UNIVERZA NA PRIMORSKEM

FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

VPLIV CISPLATINA NA IZRAŽANJE SURVIVINA *IN VITRO*

SANJA OZIMIČ

2014

ZAKLJUČNA NALOGA

OZIMIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM

FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

Vpliv cisplatina na izražanje survivina *in vitro*

(*In vitro* effect of cisplatin treatment on survivin expression)

Ime in priimek: Sanja Ozimič

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: doc.dr. Julija Hmeljak

Koper, avgust 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Sanja OZIMIČ

Naslov zaključne naloge: Vpliv cisplatina na izražanje survivina *in vitro*

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 31 Število slik: 8

Število referenc: 36

Mentor: doc. dr. Julija Hmeljak

Ključne besede: vpliv cisplatina na izražanje survivina, qRT – PCR, azbestna vlakna, apoptoza, maligni plevralni mezoteliom

Izvleček:

Maligni plevralni mezoteliom (MPM) je agresivna oblika raka, ki vznikne iz mezotelijskih celic plevre. Glavni povzročitelj te bolezni je azbest. Ker pojavnost MPM povsod narašča, je potreba po novih terapevtskih pristopih vedno večja. Survivin spada v družino beljakovin IAP, katerih funkcija je zaviranje apoptoze. Survivin inaktivira kaspazi 3 in 7. Močno se izraža pri večini človeških malignih tumorjev, je pa v celoti odsoten pri terminalno diferenciranih normalnih celicah. Ker omogoča osredotočenje samo na maligne celice, je tarča za razvoj ciljanih protirakavih terapij. Izražanje survivina uravnavajo beljakovine, ki uravnavajo potek celičnega cikla. Survivin sodeluje pri proliferaciji celic in celičnemu odgovoru na stres. Cisplatin je kemoterapevtik izbora pri zdravljenju številnih rakavih obolenjih. Njegovi glavni težavi sta odpornost in toksičnost, kar zmanjša njegovo učinkovitost. Cisplatin zavira replikacijo in transkripcijo DNA in vodi tudi do apoptoze. Novejše raziskave kažejo na to, da je izražanje survivina močno povezano z razvojem odpornosti rakavih celic proti cisplatinu. Namen v naši raziskavi je bil raziskati in pojasniti učinek izotonične in hipotonične raztopine cisplatina na izražanje survivina *in vitro*. Mezoteliomsko celično linijo H2052 smo za 15 minut tretirali s 0, 1 in 10 µg/mL cisplatina v hipotonični in izotonični raztopini in celice nato za 48 ur inkubirali. Izolirani smo RNA in s pomočjo qRT-PCR določili raven izražanja survivina. Prejšnje raziskave so nakazovale, da je cisplatin v hipotonični raztopini učinkovitejši kot v izotonični raztopini, kar je potrdila tudi naša raziskava ($p=0.031$). Opazili smo tudi povečano izražanje survivina pri celicah, ki so bile tretirane s cisplatinom v primerjavi z netretiranimi celicami. Naši rezultati kažejo, da se izražanje survivina poveča, ko je povzročen stres s strani cisplatina. Seveda so za potrditev teh dejstev potrebne še nadaljnje raziskave, vendar lahko rečemo da je survivin zelo verjetno vpleten v uspešnost zdravljenja pri MPM.

Key documentation information

Name and SURNAME: Sanja OZIMIČ

Title of the final project paper: *In vitro* effect of cisplatin treatment on survivin expression

Place: Koper

Year: 2014

Nuber of pages: 31 Number of figures: 8

Number of references: 36

Mentor: assist. prof. Julija Hmeljak, PhD

Keywords: effect of cisplatin on survivin expression, qRT – PCR, asbestos, apoptosis, malignant pleural mesothelioma

Abstract:

Malignant pleural mesothelioma is an aggressive disease that arises from the mesothelial cells of the pleura. It is caused by asbestos exposure. Malignant pleural mesothelioma is an incurable disease often resistant to conventional treatments. The incidence of MPM is rising and new therapeutic treatments are desperately needed. The inhibitor-of-apoptosis protein family member survivin (BIRC5) is involved in apoptosis by inhibiting caspases 3 and 7. Survivin is highly expressed in human malignant tumors, whichmakes it a very interesting and promising target for new anticancer treatments. Survivin expression is regulated by proteins in cell cycle. Survivin is also involved in cell proliferation and cellular stress response. Cisplatin is an anticancer drug and it is used in many cancer treatments. Its main problems are resistance and toxicity, which impair its efficacy. Cisplatin inhibits replication and DNA transcription and also leads to apoptosis. We can say that survivin expression is linked with malignant cell resistance. The aim of the present study was to elucidate the effects of isotonic and hypotonic cisplatin treatment on survivin expression levels *in vitro.* The survivin expressing human malignant pleural mesothelioma cell line H2052 was treated with 0, 1 and 10 μg/mL cisplatin in either hypotonic or isotonic solution for 15 minutes and then incubated for 48 hours. RNA was isolated and survivin expression levels were assessed at the transcription level with qRT-PCR. Previous studies suggested that hypotonic cisplatin treatment is more effective, which was confirmed in our study ($p=0.031$). We found a sharp increase in survivin expression in cisplatin-treated compared to untreated cells. Our results show that survivin expression increases in response to cisplatin-induced stress. For confirmation, further studies are needed, but our present results indicate that survivin is indeed very likely involved in chemotherapy response.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so na kakršenkoli način pripomogli k izdelavi moje zaključne naloge. Bodisi s svetovanjem, spodbudno besedo ali s podanimi izkušnjami.

Posebna zahvala gre mentorici doc. dr. Juliji Hmeljak, najprej za dano priložnost za izdelavo zaključne naloge pod njenim mentorstvom ter nato za vso pedagoško in strokovno svetovanje pri izdelavi te naloge. Prav tako za njen čas, neprecenljive nasvete in podane izkušnje. Hkrati pa tudi za zaupanje in za omogočanje nabiranja dragocenih izkušenj in znanj pri delu v laboratoriju. Rada bi se zahvalila tudi za možnost udeležbe na 7th Conference on Experimental and Translational Oncology, ki je potekala od 20-24.4 2013 v Portorožu.

Zahvala gre tudi zaposlenima na UP Fakultete za vede o zdravju Izola dr. Mitji Raku in asis. Nataši Tešić, prav tako za zaupanje glede uporabe njihovega laboratorija ter pisarne, ter da sta večkrat odstopila laboratorij meni in moji mentorici, kljub temu da sta imela vsak svoje delo.

Zahvaljujem se tudi komisiji za oceno moje zaključne naloge, za pregled besedila in strokovne opombe.

Velika zahvala gre Urbanu Kuneju za vso pomoč in podporo pri izdelavi zaključne naloge, za vse kave in za vso vzdrževanje družabnega življenja, kljub delu. Še za vsa študijska leta nazaj. Ter prav tako vsem ostalim prijateljem za vzpodbudne besede.

Hvala pa seveda tudi mami, očetu in bratu za vse, kar sem, in za vse ostalo.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 1

1.1 Maligni plevralni mezoteliom 1

1.1.1 Definicija 1

1.1.2 Histološki tipi MPM 2

1.1.3 Pojavnost MPM 3

1.1.4 Klinična slika in zdravljenje 4

1.1.5 Napovedni dejavniki 4

1.2 Survivin 4

1.2.1 Splošno o survivinu 4

1.2.2 Vloga survivina pri proliferaciji in apoptozi 5

1.2.2.1 Proliferacija 6

1.2.2.2 Apoptoza 6

1.2.3 Survivin v onkologiji 7

1.2.4 Izražanje survivina pri malignem plevralnem mezoteliomu 7

1.2.5 Terapevtska vloga survivina 7

1.3 Cisplatin 8

2 METODE IN MATERIALI 9

2.1 Celična kultura 9

2.2 Tretiranje celic s cisplatinom kot kemoterapevtikom 9

2.3 Transfekcija s protisurvivinskim siRNA 9

2.4 Izolacija celokupne RNA 10

2.5 Določitev koncentracije celokupne RNA 10

2.6 Reverzna transkripcija 11

2.7 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo 11

2.8 Določitev ravni izražanja survivina 11

2.9 Test preživetja *in vitro* (test klonogenosti) 12

3 REZULTATI 13

3.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo 13

3.2 Tretiranje celic s cisplatinom kot kemoterapevtikom 14

3.3 Test preživetja 14

3.4 Relativno izražanje survivina glede na preživetje celic 16

4 RAZPRAVA 17

5 ZAKLJUČKI 19

6 LITERATURA 20

KAZALO SLIK

Slika 1: Histološki tipi malignega plevralnega mezotelioma. A: Epiteloidni histološki tip. B: Sarkomatoidni histološki tip. 3

Slika 2: Prikaz zgradbe beljakovin družine IAP 5

Slika 3: Prikaz štirih faz apoptoze 6

Slika 4: Strukturna formula cisplatina. 8

Slika 5: Izražanje survivina pri celični liniji H2052 13

Slika 6: Povprečne vrednosti deleža preživetja celic (SF) pri celični liniji H2052 14

Slika 7: Spremembe v morfologiji celic H2052 48 h po tretiranju z različnimi koncentracijami cisplatina. Pri sliki H opazimo največji učinek na preživetje celic (10 µg/mL cisplatina) 15

Slika 8: Relativno izražanje survivina glede na preživetje celic 16

SEZNAM KRATIC

BIR bakulovirusna IAP ponovitev, angl. baculoviral IAP repeat

BIRC5 beljakovina, ki vsebuje bakulovirusno IAP ponovitev 5, angl. baculoviral IAP repeat containing 5; sin. Survivin

CDDP cis-diamin diklor platina, cisplatin

DNA deoksiribonukleinska kislina, angl. deoxyribonucleic acid

EKG elektrokardiogram

IAP inhibitor-of-apoptosis protein

MPM maligni plevralni mezoteliom

PBS s fosfatnim pufrom pufrana fiziološka raztopina, angl. phosphate buffered saline

qRT-PCR kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem casu z reverzno transkripcijo

RNA ribonukleinska kislina, angl. ribonucleic acid

SF delež preživetja, surviving fraction

1 UVOD

Maligni plevralni mezoteliom (MPM) je agresivna oblika raka, ki vznikne iz mezotelijskih celic plevre. Za glavnega povzročitelja bolezni velja azbest, ki je bil eden najuporabnejših materialov v drugi polovici 20. stoletja (Carbone in sod., 2007). Med izpostavitvijo azbestu in razvojem MPM lahko poteče več let, zato je pojavnost MPM šele sedaj v porastu. MPM je kronična neozdravljiva bolezen, odziv na terapije je slab in zato je potreba po novih terapevtskih pristopih vedno večja. Vedno več pozornosti raziskovalci namenjajo survivinu, ki je zaradi svojega omejenega izražanja potencialna tarča za razvoj ciljanih protirakavih terapij. Survivin je beljakovina iz družine IAP (inhibitors-of-apoptosis proteins) katerih funkcija je zaviranje apoptoze. Survivin inaktivira kaspazi 3 in 7 kar privede do negativne regulacije programirane celične smrti (Alain in sod., 2008). Močno se izraža pri večini človeških malignih tumorjev, je pa v celoti odsoten pri terminalno diferenciranih celicah, kar pri terapiji omogoča osredotočenje samo na maligne celice. Survivin sodeluje pri proliferaciji celic in tudi pri celičnemu odgovoru na stres povzročen s cisplatinom. Cisplatin je kemoterapevtik izbora pri številnih rakavih obolenjih. Zaradi težjega prehajanja skozi membrane, so pri terapijah prisiljeni uporabljati višje odmerke cisplatina, kar pa zaradi njegove toksičnosti privede do večjih stranskih učinkov. Cisplatin zavira replikacijo in transkripcijo DNA in vodi tudi do apoptoze (Shukla in sod., 2008). Novejše raziskave nakazujejo, da je izražanje survivina povezano z razvojem odpornosti rakavih celic proti cisplatinu (Hmeljak, 2011).

Namen naše raziskave je raziskati in pojasniti kako na izražanje survivina vpliva stres, ki ga povzročimo s kemoterapevtikom cisplatinom. Gledali bomo učinek izotonične in hipotonične raztopine cisplatina na izražanje survivina. Mezoteliomsko celično linijo H2052 bomo za 15 minut tretirali s 0, 1 in 10 μg/mL cisplatina v hipotonični in izotonični raztopini in celice nato za 48 ur inkubirali. Izolirani bomo RNA in s pomočjo qRT-PCR določili raven izražanja survivina.

Za naš cilj smo si zadali hipotezo: V mezoteliomskih celicah se izražanje gena za survivin poveča zaradi stresa, ki ga povzroči kemoterapevtik cisplatin.

Z dobljenimi rezultati bomo v zaključni nalogi poskušali to hipotezo potrditi ali ovreči.

1.1 Maligni plevralni mezoteliom

Maligni plevralni mezoteliom (MPM) je zelo agresiven maligni tumor seroznih površin, ki ga najpogosteje odkrijemo na prsni mreni (Kovač, 2012). Je terapevtsko zelo odporna oblika raka, ki se globalno vedno bolj razširja (Robinson in sod., 2005).

1.1.1 Definicija

MPM vznikne iz mezotelijskih celic plevre zaradi maligne transformacije (Hmeljak in Cör, 2012). Ker je več kot 80 odstotkov bolnikov z MPM v stiku z azbestom, sklepamo, da je najpogostejši dejavnik za MPM izpostavljenost azbestnim vlaknom, ki so bila v uporabi

predvsem v drugi polovici 20. stoletja. Tone azbesta, ki so bile takrat izkoriščene, predstavljajo veliko nevarnost za današnje in prihodnje generacije. Raziskave o azbestu vključujejo širšo publiko, od pacientov, politikov, znanstvenikov, sindikatov, odvetnikov in širše javnosti (Carbone in sod., 2007). Primerjava podatkov o incidenci MPM in o porabi azbesta kaže, da gibanje pojavnosti sledi gibanju porabe azbesta z zamikom približno 20 let (Robinson in sod., 2005). Za MPM je značilna zelo dolga inkubacijska doba in terapija je v večini primerov neučinkovita, saj le redki pacienti preživijo dlje kot eno leto po diagnozi (Hmeljak in Cör, 2012). Med drugimi dejavniki tveganja se navajajo še ionizirajoče sevanje, mineralna olja in tekoči parafin, ponavljajoče se okužbe pljuč, tuberkulozno vnetje plevre, izpostavljenost bakru, niklju ter steklenim vlaknom (Kang in sod., 2006).

MPM še vedno velja za redko bolezen, kljub temu da krivulja njegove pojavnosti v zadnji dekadi strmo narašča in se naj ne bi umirila vsaj do leta 2020 (Robinson in sod., 2005). Glede na naraščajočo pojavnost MPM ter na nezadovoljivo učinkovitost protitumorskih terapij, je nuja po odkritju novih učinkovitejših terapij za bolnike z MPM velika (Hmeljak in Cör, 2012). Najpomembnejše pri odkrivanju učinkovitejših terapij je razumevanje razlik med normalnimi in malignimi celicami. Na temelju teh razlik bi bilo mogoče odkriti potencialne tarče, na katere bi lahko ciljali s terapijami. Tarče lahko najdemo med proteini, ki sodelujejo pri za rakave celice značilnih procesih in so prisotni pri maligni preobrazbi celic ali imajo vidnejšo vlogo pri procesu kancerogeneze (Hanahan in Weinberg, Hallmarks of Cancer, 2011).

Mezotelijske celice tvorijo enoskladni epitelij, ki pokriva površino seroznih membran in notranjih organov. Primarna funkcija mezotelijskih celic je, da zagotovijo spolzko, neadhezivno zaščitno površino, ki ščiti pred trenjem. Opravljajo še vrsto drugih funkcij, kot je transport tekočin in celic samih skozi serozne votline, vnetje in obnavljanje tkiv, koagulacija ter adhezija tumorskih celic. Poškodbe mezotelija sprožijo dogodke, ki povzročijo ločitev in migracijo mezotelijskih celic. Celice se oluščijo v serozno tekočino, migrirajo in se ponovno pritrdijo na mesto poškodbe (Mutsaers, 2004).

MPM ne tvori enotne tumorske mase, pojavlja se difuzno in je lokalno zelo intenziven. Mezoteliom se v prvi vrsti širi po plevralni površini (Novakovič in sod., 2009). V zgodnji fazi MPM se najprej pojavijo manjši vozlički v parientalni plevri, nato pa se pričnejo razširjati po površini plevre. Sčasoma se tumor se razširi po celotnem parenhimu pljuč (Inai, 2008). Značilno je, da MPM redko tvori oddaljene metastaze, če že pa se te pojavijo v poznih stadijih bolezni (Novakovič in sod., 2009).

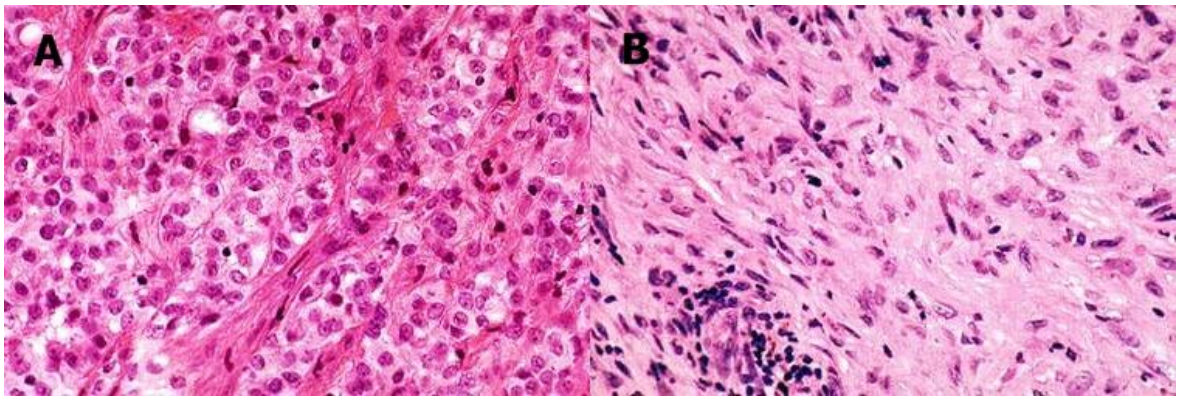
1.1.2 Histološki tipi MPM

Po histološki klasifikaciji MPM delimo na tri večje tipe: epiteloidni, sarkomatoidni in bifazni histološki tip. Najpogostejši, potrjen v 60 % primerov, je epiteloidni histološki tip, sledi mu sarkomatoidni z 20 %, bifazni histološki tip MPM pa je prisoten v 20 %

primerov. Vrednosti odstotkov se sicer od literature do literature razlikujejo, saj so pri opredelitvi določenega histološkega tipa lahko kriteriji zelo različni (Inai, 2008).

V večini primerov je epiteloidni tip MPM najbolj podoben karcinomom, saj tvori papilarne, nodularne in tubularne mikroskopske strukture. Značilno je občasno tvorjenje metastaz v regionalnih limfnih vozličkih, delni odziv na radioterapijo in izliv v serozne votline (Law in sod., 1982). Celice epiteloidnega tipa MPM so velike in imajo velika, pogosto vakuolizirana jedra. Značilno je predvsem lokalno širjenje.

Sarkomatoidni histološki tip MPM je podoben sarkomu, predvsem zaradi obsežnih depozitov kolagena. V primerjavi z epiteloidnim sarkomatoidni pogosteje tvori oddaljene metastaze, izliv v serozne votline pa se pojavi redko.



Slika 1: Histološki tipi malignega plevralnega mezotelioma. A: Epiteloidni histološki tip. B: Sarkomatoidni histološki tip. Povzeto po: http.//www.mesotheliomaclinic.org/

Bifazni ali mešani histološki tip MPM pa ima lastnosti tako epiteloidnega kot sarkomatoidnega tipa. Bifazni MPM pogosto povzroča plevralni izliv in pogosteje tvori oddaljene metastaze (Law in sod., 1982).

1.1.3 Pojavnost MPM

MPM predstavlja resen zdravstveni problem, saj je agresivna oblika raka z zelo slabimi rezultati terapij. V večini raziskav je moč zaslediti, da je največja pojavnost MPM v industrijsko razvitih državah kot so Avstralija, Belgija in Velika Britanija, kjer je bila poraba azbesta največja. V teh državah letno diagnosticirajo 30 primerov na milijon, v industrijsko manj razvitih državah pa je pojavnost relativno nizka, vendar narašča (Bianchi in sod., 2007). Nekaj raziskav je bilo opravljenih tudi v Sloveniji, in sicer naj bi se v zadnjih 15 letih pojavnost MPM več kot podvojila in je v letu 2007 znašala 1,5 na 100.000 prebivalcev, povprečna starost ob diagnozi pa je bila 63 let (Onkološki Inštitut, 2010). V Sloveniji je sicer uporaba azbesta prepovedana že 18 let ampak, ker je bila proizvodnja azbesta največja v 80. letih prejšnjega stoletja, lahko glede na inkubacijsko dobo MPM pričakujemo, da bo incidenca MPM še naraščala in s tem bo naraščalo tudi breme te bolezni (Kovač, 2012).

Povezava med azbestom in MPM je bila potrjena že leta 1960 (Wagner in sod., 1960). Azbest je skupno ime za veliko naravnih silikatnih mineralnih vlaken. Ta vlakna so bila zelo uporabna v gradbeništvu in industriji, saj so odporna proti kislini in visokim temperaturam, negorljiva, čvrsta in široko dostopna. Azbestna vlakna veljajo za nevarna predvsem zaradi njihove oblike in lahke lomljivosti, ki jim omogoča vdor v celice in medcelični prostor. Fizično poškodujejo kromatin, organele in druge celične strukture. Sprožajo tudi vnetne procese, povzročajo oksidativne poškodbe DNA, encimov in membran (Heintz in sod., 2010).

1.1.4 Klinična slika in zdravljenje

Simptomi se pri MPM razvijajo počasi in klinična slika je dokaj neznačilna, zato je diagnoza pogosto postavljena zelo pozno. Ponavadi od prvih bolezenskih simptomov do dokončne postavitve diagnoze poteče od tri do šest mesecev (Kovač, 2010). Najprej se pojavijo težko dihanje, bolečine v prsih ter hujšanje. Ker so zgodnji simptomi tako nespecifični, je diagnostika zapletena in je potrebnih več različnih preiskav. Najprej se opravijo slikovne diagnostične preiskave, za določitev razširjenosti bolezni pa se opravi tudi funkcionalna diagnostika (Novakovič in sod., 2009 in Kovač, 2010). Ključnega pomena za dokončno postavitev diagnoze pa je histološka analiza (Inai, 2008). MPM je kronična neozdravljiva bolezen. MPM poskušajo zdraviti kirurško, s kemoterapijo oziroma s sistemskim, kombiniranim ali paliativnim zdravljenjem. Za trenutno najbolj uspešno obliko zdravljenja velja kemoterapija, včasih v kombinaciji s kirurgijo. S kliničnimi raziskavami so ugotovili, da sta novejša citostatika gemcitabin in pemetreksed v kombinaciji s cisplatinom relativno uspešna (Kovač, 2010).

1.1.5 Napovedni dejavniki

Med napovedne dejavnike prištevamo klinične merljive lastnosti bolnika ali bolezni, na podlagi katerih lahko napovemo izid bolezni in s pomočjo katerih bi lažje določili natančnejšo diagnozo in na podlagi le te izbrali najprimernejši pristop k zdravljenju (Steele in sod., 2005). Med dobro raziskane napovedne dejavnike spadajo starost ob diagnozi, spol, izguba telesne teže, stanje bolnikove zmogljivosti in histološki tip tumorja. Bolniki, mlajši od 60. let ter bolniki z epiteloidnim histološkim tipom MPM imajo najboljšo prognozo (Edwards in sod., 2000).

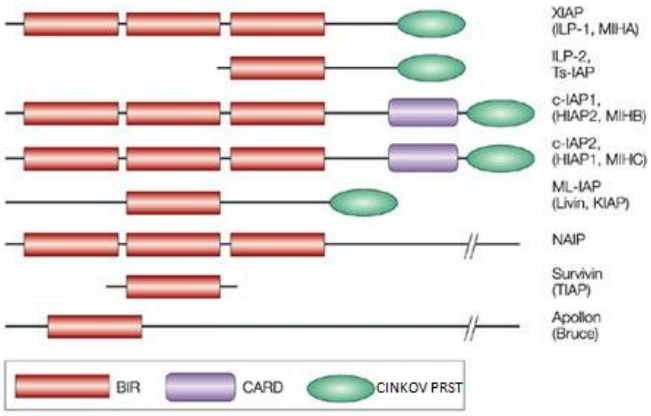
1.2 Survivin

Survivin ali BIRC5 (baculoviral inhibitor-of-apoptosis repeat-containing 5) je beljakovina, ki sodi v družino IAP (inhibitor-of-apoptosis protein) in je eden najpomembnejših zaviralcev apoptoze (Reed, 2001).

1.2.1 Splošno o survivinu

Survivin in vse ostale beljakovine družine IAP imajo značilno strukturo, vsem je skupen približno 70 aminokislin velik cinkov prst t.i. domena BIR (baculoviral IAP repeat), ki je

nujna za zaviranje apoptoze in je prisotna v eni do treh ponovitvah. Skupaj poznamo 8 beljakovin IAP: NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, Ts-XIAP, ML-IAP, apollon in survivin. Človeški gen za survivin se nahaja v telomernem delu kromosoma 17 (17q25) in ga tvorijo štirje eksoni in trije introni (Reed, 2001). Survivin ima samo eno kopijo BIR domene in je pa najmanjši pripadnik IAP družine (16,5 kDa). V celicah je prisoten v mitohondriju, jedru in citosolu (Altieri, 2003). Survivin se močno izraža pri skoraj vseh oblikah človeških tumorjev in fetalnih tkivih, je pa popolnoma odsoten pri terminalno diferenciranih celicah. Zaradi njegovega značilnega izražanja je survivin idealna tarča za nadaljnje protirakave terapije.



Slika 2: Prikaz zgradbe beljakovin družine IAP. Povzeto po: http.//www.nature.com/

Primarna vloga survivina je inhibicija aktivacije kaspaz 3 in 7, kar privede do negativne regulacije programirane celične smrti (Alain in sod., 2008). Predvidevajo, da ima survivin pomembno vlogo tudi pri regulaciji mitoze, saj se vključi v mitotično delitveno vreteno, kjer se poveže s tubulinom in tako skrbi za pravilno vezavo kondenziranih kromosomov na niti delitvenega vretena (Pižem in Cör, 2003).

1.2.2 Vloga survivina pri proliferaciji in apoptozi

Survivin se nahaja v jedru, citoplazmi in mitohondrijih, kar je povezano z njegovim delovanjem pri zaviranju apoptoze in celični delitvi. Oba procesa sta odvisna od kontrolnih mehanizmov, ki so strogo medsebojno povezani in s tem zagotavljajo homeostazo. Med njimi je tudi več različnih beljakovin, ki so skupne obema procesoma, zato je uravnavanje ravnovesja med tema procesoma zelo pomembno. Porušenje le-tega je ena izmed pomembnih funkcij pri nastajanju malignih tumorjev (Hmeljak in Cör, 2012).

1.2.2.1 Proliferacija

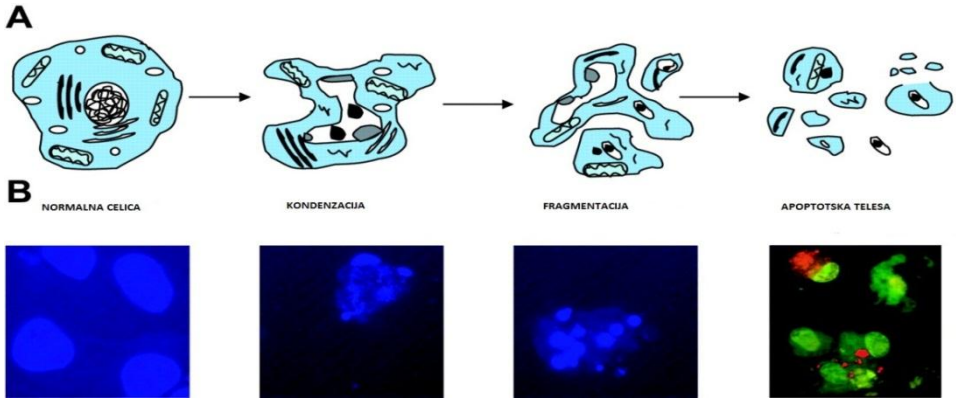
Proliferacija je proces delitve in rasti celic v tkivih in je, tako kot apoptoza, zelo natančno reguliran proces, pri katerem survivin spodbudi proliferacijo z direktnim spajanjem in stabilizacijo mikrotubulov mitotskega delitvenega vretena in z regulacijo ločevanja kromosomov. Značilnost rakavih celic je, da se lahko delijo kljub okvarjenim rastnim faktorjem, ki zaradi odsotnosti pravih ligandov niso več aktivni, in kljub napakam genoma (Hanahan in Weinberg, Hallmarks of cancer, 2011).

1.2.2.2 Apoptoza

Organizem uporablja dva procesa za odpravljanje poškodovanih celic, nekrozo in apoptozo. Nekroza je odmrtje celic oziroma tkiva, povzročijo jo zunanji dejavniki kot so razne okužbe, poškodbe in toksini. Velja za nečisto obliko celične smrti, saj ima škodljiv vpliv na zdrave celice, in skoraj vedno nekroza privede do vnetja. Apoptoza pa je v nasprotju z nekrozo čista oblika celične smrti, kjer se poškodovane, okužene in nepotrebne celice odstranijo in s tem ne vplivajo na ostale zdrave celice in njihovo celično mikrookolje. Kromatin se kondenzira, DNA se fragmentira in nastanejo apoptotska telesa, ki jih makrofagi s fagocitozo odstranijo in tako celica izgine brez vnetnega procesa. Apoptozo lahko sprožijo zunajcelični dejavniki (signali smrti), ki se vežejo na membranske receptorje ali pa znotrajcelični dejavniki (poškodba DNA, stradanje), ki delujejo na mitohondrije (Russo in sod., 2006).

Proces apoptoze poteka v 4 zaporednih fazah, katere sprožijo različnih signali:

1. ZAČETEK: celica sprejme proapoptotične signale
2. SPROŽENJE: nepovratno se prične apoptotična kaskada
3. POSPEŠITEV: katabolne reakcije, ki jih izvajajo kaspaze
4. IZVRŠITEV: Pride do morfoloških sprememb. Kromatin se zgosti, organi so tesno skupaj, celica se skrči, celična membrana se naguba, sledi razpad na apoptotska telesca.



Slika 3: Prikaz štirih faz apoptoze. Povzeto po: http.//www.ajprenal.physiology.org/

Zaviralci apoptoze pripadajo dvema genskima družinama Bcl-2 in IAP. Pripadniki Bcl-2 družine na ravni mitohondrija uravnavajo apoptozo. Nekateri izmed njih apoptozo spodbujajo (Bak, Bax Bid), nekateri pa zavirajo (Bcl-2), natančni mehanizmi njihovega delovanja pa še niso poznani (Pižem in Cör, 2001). Med IAP pa spada survivin, ki inhibira apoptozo, saj veže in inaktivira kaspazi 3 in 7 in tako ustavi fazo sproženja in pospeševanja apoptoze (Pižem in Cör , 2003).

Apoptoza je eden izmed glavnih načinov izgube tumorskih celic, zato se onkologija osredotoča na sproženje apoptoze, ki je lahko spontana ali pa spodbujena s strani kemoterapije (Lowe in Lin, 2000). To kaže na survivin kot na eno izmed potencialnih tarč protirakavega zdravljenja. Če bi lahko zavrli delovanje survivina, bi s tem omogočili normalno delovanje kaspaz 3 in 7 ter s tem apoptozo.

1.2.3 Survivin v onkologiji

Zelo malo protirakavih terapevtskih tarč je tako obetavnih kot survivin. Survivin je prav zaradi svojega značilnega izražanja pritegnil toliko pozornosti raziskovalcev. Izraža se v embrionalnih tkivih ter v malignih celicah, je pa odsoten v terminalno diferenciranih celicah. V zelo nizkih koncentracijah ga sicer lahko najdemo v endotelijskih celicah, črevesnih žlezah in sluznici materničnega vratu (Pižem in Cör, 2003). V večini primerov ima survivin negativno napovedno vlogo, se pa najdejo tudi primeri pri katerih ima pozitivno napovedno vlogo, kot je na primer rak dojke (Hmeljak in Cör, 2012).

1.2.4 Izražanje survivina pri malignem plevralnem mezoteliomu

Survivinova negativna napovedna vloga pri razvoju, napredovanju in prognozi MPM še ni razjasnjena. Pri tistih raziskavah, kjer je MPM bil vključen, so rezultati med seboj si nasprotujoči. Kljub temu so uspeli potrditi da ima survivin pri MPM negativno napovedno vlogo in da je pri MPM prisotno intenzivno izražanje survivina (Hmeljak in Cör, 2012). Natančnejši podatki so bili pridobljeni s pomočjo imunohistokemijskih metod, kjer so Gordon in sod. dokazali survivin v 76 % primerov MPM (Gordon in sod, 2007), Klabatsa in sod. v 77 % primerov (Klabatsa in sod., 2005) in Kleinberg in sod. v 64 % primerov MPM (Kleinberg in sod., 2007). V eni izmed zadnjih objavljenih raziskav pa je vseh 101 bolnikov z MPM bilo pozitivnih na survivin (Hmeljak, 2011). Iz teh podatkov lahko sklepamo, da je survivin v MPM prisoten in ga pri protirakavem zdravljenju ne bi smeli spregledati.

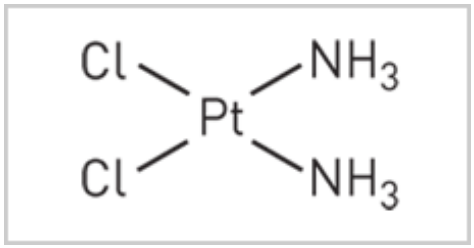
1.2.5 Terapevtska vloga survivina

Največkrat uporabljena in zaenkrat najučinkovitejša metoda zdravljenja MPM je sistemska kemoterapija s cisplatinom. Na področju protisurvivinskih terapij razvoj še poteka in je v predklinični fazi. Xia in sod. so z inhibicijo survivina zmanjšali število preživelih celic MPM in povečali občutljivost na radioterapijo, s čimer so dokazali, da z vplivanjem na survivin lahko povzročimo tako spontano kot spodbujeno apoptozo, kar je cilj protirakavega zdravljenja (Xia in sod., 2002). Izražanje survivina narašča v času maligne

transformacije in je v korelaciji z naraščajočim malignim fenotipom, vendar ni znano, če je survivin vzrok ali posledica maligne transformacije (Hmeljak in Cör, 2012).

1.3 Cisplatin

Cisplatin (cis-diamin diklor platina, CDDP) je citostatik s širokim protitumorskim delovanjem in ga uporabljamo za zdravljenje številnih tumorjev tako v monoterapiji kot v kombinaciji z drugimi citostatiki (Novakovič in sod., 2009). Cisplatin zamreži DNA in tako prepreči podvajanje pred celično delitvijo ter izzove apoptozo delečih se celic (Shukla in sod., 2008). Za dosego učinka pa so pri protitumorskem zdravljenju primorani uporabljati višje odmerke cisplatina, saj ima cisplatin oteženo prehajanje skozi membrane. Zaradi višjih odmerkov je večje tudi število stranskih učinkov. Sistemski stranski učinki so slabost, bruhanje, okvara sluha, nefrotoksičnost, nevrotoksičnost in okvara ledvičnih tubulov (Novakovič in sod., 2009).



Slika 4: Strukturna formula cisplatina. Povzeto po: http.//www.pubs.acs.org/

Uporaba cisplatina pa ni omejena zgolj na sistemsko aplikacijo, ampak vključuje tudi novejše pristope, kot je aplikacija cisplatina v telesne votline. Pri takem načinu gre za lokalno aplikacijo kemoterapevtika neposredno na tumor, vendar se pri plevralnih malignomih žal še ne uporablja (Rossi in sod., 2003). Poleg intraplevralne aplikacije kemoterapevtikov pa za zdravljenje MPM proučujejo možnost genskega zdravljenja, pri katerem preko vnosa nukleinskih kislin nadomestimo, spremenimo ali utišamo izražanje genov. Zaradi lastnosti kot sta odsotnost oddaljenih metastaz in lahka dostopnost tumorja zaradi lege na površini plevre, bi lahko bila uporaba genske terapije učinkovita (Albeda in sod., 2009).

2 METODE IN MATERIALI

Za našo raziskavo smo izbrali humano mezoteliomsko celično linijo H2052 (NCI-H2052). Celice smo najprej gojili v gojišču. Ko so bile celice pripravljene za uporabo, smo jih tretirali s tremi različnimi koncentracijami cisplatina, jih nato ponovno inkubirali in pripravili za nadaljnje poskuse. Za pozitivno kontrolo utišanja izražanja survivina smo izbrali metodo utišanja survivina s transfekcijskimi molekulami siRNA in ko smo dosegli učinkovitost utišanja, je sledila izolacija celokupne RNA ter nato določanje koncentracije celokupne RNA s pomočjo flourimetričnega sistema. Po končanem postopku reverzne transkripcije, kjer smo dobili vzorce cDNA, je sledila kvantitativna verižna reakcija s polimerazo, s pomočjo katere smo lahko določili raven izražanja survivina. Na koncu naše raziskave smo naredili še test preživetja, kjer smo opazovali za kolikšen odstotek se je zmanjšal delež preživetja s cisplatinom tretiranih celic.

2.1 Celična kultura

Za vse poskuse smo uporabljali humano mezoteliomsko celično linijo H2052 (NCI-H2052): mezoteliomska, izolirana iz malignega plevralnega izliva, ATCC koda CRL-5915. Celice smo gojili v gojišču RPMI 1640 z dodatkom 5 % fetalnega govejega seruma, glutamina v obliki GlutaMAXa in 30 μg/mL antibiotika gentamicina (vse Gibco, Carlsbad, CA, ZDA). Celice smo hranili pri 37°C v atmosferi z visoko relativno vlažnostjo in 5 % CO_2. Celice smo rutinsko presajali dvakrat tedensko in za poskuse uporabljali celice do 25. pasaže, ker so takrat celice bile primerne za naše poskuse.

2.2 Tretiranje celic s cisplatinom kot kemoterpevtikom

Za kemoterapijo s cisplatinom smo celice nasadili v ploščo za tkivne kulture z dvanajstimi vdolbinicami. Poskus smo izvajali v treh ponovitvah. Celice smo tretirali s hipo- in izotoničnimi raztopinami cisplatina koncentracij 0, 1 in 10 μg/mL. Izotonične raztopine smo pripravili tako, da smo založno raztopino cisplatina (1 mg/mL) redčili v sterilni s fosfatom pufrani fiziološki raztopini (angl. phosphate uffered saline, PBS), hipotonično pa tako, da smo založno raztopino redčili v sterilni dH_2O. Najprej smo celicam odstranili gojišče nato smo jih sprali s PBS, da smo odstranili ostanke gojišča. Celicam smo nato dodali po 1 mL ustrezne raztopine cisplatina, negativnim kontrolam (celice brez dodatka cisplatina) pa 1 mL svežega gojišča RPMI. Tretiranje s cisplatinom smo izvajali 15 minut pri 37 °C. Nato smo cisplatin odpipetirali, nežno spirali s PBS ter celicam dodali 1 mL svežega gojišča. Celice smo inkubirali pri 37 °C dve uri, da si opomorejo, nato smo jih tripsinizirali in pripravili za nadaljnje poskuse.

2.3 Transfekcija s protisurvivinskim siRNA

Za pozitivno kontrolo izražanja survivina smo uporabili metodo utišanja izražanja s transfekcijo molekul siRNA. Za transfekcijo smo uporabljali kationski lipofekcijski reagent Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) in brezserumsko gojišče OptiMEM

(Gibco). Za utišanje smo uporabljali molekule siRNA, ki se specifično vežejo na mRNA za survivin in posredujejo njeno razgradnjo. Za utišanje smo uporabili transfekcijo, pri kateri pritrjenemu celičnemu enosloju dodamo lipofekcijske komplekse.

Celice smo nasadili v mikrotiterske plošče s 6 vdolbinicami. Nasadili smo $5x10^5$ celic/vdolbinico in inkubirali preko noči v 2,5 mL gojišča RPMI s 5 % FBS brez antibiotikov. Nato smo odstranili gojišče in celice temeljito sprali z gojiščem brez FBS in antibiotikov. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 2,5 mL svežega gojišča RPMI brez FBS in antibiotikov ter dodali po 500 µL kompleksov siRNA-lipofektamin-optiMEM. Uporabili smo 50 pmol (2,5 µl založne suspenzije) posamezne molekule siRNA in 5 µl lipofektamina za vsako vdolbinico. Pri poskusu smo si pripravili tudi tri negativne kontrole. Celice smo inkubirali pri 37 °C 6 ur ter nato gojišče z lipofekcijsko mešanico zamenjali z obogatenim gojiščem RPMI in inkubirali pri 37 °C.

Učinkovitost utišanja na transkripcijski ravni smo določili 48 ur po transfekciji.

2.4 Izolacija celokupne RNA

Za izolacijo celokupne RNA iz celic smo uporabili komercialni komplet reagentov RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). Ravnali smo se po navodilih proizvajalca za izolacijo iz živalskih celic z uporabo centrifuge (angl. animal cells spin protocol). Pred izolacijo smo celice tripsinizirali in prešteli. Za posamezno izolacijo smo uporabili 10^5 celic, ki smo jih lizirali, da smo sprostili celično vsebino, in nato nanesli na izolacijske kolone. Po spiranju s pufroma RW1 in RPE smo izolirano RNA izlužili s kolone z dvojno elucijo po 30 µl vode brez RNAz.

Izolirano RNA smo do nadaljnje uporabe hranili pri -80 °C.

2.5 Določitev koncentracije celokupne RNA

Pred revezrno transkripcijo smo s pomočjo flourimetričnega sistema Qubit in fluorimetričnega kompleta QuantIt (Invitrogen) določili koncentracijo izolirane RNA. V ta namen smo pripravili reakcijsko mešanico pufra in fluorescentnega barvila v razmerju 200:1. S pomočjo priloženih standardov smo napravo kalibrirali. Za meritev koncentracije smo v 190 µl reakcijske mešanice raztopili 10 µl izolata RNA, premešali in inkubirali 2 minuti ter izmerili koncentracijo celokupne RNA. Pri flourimetrični metodi lahko določimo koncentracijo raztopine pri določeni valovni dolžini. Koncentracija vzorca se lahko izračuna iz intenzitete svetlobe pred in po prehodu skozi vzorec. Barva ali valovna dolžina izbranega filtra je izjemno pomembna, saj mora biti valovna dolžina svetlobe fluorimetra enaka valovni dolžini, ki jo absorbira preiskovani vzorec.

2.6 Reverzna transkripcija

Za reverzno transkripcijo smo uporabili komplet za reverzno transkripcijo proizvajalca Qiagen. Reverzno transkripcijo smo izvedli v dveh paralelkah. Za vsako reakcijo smo pripravili 150 ng RNA v končnem volumnu 15 µl.

Vsakemu vzorcu smo dodali 1,5 µl pufra za razgradnjo genomske DNA in inkubirali pri 42 °C 5 minut. Po razgradnji DNA je sledila reverzna transkripcija s po 4 µl mešanice za reverzno transkripcijo. Mešanica je vsebovala encim reverzno transkriptazo, naključne začetne oligonukleotide in RT pufer. Reverzna transkripcija je potekala 15 min pri 42 °C. Ko je reakcija potekla, je bilo reverzno transkriptazo v mešanici potrebno inaktivirati, zato smo vzorce inkubirali 3 minute pri 95 °C. Vzorce cDNA smo shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

2.7 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

Z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času z reverzno transkripcijo (qRT-PCR), smo določili osnovno raven izražanja survivina pri celični liniji H2052. Kot kontrolo smo si izbrali človeški gen za 18s rRNA.

Za vsako reakcijo smo uporabili cDNA, ekvivalentno 20 ng RNA. Detekcijo pomnožkov PCR smo izvedli s tehnologijo TaqMAN, pri kateri poleg začetnih oligonukleotidov reakciji dodamo tudi fluorescentno označeno sondo.

Končni volumen posamezne reakcije je bil 20 µl. Reakcijska mešanica je vsebovala 10 µl TaqMAN zmesi pufra, DNA polimeraze, deoksiribonukleotidov in soli, 1 µl mešanice začetnih oligonukleotidov in fluorescentno označene sonde, 7 µl vode brez nukleaz in 2 µl cDNA. Za zagotovitev optimalnega poteka reakcije PCR smo vse vzorce za pomnoževanje 18s rRNA redčili 100x.

2.8 Določitev ravni izražanja survivina

Za določitev in izračun učinkovitosti izražanja survivina in 18s rRNA smo si pripravili umeritveno krivuljo. Pripravili smo si 4 redčitve cDNA (neredčeno, 10x redčeno, 100x redčeno in 1000x redčeno za survivin in 100x, 1000x, 10 000x in 100 000x redčeno za 18s rRNA). Dobljene vrednosti Ct, smo nanesli na ordinatno os, na abcisno os pa logaritme redčitev cDNA. S pomočjo enačbe, $E=10^{-1/k}$ (E= učinkovitost pomnoževanja, k= naklon premice) in premice smo lahko izračunali učinkovitost pomnoževanja survivina in 18s rRNA. Relativno izražanje survivina pa smo izračunali tako, da smo raven izražanja survivina, ki smo jo določili s qRT-PCR normalizirali na povprečne deleže preživetja (SF) po enačbi:

Relativno izražanje survivina=(raven izražanja survivna)/(SF).

2.9 Test preživetja *in vitro* (test klonogenosti)

Celice H2052 smo tretirali s hipotoničnimi in izotoničnimi raztopinami cisplatina koncentracij 0, 1 in 10 µl/mL za 15 minut pri 37 °C, nato smo netretiranim in tretiranim celicam za 1 uro dodali gojišče, da si opomorejo. Po pretekli 1 uri smo odstranili gojišče, celice tripsinizirali in jih prešteli.

Empirično določeno število celic (700) smo nato nasadili na petrijevke premera 6 cm in jih inkubirali do tvorbe makroskopskih kolonij (10 do 16 dni). Vsak poskus smo ponovili trikrat. Po inkubaciji smo odstranili gojišče, plošče sprali z vodo in barvali z raztopino kristal vijoličnega 10 minut pri sobni temperaturi ter ponovno temeljito sprali. Ker je v raztopini kristal vijoličnega prisoten etanol, smo s tem dosegli tudi fiksacijo kolonij. Zrasle kolonije smo ročno prešteli, izračunali povprečje treh ponovitev ter parametra PE (učinkovitost tvorbe kolonij) in SF (delež preživelih) po enačbah:

PE = (število zraslih kolonij)/(število nasajenih celic) * 100 %

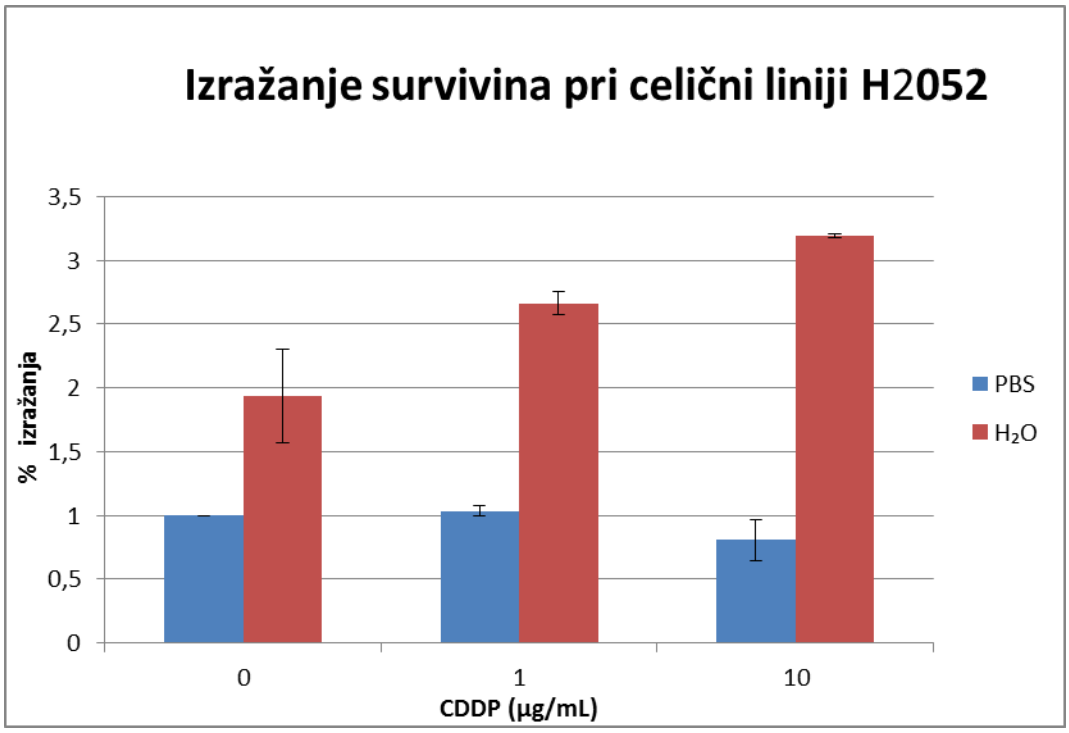
SF = (PE tretirane)/(PE kontrole)

3 REZULTATI

Rezultati naše raziskave so bili v skladu z našimi pričakovanji. Pri kvantitativni verižni reakciji s polimerazo smo dokazali izražanje survivina pri vseh raztopinah cisplatina, večje izražanje pa smo zaznali pri celicah tretiranih s hipotonično raztopino cisplatina. Pri kemoterapiji s cisplatinom smo prav tako opazili večji učinek hipotoničnih raztopin cisplatina, test preživetja pa je pokazal še morfološke spremembe celic. Pri relativnem izražanju survivina je bilo največje izražanje survivina prisotno pri tisti koncentraciji cisplatina, kjer je delež preživetja celic bil najmanjši. S tem smo dokazali da cisplatin zmanjšuje delež preživetja celic, a hkrati vpliva na povečano izražanje survivina.

3.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

Z metodo qRT-PCR smo določili raven izražanja survivina pri celični liniji H2052. Kot kontrolo smo si izbrali človeški gen za 18s rRNA. Ugotovili smo, da preiskovana celična linija izraža survivin na nivoju mRNA.



Slika 5: Izražanje survivina pri celični liniji H2052

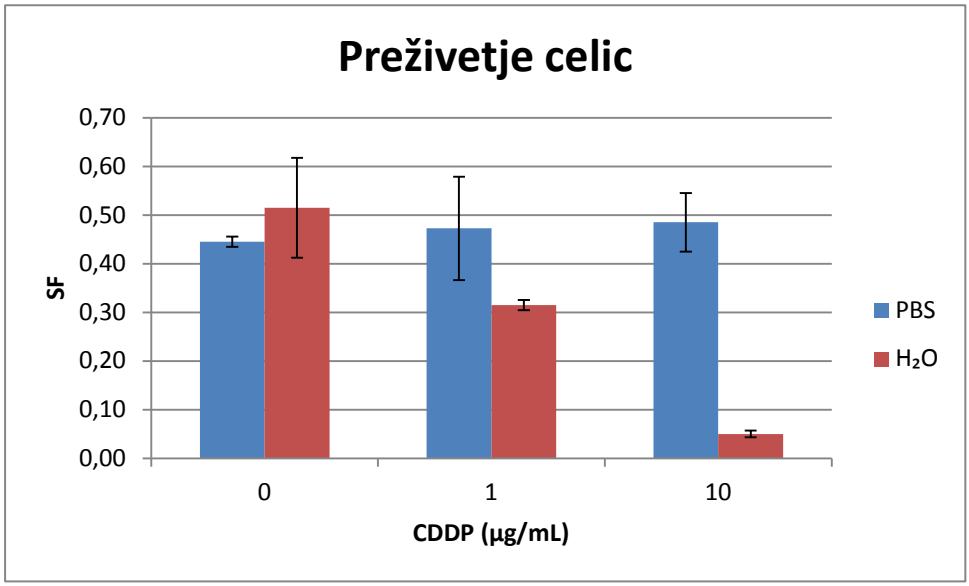
Naši rezultati kažejo, da se izražanje survivina poveča zaradi s cisplatinom povzročenega stresa. Kot je razvidno iz slike (Slika 5), je izražanje survivina povišano pri vzorcih, tretiranih s hipotonično raztopino cisplatina v primerjavi s tistimi, ki so bili tretirani z izotonično raztopino enake koncentracije ($p < 0.05$). Pri celicah, tretiranih z izotonično raztopino, se izražanje survivina ni spreminjalo glede na koncentracijo cisplatina. Obratno pa smo pri s hipotonično raztopino tretiranih vzorcih ugotovili, da je raven izražanja survivina naraščala z naraščajočo koncentracijo kemoterapevtika. Uspeli smo pokazati, da stres povzročen s strani cisplatina pri celici poveča izražanje survivina.

3.2 Tretiranje celic s cisplatinom kot kemoterapevtikom

Celice smo tretirali s hipotoničnimi in izotoničnimi raztopinami cisplatina koncentracij 0, 1, 10 µg/mL v sterilni dH_2O (hipotonična raztopina) in PBS (izotonična raztopina). Ugotavljali smo učinek tretiranja s kemoterapevtikom v izotonični ter hipotonični raztopini. Opazili smo, da tretiranje s hipotonično raztopino cisplatina močneje zmanjša preživetje celic kot tretiranje z izotonično raztopino. Poleg razlik v preživetju celic, smo opazili tudi razlike v morfologiji celic. Celice po tretiranju s hipotonično raztopino so imele skrčeno citoplazmo in so bile slabše pritrjene na podlago. Puščici na delu G in H (Slika 7) prikazujeta celice, katerih morfologija ima značilnosti apoptoze, citoplazma je skrčena in celica ni več takšne oblike kot bi morala biti. Opaziti je večje število celic, ki so morfološko drugačnih oblik, kar je povezano z višjo koncentracijo cisplatina.

3.3 Test preživetja

S testom preživetja smo preverili, kakšen je vpliv na celice pri tretiranju s cisplatinom. Ugotovili smo, da ima hipotonična raztopina večji vpliv, saj so bile vrednosti SF pri tretiranju z 10 µg/mL cisplatina značilno manjše, kot pri celicah tretiranih z izotonično raztopino iste koncentracije cisplatina (Slika 6).

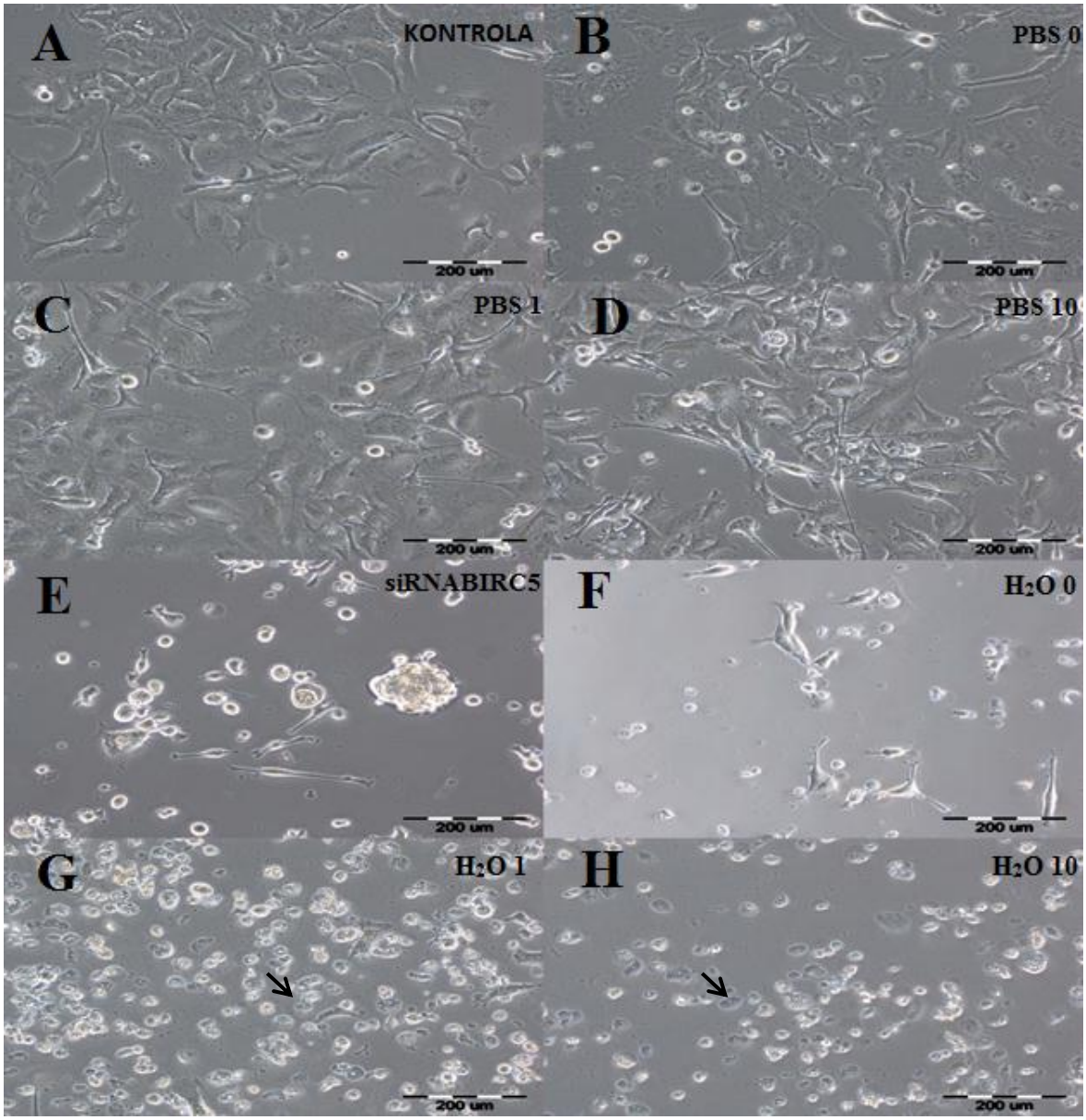


Slika 6: Povprečne vrednosti deleža preživetja celic (SF) pri celični liniji H2052

Največji učinek smo dosegli pri koncentraciji cisplatina 10 µg/mL, saj je delež preživelih celic znašal samo 0.06, v izotonični raztopini pri enaki koncentraciji pa je delež znašal 0.63. Kolonije so bile manjše in celice so bile razporejene bolj kompaktno.

Pri mikroskopiranju (Slika 7) smo poleg zmanjšanega števila pritrjenih celic opazili spremenjeno citoplazmo in večje število celic z morfologijo, značilno za apoptozo. Tudi pri mikroskopiranju je bilo dobro vidno, da ima hipotonična raztopina večji učinek na

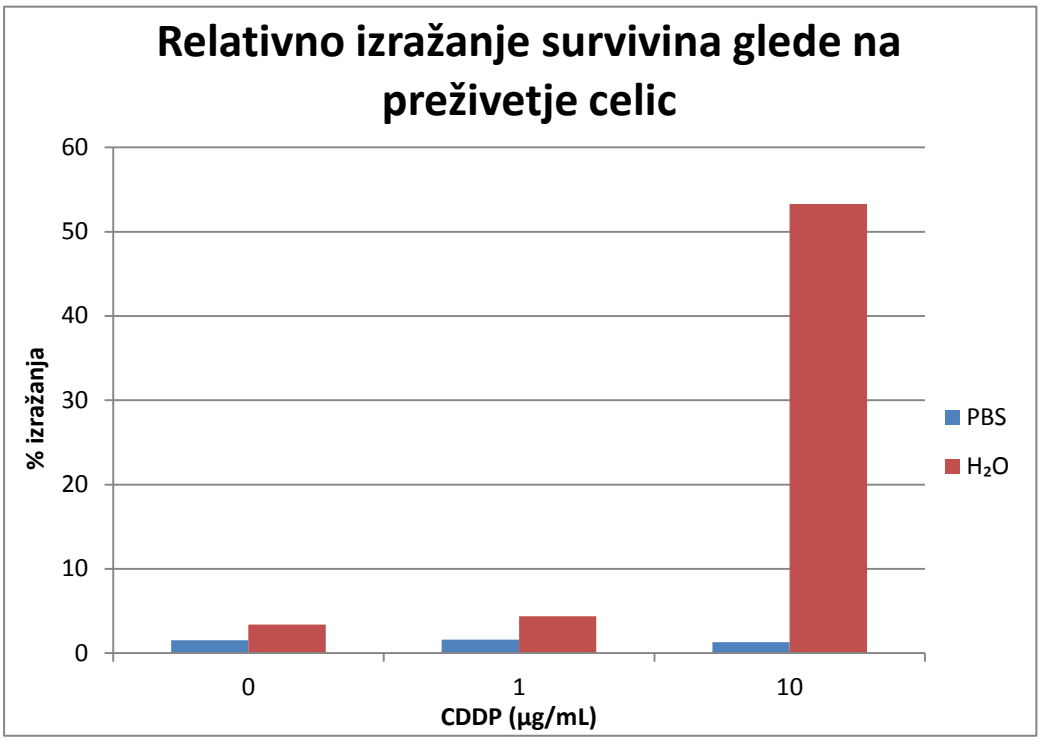
preživetje celic, kot pa izotonična raztopina. Dobljeni rezultati nakazujejo, da cisplatin uspešno zavira rast celic MPM, vpliva pa tudi na izražanje survivina, ki celicam pomaga preživeti stresne razmere.



Slika 7: Spremembe v morfologiji celic H2052 48 h po tretiranju z različnimi koncentracijami cisplatina. Pri sliki H opazimo največji učinek na preživetje celic (10 µg/mL cisplatina)

3.4 Relativno izražanje survivina glede na preživetje celic

Za izračun relativnega izražanja survivna smo raven izražanja survivina, ki smo jo določili s qRT-PCR normalizirali na povprečne deleže preživetja (SF).



Slika 8: Relativno izražanje survivina glede na preživetje celic

Največja dobljena vrednost je bila pri hipotonični raztopini s 10 µg/mL cisplatina in sicer je znašala 53.29, pri izotonični raztopini s 10 µg/mL cisplatina pa je znašala 1.28. Iz tega lahko zaključimo, da se je izražanje survivina znatno povečalo pri tistem tretiranju, kjer je preživelo najmanj celic. Cisplatin je zmanjšal preživetje celic, vplival pa je tudi na survivin, kateri se je zaradi stresa močneje izražal. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo da je dolgoročno čisto možno, da se razvije odpornost celic MPM.

4 RAZPRAVA

Namen naloge je bil ugotoviti, kako s cisplatinom povzročen stres vpliva na izražanje survivina pri MPM. V pogojih *in vitro* smo želeli ugotoviti, kakšno je izražanje survivina, če celice tretiramo z izotonično in hipotonično raztopino cisplatina. Z metodo qRT-PCR smo dokazali izražanje survivina pri celični liniji malignega plevralnega mezotelioma H2052. Naši rezultati kažejo, da se izražanje survivina močno poveča, kadar je povzročen stres s cisplatinom.

Ugotovili smo, da pri celicah, tretiranih s hipotonično raztopino, izražanje survivina najbolj naraste.

Ugotovili smo, da tretiranje z izotonično raztopino cisplatina ne vpliva na raven izražanja survivina, saj se relativno izražanje survivina pri celicah, tretiranih z 1 ali 10 μg/mL cisplatina ni statistično značilno razlikovalo od ravni izražanja netretiranih in samo s PBS tretiranih celic. Povsem drugačen rezultat pa smo dobili pri tistih celicah, ki smo jih tretirali s hipotoničnimi raztopinami. Že samo tretiranje z vodo (hipotonični stres) je povzročilo podvojitev izražanja survivina. Tretiranje z najvišjo koncentracijo cisplatina (10 μg/mL) je povzročilo potrojitev ravni izražanja. Naši rezultati so torej pokazali, da tretiranje celic MPM s hipotoničnimi raztopinami cisplatina nizkih koncentracij (1 μg/mL) že samo po sebi vpliva na izražanje survivina, učinek pa se izrazito poveča pri višjih koncentracijah. Test klonogenosti, ki temelji na reprodukcijski sposobnosti celic, smo uporabili za analizo vpliva tretiranja s cisplatinom na preživetje celic. Delež preživelih celic se je skoraj povsod zmanjšal za 40 %, v nekaterih primerih pa celo za več kot 60 %. Pri celicah, tretiranih s hipotonično raztopino, so bile vrednosti deleža preživetja znatno manjše. Tretiranje s hipotonično raztopino 10 μg/mL cisplatina je povzročilo močan upad preživetja celic, saj je tovrstno tretiranje preživelo le 6 % celic H2052. Za primerjavo, pri isti koncentraciji cisplatina je SF za celice, tretirane z izotonično raztopino, znašala 0,63. Prav tako so bile spremembe morfologije celic izrazitejše pri tretiranju s hipotoničnimi raztopinami cisplatina.

Spremenjeno izražanje survivina povzroči tudi spremembe citoskeleta malignih celic, kar se odrazi na spremenjeni celični morfologiji in kar je najpomembnejše, zmanjša sposobnost migracije malignih celic (Zhang in sod., 2010). To smo opazili tudi pri naših poskusih. Poleg statistično značilnega zmanjšanja števila preživelih celic smo opazili spremembe tudi v zraslih kolonijah in pri mikroskopskemu opazovanju tretiranih celic. Tretirane celice so bile manjše, slabše pritrjene na podlago in spremenjene oblike. Tudi zrasle kolonije so bile manjše, celice v njih pa so bile razporejene bolj kompaktno. Pri testu preživetja smo uspeli potrditi, kar smo opazili že pri kvalitativnem mikroskopiranju tretiranih celic 48 ur po tretiranju, in sicer da ima hipotonična raztopina večji učinek na preživetje celic. Poleg zmanjšanega števila pritrjenih celic smo opazili spremenjeno citoplazmo in večje število celic z morfologijo, značilno za apoptozo.

Pri relativnem izražanju survivina glede na preživetje smo ugotovili, da se je največ survivina izražalo v hipotonični raztopini pri najvišji koncentraciji cisplatina. Iz tega lahko sklepamo da je cisplatin zdravilo, ki zmanjšuje delež preživetja celic, vendar istočasno povečuje izražanje survivina kot odgovor na stres. Survivin, kot lahko razberemo iz uvoda, je lahko pomemben člen pri odpornosti MPM proti zdravljenju. Z našo raziskavo smo ugotovili, da cisplatin sicer uspešno zavira rast celic MPM, istočasno pa vpliva tudi na izražanje survivina, ki celicam pomaga preživeti stresne razmere. Torej bi to lahko dolgoročno pomenilo razvoj odpornosti celic MPM.

Pojavnost MPM je v Sloveniji kljub zakonski prepovedi proizvodnje in uporabe azbesta še vedno v porastu. Vrh naj bi doseglo nekje po letu 2020. Za vedno večje število bolnikov pa je krivo tudi lažje določanje diagnoze MPM, saj se je v tej smeri močno izboljšala diagnostika. Vendar še vedno pa kot glavni krivec nastopa azbest in izpostavljenost le-temu, zato največ obolelih prihaja iz okolice Anhovega (Novakovič in sod., 2009). Pri zdravljenju raka je cilj vsake terapije učinkovito in hitro uničenje tumorskih celic ter da normalne celice ostanejo nepoškodovane. Prav zaradi omejenega izražanja survivina, ki je prisoten samo v tumorskih celicah, je survivin primerna tarča za razvoj takšnih terapij. Z našo raziskavo smo ugotovili, da je lokalna aplikacija cisplatina v hipotonični raztopini eden od možnih pristopov k izboljšanju zdravljenja MPM. Čeprav napovedni pomen survivina trenutno še ni potrjen, so pa raziskave terapevtskega pomena survivina pri MPM zelo smiselne in je survivin več kot primerna tarča za raziskovanje in razvijanje novih strategij zdravljenja MPM.

5 ZAKLJUČKI

Pri tej zaključni nalogi smo postavili naslednjo hipotezo:

V mezoteliomskih celicah se izražanje gena za survivin poveča zaradi stresa, ki ga povzroči kemoterapevtik cisplatin.

Rezultati, ki smo jih dobili, so bili v skladu s pričakovanji in so potrdili našo hipotezo. Pričakovali smo da bo tretiranje celic s cisplatinom povečalo izražanje survivina in vplivalo na celokupno preživetje celic. Hipotezo smo potrdili, saj smo ugotovili, da lokalno apliciran kemoterapevtik v hipotonični raztopini poveča izražanje survivina. Če povzamemo dobljene rezultate, lahko ugotovimo, da se izražanje survivina poveča kot odgovor na s cisplatinom povzročen stres. Na podlagi tega in do zdaj objavljenih študij lahko zaključimo, da je survivin primerna potencialna tarča za nove raziskave ciljanih terapij MPM.

6 LITERATURA

1. Albelda SM., Vachani A., Haas A., Sterman DH. (2009). Gene therapy/immunotherapy and mesothelioma: where are we? J Thorac Oncol, 4: S73-S74.

2. Alderden RA., Hall MD., Hambley TW. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. J Chem Educ, 83 (5): 728.

3. Altieri DC. (2003). Validating survivin as a cancer therapeutic target. Nat Rev Cancer, 3: 46-54.

4. Bianchi C., Bianchi T. (2007). Malignant mesothelioma: Global incidence and relationship with asbestos. Ind Health 45, : 379-87.

5. Cancer in Slovenia 2007. Ljubljana: Institute of Oncology, Registry EaC; 2010.

6. Carbone M., Albelda SM., Broaddus VC., Flores RM., Hillerdal G., Jaurand M-C., Kjaerheim K., Pass HI., Robinson B., Tsao A. (2007). Eight international mesothelioma interes group. Oncogene, 26: 6959-6967

7. Gordon GJ., Mani M., Mukhopadhyay L., Dong L., Edenfield HR., Glickman JN. (2007). Expression patterns of inhibitor of apoptosis proteins in malignant pleural mesothelioma. J Pathol, 211: 447-454.

8. Hanahan D,, Weinberg RA. (2011). The hallmarks of cancer. Cell 100: 57-70.

9. Heintz NH., Janssen-Heininger YMW., Mossman BT. (2010). Asbestos, lung cancers, and mesotheliomas from molecular approaches to targeting tumor survival pathways. Am J Resp Cell Mol, 42:133-139.

10. Hmeljak J. (2011). Napovedna in terapevtska vloga survivina (BIRC5) pri malignem plevralnem mezoteliomu. Doktorska dizertacija, Univerza v Ljubljani.

11. Hmeljak J., Cör A. (2012). The central role of survivin in proliferation and apoptosis of malignant pleural mesothelioma. V: Mesotheliomas-Synonyms and Definition, Epidemiology, Etiology, Pathogenesis, Cyto-Histopathological Features, Clinic, Diagnosis, Treatment, Prognosis. Intech. Poglavje 13.

12. Inai K. (2008). Pathology of mesothelioma. Environ Health Prev Med, 13: 60-64.

13. Kang BH., Altieri DC. (2006). Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein. J Biol Chem, 281: 24721-7.

14. Kishimoto T., Gemba K., Fujimoto N., Aoe K., Kato K., Takeshima Y., Inai K. (2010). Clinical study on mesothelioma in Japan: Relevance to occupational asbestos exposure. Am J Ind Med, 53(11):1081-1087.

15. Klabatsa A., Steele J., Fenneil D., Evans M., Rudd R., Sheaff M. (2005). Survivin and survival in malignant pleural mesothelioma. Lung Cancer-J Iaslc, 49: S222-S.

16. Kleinberg L., Lie AK., Florenes VA., Nesland JM., Davidson B. (2007). Expression of inhibitor of apoptosis protein family members in malignant mesothelioma. Hum Pathol, 38: 986-994.

17. Klemperer P., Rabin CB. (1931). Primary neoplasms of the pleura. Arch Pathol, 11: 385-412.

18. Kovač V. (2012). Mezoteliomi. Onkologija/pregledi. Št.2.

19. Law MR., Hodson ME., Heard B. (1982). Malignant mesothelioma of the pleura: relation between histological type an clinical behaviour. Thorax, 37: 810-815.

20. Lowe SW., Lin AW. (2000). Apoptosis in cancer. Carcinogenesis, 21(3): 485-495.

21. Milano MT., Zhang H. (2010). Malignant pleural mesothelioma: a population-based study of survival. J Thorac Oncol, 5:1841-1848.

22. Mita AC., Mita MM., Nawrocki ST., Giles FJ. (2008). Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. Clin Cancer Res, 14.

23. Mutsaers SE. (2004). The mesothelial cell. Int J biochem Cell Biol, 36: 9-16.

24. Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J.(ur.). (2009). Onkologija. 1.izd. Ljubljana: Mladinska knjiga; str. 295-296.

25. Pižem J., Cör (2001). Kaspaze. Med razgl, 40: 283-291.

26. Pižem J., Cör A. (2003). Survivin-an inhibitor of apoptosis and a new therapeutic target in cancer. Radiol Oncol, 37: 195-201.

27. Reed JC. (2001). The Survivin saga goes in vivo. Journal of Clinical Investigation, 108: 965-969.

28. Robertson HE. (1924). Endothelioma of the pleura. J Cancer research, 8: 317-375.

29. Robinson BWS., Musk AW., Lake RA. (2005). Malignant mesothelioma. Lancet, 366: 397-408.

30. Rossi CR., Mocellin S., Pilati P., Foletto M., Quintieri L., Palatini P. (2003). Pharmacokinetics of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin. Surg Oncol Clin of North America, 12:781-794.

31. Russo A., Terrasi M., Agnese V., Santini D., Bazan V. (2006). Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. Annals of oncology, 17.

32. Steele JPC., Klabatsa A., Fennell DA., Pallaska A., Sheaff MT., Evans MT. (2005). Prognostic factors in mesothelioma. Lung Cancer-J Iaslc, 49: S49-S52.

33. Shukla SJ., Duan S, Badner JA., Wu XL., Dolan ME. (2008). Susceptibility loci involved incisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis. Pharmacogenet Genomics, 18: 253-262

34. Šešok J. Splošno o azbestu. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja RS; 2006 [zadnja sprememba: 9.5.2006; dostop 15.6.2014].

URL: http://www.ivz.si/?ni=78&pi=6&_6_Filename=512.pdf&_6_MediaId=512&_6_AutoResize=false&pl=78-6.3.

35. Wagner JC. (1960). Diffuse Pleural Mesothelioma and Asbestos Exposure in the North-Western-Cape-Province. Br J Ind Med, 17:260-71.

36. Xia CY., Xu ZD., Yuan XC., Uematsu K., You L., Li K. (2002). Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. Molecular Cancer Therapeutics, 1: 687-694.

.