koncentracijom 40  $\mu\text{M}$ , u trajanju od 48 h. Stanice su inkubirane s PI i aneksinom V. Budući da stanice u ranoj apoptozi imaju fosfatidilserin na vanjskoj strani membrane koja je intaktna one će vezati samo aneksin V. Stanice u kasnoj apoptozi imaju također fosfatidilserin na vanjskoj strani membrane koji će vezati aneksin V, ali će zbog narušenog integriteta membrane u njih ući PI koji će se vezati za DNA.

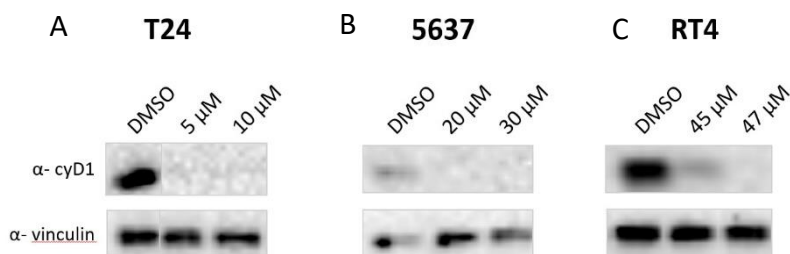
Rezultati dobiveni protočnom citometrijom također pokazuju da niklozamid inducira apoptozu. Kod stanične linije T24 pokazano je da je 18,2% tretiranih (10  $\mu$ M) stanica u ranoj apoptozi, a 74,1% u kasnoj, dok su te vrijednosti za kontrolnu skupinu (stanice tretirane DMSO-om) 4,4% i 7,3%. Kod stanične linije 5637 23,0% tretiranih stanica (40  $\mu$ M) je u ranoj i 7,3% stanica u kasnoj apoptozi, a u kontrolnoj skupini te vrijednosti iznose 8,7% i 2,5% (slika 10).



**Slika 10. Aktivacija apoptoze u staničnim linijama T24 (A, B) i 5637 (C, D).** Analiza rezultata dobivenih korištenjem kompleta *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI*. Stanice T24 i 5637 tretirane su s niklozamidom (10  $\mu$ M i 40  $\mu$ M), u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina bile su stanice tretirane DMSO-om, u trajanju od 48 h. Količina apoptotskih stanica detektirana je aneksin V/PI bojanjem pomoću programa *FlowLogic*. S obzirom na to jesu li stanice pozitivne ili negativne na aneksin V i PI bojanje, određeno je jesu li u ranoj (aV<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup>) ili kasnoj (aV<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>) apoptozi (B, D). Udio stanica T24 (A) i 5637 (C) pozitivnih na aneksin V/PI bojanje prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=6). Podatci su statistički obrađeni u programu *GraphPad Prism 9*. DMSO – dimetilsulfoksid, NCA – niklozamid.

### 4.3 Niklozamid zaustavlja proliferaciju stanica tumora mokraćnog mjehura

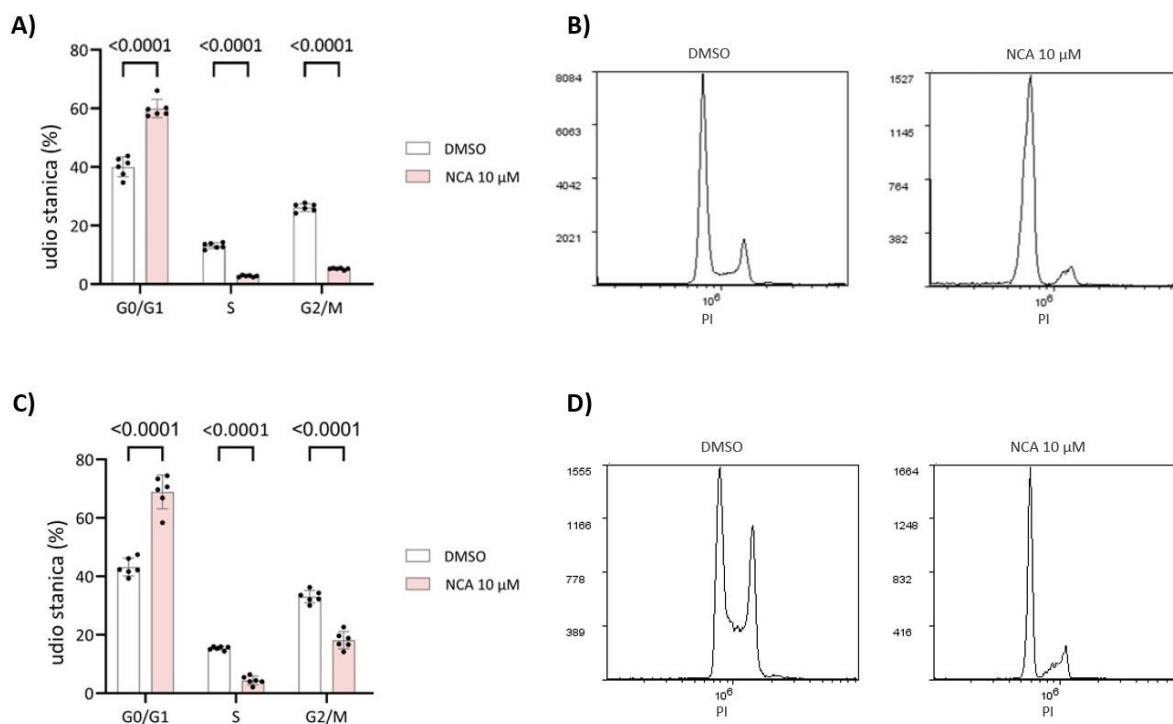
Kako bi se analizirala ekspresija proteina, iz stanica T24, 5637 i RT4 tretiranih niklozamidom različitih koncentracija (T24 – 5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M, 5637 – 20  $\mu$ M i 30  $\mu$ M, RT4 – 45  $\mu$ M i 47  $\mu$ M) u trajanju od 48 h, izolirani su proteini, razdvojeni na poliakrilamidnom gelu elektroforezom te detektirani metodom *western blot*. Analizirala se ekspresija proteina ciklin D1. Rezultati pokazuju gubitak ekspresije ciklina D1 kod stanica T24 i 5637 tretiranih s obje koncentracije niklozamida. Kod stanica RT4 tretiranih niklozamidom koncentracije 45  $\mu$ M dolazi do smanjenja ekspresije ciklina D1 u odnosu na netretirane stanice, dok kod koncentracije 47  $\mu$ M dolazi do gubitka njegove ekspresije (slika 11).



**Slika 11. Zaustavljanje staničnog ciklusa u staničnim linijama T24 (A), 5637 (B) i RT4 (C).** Analiza ekspresije proteina ciklin D1 (cyD1) metodom *western blot*, u stanicama T24 (5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M), 5637 (20  $\mu$ M i 30  $\mu$ M) i RT4 (45  $\mu$ M i 47  $\mu$ M) tretiranim niklozamidom u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina su stanice tretirane dimetilsulfoksidom (DMSO) u trajanju od 48 h. Intenzitet signala normaliziran je u odnosu na signal vinkulina. Korištena su primarna protutijela anti-ciklin D1 i anti-vinkulin te sekundarno anti-zečje protutijelo konjugirano s HRP.

Osim analizom ekspresije ciklina D1, stanični ciklus u stanicama T24 i 5637 nakon tretmana niklozamidom ispitan je i pomoću protočne citometrije. Stanice su tretirane niklozamidom koncentracije 10  $\mu$ M, u trajanju od 48 h. Rezultati dobiveni protočnom citometrijom također pokazuju da niklozamid zaustavlja stanični ciklus u fazi G0/G1 čime zaustavlja staničnu proliferaciju. Udio stanica T24 u fazi G0/G1 iznosi 60%, u fazi S 2,8% te u fazi G2 5,2%. Te vrijednosti za stanice tretirane DMSO-om iznose redom; 40,1%, 13,1% i 26,2%. Udio tretiranih 5637 stanica u fazi G0/G1 iznosi 68,9%, u fazi S 4,4% te u fazi G2 18,4%. Te vrijednosti za stanice tretirane DMSO-om iznose 43,2%, 15,4% i 33,1% (slika 12).





**Slika 12. Zaustavljanje staničnog ciklusa u staničnim linijama T24 (A, B) i 5637 (C, D).** Stanice T24 i 5637 tretirane su niklozamidom (10  $\mu$ M), u trajanju od 48 h. Kontrolna skupina su bile stanice tretirane DMSO-om, u trajanju od 48 h. Faza staničnog ciklusa, odnosno količina DNA u stanici određena je bojanjem s PI te je detektirana pomoću programa *FlowLogic* (B, D). Podatci su statistički obrađeni u programu *GraphPad Prism 9* i prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=6) (A, C). NCA – niklozamid, PI – propidij jodid.

## 5. RASPRAVA

Tumor mokraćnog mjehura jedan je od učestalijih tipova tumora, s visokom stopom recidiva. Liječenje se često mora ponoviti više puta, prilikom čega se gotovo uvijek javi rezistencija tumorskih stanica. Također, nuspojave postojećih terapija su teške i često nepredvidive. Zbog toga se provodi sve više istraživanja o molekularnim mehanizmima tumora mokraćnog mjehura i razvoju novih lijekova (Wołacewicz i sur., 2020).

Postoji veliki broj istraživanja koja potvrđuju citotoksičan učinak niklozamida na razne tipove tumorskih stanica. Međutim, ne postoji mnogo podataka o njegovom utjecaju na stanice tumora mokraćnog mjehura.

Uspoređujući dobivene rezultate za svaku staničnu liniju, može se primijetiti da je za staničnu liniju RT4 korištena mnogo veća koncentracija niklozamida kako bi se dobio isti učinak kao za stanice T24 i 5637. Također je pokazano da stanice RT4 umiru apoptozom u manjoj mjeri nego preostale dvije linije. To se može objasniti različitom genskom ekspresijom različitih staničnih linija. Stanice T24 i 5637 imaju mutirani protein p53, dok je kod RT4 on divljeg tipa. U svome istraživanju, Kumar i sur. (2018) otkrili su vezu između proteina p53 i apoptoze inducirane niklozamidom te su stanice koje imaju eksprimiran divlji tip p53 manje osjetljive na djelovanje niklozamida nego stanice koje ga nemaju. Niklozamid uzrokuje odspajanje sinteze ATP-a u mitohondriju od procesa nastanka membranskog potencijala. Dolazi do porasta koncentracije unutarstaničnog kalcija, što uzrokuje aktivaciju raznih enzima, uključujući fosfolipaze. Na taj način dolazi do oslobađanja arahidonske kiseline koja inducira ulazak stanice u apoptozu. Kao odgovor na niklozamid, u stanicama se povećava količina i stabilnost proteina p53 koji reagira na povećanje arahidonske kiseline tako da inducira transkripciju gena *ALOX12B* i *ALOX5* koji kodiraju lipoksigenaze; enzime koji kataliziraju oksidaciju arahidonske kiseline. Na taj način, stanice koje imaju eksprimiran divlji tip proteina p53 manje su podložne apoptozi induciranoj arahidonskom kiselinom, odnosno niklozamidom, nego stanice kojima je p53 mutiran ili potpuno odsutan.

Wu i sur. (2018) dobili su slične rezultate za indukciju apoptoze niklozamidom u staničnoj liniji T24, dok za 5637 i RT4 ne postoje objavljena istraživanja. Međutim, postoje drugi tipovi staničnih linija kod kojih je pokazano da niklozamid uspješno inducira apoptozu, kao što su stanice tumora dojke (Ye i sur., 2014) i kolorektalnog tumora (Yang i sur., 2016).

Niklozamid je uspješno zaustavio proliferaciju kod sve tri stanične linije tako što je zaustavio stanični ciklus, što je dokazano smanjenjem ekspresije ciklina D1 i povećanim udjelom stanica u fazi G0/G1. Za razliku od tih rezultata, Wu i sur. (2018) nisu dobili značajne promjene u udjelu T24 stanica u fazi G0/G1. Mogući razlog tome je preniska koncentracija niklozamida kojom su tretirali stanice (0,18  $\mu$ M). Za stanične linije 5637 i RT4 zasad nema objavljenih istraživanja, ali postoje dokazi za druge tumorske stanične linije. Pokazano je da niklozamid zaustavlja stanični ciklus u fazi G0/G1 u tumorskim stanicama prostate (DU145) (Gargantilla i sur., 2022), skvamoznim stanicama karcinoma glave i vrata (HNSCC) (Han i sur. 2019) i tumorskim stanicama jednjaka (CE18T) (Lee i sur., 2020). Točan mehanizam nije poznat, ali Lee i sur. su pokazali da zaustavljanje staničnog ciklusa niklozamidom korelira s povećanom ekspresijom proteina p21 koji inhibira aktivnost kompleksa CDK4/6-ciklin D.

Rezultati dobiveni metodom *western blot* - cijepanje proteina PARP1 i smanjenje ekspresije ciklina D1 u tretiranim stanicama ukazuju da niklozamid inducira apoptozu i zaustavlja stanični ciklus u fazi G0/G1, što je potvrđeno i rezultatima protočne citometrije. Prema tome, hipoteza da niklozamid svoje antitumorsko djelovanje ostvaruje induciranjem apoptoze i zaustavljanjem stanične proliferacije u linijama T24, 5637 i RT4 je potvrđena.

## 6. ZAKLJUČAK

Niklozamid u tumorskim staničnim linijama T24, 5637 i RT4 uzrokuje apoptozu (T24 – 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ , 5647 – 20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ , RT4 – 45  $\mu\text{M}$  i 47  $\mu\text{M}$ ).

Niklozamid u tumorskim staničnim linijama T24, 5637 i RT4 inhibira proliferaciju zaustavljajući stanični ciklus u fazi G1 (T24 – 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ , 5647 – 20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ , RT4 – 45  $\mu\text{M}$  i 47  $\mu\text{M}$ ).

Zbog različite genetske podloge, stanice RT4 manje su osjetljive na antitumorsko djelovanje niklozamida od stanica T24 i 5637.

Prema dobivenim rezultatima niklozamid bi mogao imati potencijal kao lijek u intravezikalnoj ili adjuvantnoj terapiji protiv tumora mokraćnog mjehura.

## 7. LITERATURA

Agami, R., & Bernards, R. (2000). Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell*, 102(1), 55–66.

Ai, L., Chen, J., Yan, H., He, Q., Luo, P., Xu, Z., & Yang, X. (2020). Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 3625–3649.

Al-Hadiya, B. M. H. (2005). Niclosamide: Comprehensive Profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32(05), 67–96.

Balgi, A. D., Fonseca, B. D., Donohue, E., Tsang, T. C., Lajoie, P., Proud, C. G., Nabi, I. R., & Roberge, M. (2009). Screen for chemical modulators of autophagy reveals novel therapeutic inhibitors of mTORC1 signaling. *PloS one*, 4(9), e7124.

Bhanvadia, S. K. (2018). Bladder Cancer Survivorship. *Current Urology Reports*, 19(12).

Bubeník, J., Barešová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H., & Donner, J. (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International Journal of Cancer*, 11(3), 765–773.

Chaitanya, G. V., Alexander, J. S., Babu, P. P. (2010). PARP1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8, 1–11.

Chang, Y.-W., Yeh, T.-K., Lin, K.-T., Chen, W.-C., Yao, H.-T., Lan, S.-J., Wu, Y.-S., Hsieh, H.-P., Chen, C.-M., & Chen, C.-T. (2006). Pharmacokinetics of anti-SARS-CoV agent niclosamide and its analogs in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(4).

Chaux, A., Cohen, J. S., Schultz, L., Albadine, R., Jadallah, S., Murphy, K. M., Sharma, R., Schoenberg, M. P., & Netto, G. J. (2012). High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: A study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Human Pathology*, 43(10), 1590–1595.

Chen, M., Wang, J., Lu, J., Bond, M. C., Ren, X. R., Lyerly, H. K., Barak, L. S., & Chen, W. (2009). The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled1 signaling. *Biochemistry*, 48(43), 10267–10274.

Chen, W., Mook, R. A., Premont, R. T., & Wang, J. (2018). Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cellular Signalling*, 41, 89–96.

Cheng, B., Morales, L. D., Zhang, Y., Mito, S., & Tsin, A. (2017). Niclosamide induces protein ubiquitination and inhibits multiple pro-survival signaling pathways in the human glioblastoma U-87 MG cell line. *PLoS ONE*, 12(9), e0184324.

Clare Vinaud, M., & De Souza Lino Junior, R. (2017). Mode of Action of the Main Anti-Parasitic Drugs. *Revista de Patologia Tropical*, 46(2), 121.

Cooper G. M., & Hausman R. E. (2009). *The Cell: A Molecular Approach* (5th ed.). Washington D.C.: Sinauer Associates

Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., & MacFarlane, M. (2012). The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Experimental Cell Research*, 318(11), 1269–1277.

Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1–28.

Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.

Gargantilla, M., Persoons, L., Kaueroová, T., del Río, N., Daelemans, D., Priego, E.-M., Kollar, P., & Pérez-Pérez, M.-J. (2022). Hybridization Approach to Identify Salicylanilides as Inhibitors of Tubulin Polymerization and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3). *Pharmaceuticals*, 15(7), 835.

Grandis, J. R., & Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer research*, 53(15), 3579–3584.

Han, Z., Li, Q., Wang, Y., Wang, L., Li, X., Ge, N., Wang, Y., & Guo, C. (2019). Niclosamide Induces Cell Cycle Arrest in G1 Phase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Through Let-7d/CDC34 Axis. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1544.

Hollingworth, R. (2001). Inhibitors and Uncouplers of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Handbook of Pesticide Toxicology*, 1169–1261.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Bilten br. 40. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018

Jazvić, M., Ružić, B., Krušlin, B., Šitum, M., Pisac, V. P., Omrčen, T., Jelavić, T. B., Kaštelan, Ž., Gamulin, M., Alduk, A. M., Čorić, M., Murgić, J., Mažuran, B., Šitum, K., Madunić, M. D., Miletić, D., & Vojnović, Ž. (2019). Clinical recommendations for diagnosis, treatment and monitoring of patients with bladder cancer. *Liječnički Vjesnik*, 141(11), 326–335.

Jin, Y., Lu, Z., Ding, K., Li, J., Du, X., Chen, C., Sun, X., Wu, Y., Zhou, J., & Pan, J. (2010). Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer research*, 70(6), 2516–2527.

Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471–8486.

Knowles, M. A., & Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 25–41.

Kumar, R., Coronel, L., Somalanka, B., Raju, A., Aning, O. A., An, O., Ho, Y. S., Chen, S., Mak, S. Y., Hor, P. Y., Yang, H., Lakshmanan, M., Itoh, H., Tan, S. Y., Lim, Y. K., Wong, A. P. C., Chew, S. H., Huynh, T. H., Goh, B. C., ... Cheok, C. F. (2018). Mitochondrial uncoupling reveals a novel therapeutic opportunity for p53-defective cancers. *Nature Communications*, 9(1), 1–13.

Larsen, E. S., Joensen, U. N., Poulsen, A. M., Goletti, D., & Johansen, I. S. (2020). Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for bladder cancer: A review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. *APMIS*, 128(2), 92–103.

Lee, M. C., Chen, Y. K., Hsu, Y. J., & Lin, B. R. (2020). Niclosamide inhibits the cell proliferation and enhances the responsiveness of esophageal cancer cells to chemotherapeutic agents. *Oncology Reports*, 43(2), 549–561.

Lenis, A. T., Lec, P. M., & Chamie, K. (2020). Bladder cancer a review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 324(19), 1980–1991.

Liao, Z., Nan, G., Yan, Z., Zeng, L., Deng, Y., Ye, J., Zhang, Z., Qiao, M., Li, R., Denduluri, S., Wang, J., Wei, Q., Geng, N., Zhao, L., Lu, S., Wang, X., Zhou, G., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., ... Wang, Z. (2015). The Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits the Proliferative Activity of Human Osteosarcoma Cells by Targeting Multiple Signal Pathways. *Current cancer drug targets*, 15(8), 726–738.

Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., & Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature cell biology*, 3(9), 802–808.

Liu, J., Chen, X., Ward, T., Mao, Y., Bockhorn, J., Liu, X., Wang, G., Pegram, M., & Shen, K. (2016). Niclosamide inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in lapatinib-resistant human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 71, 12–23.

Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal*, 154(1), 11–34.

Mashimo, M., Onishi, M., Uno, A., Tanimichi, A., Nobeyama, A., Mori, M., Yamada, S., Negi, S., Bu, X., Kato, J., Moss, J., Sanada, N., Kizu, R., Fujii, T. (2021). The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 296, e100046.

Matthews, G. M., Newbold, A., & Johnstone, R. W. (2012). Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathway Signaling as Determinants of Histone Deacetylase Inhibitor Antitumor Activity. *Advances in Cancer Research*, 116, 165-197.

Morgan, D. (2007). *The cell cycle*. London: New Science Press.

Obeng, E. (2007). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1133–1143.

Ofori-Adjei, D., Dodoo, A. N. O., Appiah-Danquah, A., & Couper, M. (2008). A review of the safety of niclosamide, pyrantel, triclabendazole and oxfamiquine. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*, 20(3), 113–122.

Omar, A., Williams, N., Chisholm, N., Diab, M., Khattak, A., & Forsyth, L. (2010). Primary small cell carcinoma of the bladder. *Central European Journal of Urology*, 63(4), 198–199.



Pampori, N. A., Singh, G., & Srivastava, V. M. L. (1984). *Cotugnia digonopora*: Carbohydrate metabolism and effect of anthelmintics on immature worms. *Journal of Helminthology*, 58(1), 39–47.

Patel, V. G., Oh, W. K., Galsky, M. D. (2020). Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(5), 404–423.

Pax, R. A., & Bennett, J. L. (1989). Effect of closantel on intrategumental pH in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. *The Journal of parasitology*, 75(1), 169–171.

Peng, C.-C., Chen, K.-C., Peng, R. Y., Su, C.-H., & Hsieh-Li, H. M. (2006). Human urinary bladder cancer T24 cells are susceptible to the *Antrodia camphorata* extracts. *Cancer Letters*, 243(1), 109–119.

Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press.

Ramaswamy, M., Deng, M., & Siegel, R. M. (2011). Harnessing programmed cell death as a therapeutic strategy in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(3), 152–160.

Ren, X., Duan, L., He, Q., Zhang, Z., Zhou, Y., Wu, D., Pan, J., Pei, D., & Ding, K. (2010). Identification of Niclosamide as a New Small-Molecule Inhibitor of the STAT3 Signaling Pathway. *ACS medicinal chemistry letters*, 1(9), 454–459.

Riviere, J. E., & Papich, M.G. (2013). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons.

Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Padala, S. A., & Barsouk, A. (2020). Epidemiology of Bladder Cancer. *Medical Sciences*, 8(15), 1–12.

Satoh, K., Zhang, L., Zhang, Y., Chelluri, R., Boufraquech, M., Nilubol, N., Patel, D., Shen, M., & Kebebew, E. (2016). Identification of Niclosamide as a Novel Anticancer Agent for Adrenocortical Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 22(14), 3458–3466.

Suliman, M. A., Zhang, Z., Na, H., Ribeiro, A. L., Zhang, Y., Niang, B., Hamid, A. S., Zhang, H., Xu, L., & Zuo, Y. (2016). Niclosamide inhibits colon cancer progression through downregulation of the Notch pathway and upregulation of the tumor suppressor miR-200 family. *International journal of molecular medicine*, 38(3), 776–784.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.

Surjana, D., Halliday, G. M., & Damian, D. L. (2010). Role of Nicotinamide in DNA Damage, Mutagenesis, and DNA Repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1–13.

Tan, T. Z., Rouanne, M., Tan, K. T., Huang, R. Y. J., & Thiery, J. P. (2019). Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *European Urology*, 75(3), 423–432.

Xiong, T., Jiang, N., Xu, S., Li, S. Z., Zhang, Y., Xu, X. J., Dong, H. F., Zhao, Q. P. (2020). Metabolic profiles of *Oncomelania hupensis* after molluscicidal treatment: carbohydrate metabolism targeted and energy deficiency, *Acta Tropica*, 210.

Tran, L., Xiao, J. F., Agarwal, N., Duex, J. E., & Theodorescu, D. (2021). Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(2), 104–121.

Van Loo, G., Schotte, P., Van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R., & Vandenabeele, P. (2001). Endonuclease G: A mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death and Differentiation*, 8(12), 1136–1142.

Wołęcawicz, M., Hrynkiewicz, R., Grywalska, E., Suchojad, T., Leksowski, T., Roliński, J., & Niedźwiedzka-Rystwej, P. (2020). Immunotherapy in Bladder Cancer: Current Methods and Future Perspectives. *Cancers*, 12(5), 1181.

Wu, C. L., Chen, C. L., Huang, H. S., & Yu, D. S. (2018). A new niclosamide derivatives-B17 can inhibit urological cancers growth through apoptosis-related pathway. *Cancer Medicine*, 7(8), 3945–3954.

Yang, F., Ye, T., Liu, Z., Fang, A., Luo, Y., Wei, W., Li, Y., Li, Y., Zeng, A., Deng, Y., Gou, H., Xie, Y., Zhang, Y., & Wei, Y. (2016). Niclosamide induces colorectal cancer apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in vivo. *RSC Advances*, 6(107), 106019–106030.

Ye, T., Xiong, Y., Yan, Y., Xia, Y., Song, X., Liu, L., Li, D., Wang, N., Zhang, L., Zhu, Y., Zeng, J., Wei, Y., & Yu, L. (2014). The Anthelmintic Drug Niclosamide Induces Apoptosis, Impairs Metastasis and Reduces Immunosuppressive Cells in Breast Cancer Model. *PLoS ONE*, 9(1), e85887.

Yeh, L.-T., Lin, C.-W., Lu, K.-H., Hsieh, Y.-H., Yeh, C.-B., Yang, S.-F., & Yang, J.-S. (2022). Niclosamide Suppresses Migration and Invasion of Human Osteosarcoma Cells by Repressing TGFBI Expression via the ERK Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 484.

Yeh, L.-T., Lin, C.-W., Lu, K.-H., Hsieh, Y.-H., Yeh, C.-B., Yang, S.-F., & Yang, J.-S. (2022). Niclosamide Suppresses Migration and Invasion of Human Osteosarcoma Cells by Repressing TGFBI Expression via the ERK Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 484.

Zhu, S., Yu, W., Yang, X., Wu, C., & Cheng, F. (2020). Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 1–13.

Izvori s interneta

Globocan (2020). Global Cancer Observatory. Dostupno na <https://gco.iarc.fr/> (Pristupljeno: 10.11.2022).

## 8. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime** Tina Domjanović

**Datum rođenja** 10.07.1998.

### **Obrazovanje:**

2020 - 2022 **Sveučilišni diplomski studij molekularna biologija**  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

10/2021 – 02/2022 **Erasmus+ (Master)**  
Molecular Biology and Biomedicine, Faculty of Sciences, University  
Girona, Spain

2017 – 2020 **Sveučilišni preddiplomski studij molekularna biologija**  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

### **Iskustvo:**

09/2022 – do sad **Laboratorijska praksa**  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Katedra za imunologiju i  
medicinsku genetiku; Laboratorij za istraživanje raka  
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić

02/2022– 09/2022 **Izrada diplomskog rada**  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Katedra za imunologiju i  
medicinsku genetiku; Laboratorij za istraživanje raka  
Tema: Antitumorsko djelovanje niklozamida na stanice tumora  
mokraćnog mjehura  
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić  
Komentorica: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

10/2021 – 02/2022 **Laboratorijska stručna praksa**  
Molecular Biology and Biomedicine, Faculty of Sciences, University of  
Girona, Spain  
Istraživačka grupa: Microbiology of Intestinal Disease Research  
Mentorica: prof. Margarita Martínez Medina

02/2021 – 07/2021 **Laboratorijska stručna praksa**

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Projekt: "Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja guštera  
*Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*

Mentorica: doc. dr. sc. Sofia Blažević

**Dodatno:**

2022 **Međunarodni kongres HDBMB22 "From Science to knowledge"**  
izlaganje znanstvenog postera

2022 **Simpozij studenata bioloških usmjerenja (SiSB)**  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2018 **Znanstvena manifestacija "Noć biologije"**  
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**Jezici:**

- hrvatski jezik (materinski)
- engleski jezik (aktivno u govoru i pismu)
- talijanski jezik (pasivno u govoru i pismu)