

Molekularno profiliranje karcinoma prijelaznog epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava u nefropatiji aristolohične kiseline

Karanović, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:632875>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sandra Karanović

**Molekularno profiliranje karcinoma
prijelaznog epitela gornjega dijela
mokraćnoga sustava u nefropatiji
aristolohične kiseline**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sandra Karanović

**Molekularno profiliranje karcinoma
prijelaznog epitela gornjega dijela
mokraćnoga sustava u nefropatiji
aristolohične kiseline**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost "Molekulsko profiliranje i proteomika karcinoma urotela", br. 04/38, voditelja prof.dr.sc.Bojana Jelakovića i potpore 2A Fonda "Jedinstvo uz pomoć znanja" u Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Centru za genomsku tehnologiju Langone medicinskog centra Sveučilišta u New Yorku, Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka Svjetske zdravstvene organizacije i u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Bojan Jelaković i prof.dr.sc.Fran Borovečki

Zahvaljujem se svojim mentorima prof. dr. sc. Bojanu Jelakoviću i prof. dr. sc. Franu Borovečkom na ustrajnoj podršci, strpljenju i savjetima oko osmišljavanja, provođenja i pomoći pri pisanju disertacije.

Također veliko hvala dr. sc. Jiriju Zavadilu i cijelom njegovom timu na susretljivosti, savjetima i pomoći pri izvedbi molekularno laboratorijske dijagnostike te dr. sc. Nedi Slade na podršci i vrijednim savjetima tijekom istraživanja i izrade rada.

Posebno zahvala prof. dr. sc. Arthuru Grollmanu, dr. sc. Karli Tomić, dr.Zvonimiru Medverecu, dr.Damiru Dittrichu, dr.Krešimiru Karloviću i dr.Mateju Kneževiću bez čije pomoći ovaj rad ne bi mogao biti uspješno završen.

Veliko hvala kolegama sa Zavoda za nefrologiju KBC Zagreb zbog potpore i razumijevanja, mojoj obitelji i prijateljima čija mi je podrška i motivacija tijekom svih ovih godina neizmjereno značila.

Naposljetku, hvala svima koji su na bilo koji način doprinijeli nastajanju ove disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ENDEMSKA NEFROPATIJA	1
1.1.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI	1
1.1.2. ETIOLOGIJA	2
1.1.3. KLINIČKA PREZENTACIJA	3
1.1.4. PATOHISTOLOŠKI NALAZ	4
1.1.5. DIJAGNOSTIČKI KRITERIJI	4
1.1.6. LIJEČENJE	6
1.1.7. EN=CHN=AAN	7
1.2. NEFROPATIJA KINESKIH TRAVA / NEFROPATIJA ARISTOLOHIČNE KISELINE	9
1.2.1. KLINIČKA PREZENTACIJA	10
1.2.2. PATOHISTOLOŠKI NALAZ	10
1.2.3. PATOGENEZA	10
1.2.4. PROGNOZA I LIJEČENJE	11
1.2.5. POVEZANOST S KARCINOMIMA PRIJELAZNOG EPITELA MOKRAĆNOG SUSTAVA	11
1.3. UROTELNI KARCINOMI GORNJEG DIJELA MOKRAĆNOG SUSTAVA U OPĆOJ POPULACIJI	12
1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA	12
1.3.2. RIZIČNI ČIMBENICI	12
1.3.3. PATOHISTOLOŠKI NALAZ	13
1.3.4. KLASIFIKACIJA TUMORA	14
1.3.5. PROGNOСТИČKI ČIMBENICI	16
1.3.6. KLINIČKA PREZENTACIJA	16

1.3.7. DIJAGNOSTIČKA OBRADA	17
1.3.8. LIJEČENJE	18
1.3.9. PRAĆENJE	19
1.4. UROTELNI KARCINOMI U EN/CHN/AAN	20
1.4.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI	20
1.4.2. KLINIČKA PREZENTACIJA	20
1.4.3. DIJAGNOSTIČKA OBRADA I KLASIFIKACIJA TUMORA	21
1.4.4. LIJEČENJE	21
1.4.5. UUC U BOLESNIKA S AAN I TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	21
1.5. MEHANIZMI NEFROTOKSIČNOSTI I KARCINOGENOSTI	
ARISTOLOHIČNE KISELINE	22
1.5.1. METABOLIZAM ARISTOLOHIČNE KISELINE	22
1.5.2. MUTAGENE I KARCINOGENE ODLIKE ARISTOLOHIČNE KISELINE	23
1.5.3. NEFROTOKSIČNOST ARISTOLOHIČNE KISELINE	24
1.6. FUNKCIONALNA GENOMIKA	25
1.7. GENSKI ČIPOVI I PROFILIRANJE GENSKE EKSPRESIJE	27
1.7.1. ISTRAŽIVANJA EKSPRESIJE GENA U UUC I KARCINOMIMA MOKRAĆNOG MJEHURA	28
1.7.2. ISTRAŽIVANJA EKSPRESIJE GENA U UUC POVEZANIH S AA	31
1.8. MikroRNA	32
1.8.1. MikroRNA U EN/AAN	37
1.8.2. MikroRNA U UROTELNIM KARCINOMIMA	38
1.8.3. MikroRNA U UROTELNIM KARCINOMIMA POVEZANIM S AA	44
1.9. TKIVNI MICROARRAYI	45
1.10. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA	48

2. HIPOTEZA	51
3. CILJEVI RADA	52
4. ISPITANICI I METODE	53
4.1. UPITNIK O MOGUĆOJ IZLOŽENOSTI ARISTOLOCHII CLEMATITIS	54
4.2. LABORATORIJSKA OBRADA	54
4.3. CITOLOGIJA URINA	55
4.4. UZORCI TKIVA	55
4.5. PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOZA	55
4.6. IZDVAJANJE DNA	56
4.7. ANALIZA AA-DNA ADUKATA	56
4.8. ANALIZA MUTACIJA <i>TP53</i> GENA	56
4.9. IZDVAJANJE RNA	57
4.10. ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE POMOĆU GENSKIH ČIPOVA (<i>MICROARRAYA</i>)	57
4.11. PROFILIRANJE mikroRNA	58
4.12. BIOINFORMATIČKI PROGRAMI	61
4.13. TKIVNI <i>MICROARRAY</i>	61
4.14. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE	62
5. REZULTATI	65
5.1. KARAKTERISTIKE BOLESNIKA	65
5.2. IZLOŽENOST ARISTOLOHIČNOJ KISELINI TEMELJENA NA KLINIČKOM UPITNIKU	68
5.3. AA-DNA ADUKTI	69
5.4. MUTACIJE GENA <i>TP53</i>	69

5.5. HISTOLOGIJA BUBREGA	71
5.6. PRAĆENJE BOLESNIKA	71
5.7. PROFILIRANJE mRNA I miRNA	71
5.8. REZULTATI IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJENJA	78
5.9. GLOBALNA INTERPRETACIJA GENSKE EKSPRESIJE POMOĆU BIOINFORMATIČKOG PROGRAMA DAVID I <i>GENE SET ENRICHMENT</i> ANALIZE	80
5.10. DEREGULACIJA TUMORSKIH miRNA	82
5.11. INTEGRIRANI mRNA I miRNA PODACI	82
5.11.1. MREŽE GENSKIH PROGRAMA OVISNIH O miRNA	82
5.11.2. STANIČNA PROLIFERACIJA	87
5.11.3. DEREGULACIJA MEĐUSTANIČNOG I STANICA-MATRIKS KONTAKTA	89
5.11.4. REMODELIRANJE KROMATINA, PRC2 (<i>Polycomb-Repressive Complex 2</i>)	94
5.11.5. ONKOGENI, TUMOR SUPRESOR GENI	98
5.11.6. PROGRAMI VEZANI UZ UROTELNE KARCINOME	104
5.11.7. RAZVOJNI PUTEVI: WNT, HEDGEHOG	107
6. RASPRAVA	111
7. ZAKLJUČCI	129
8. SAŽETAK	131
9. SUMMARY	134
10. POPIS LITERATURE	135
11. ŽIVOTOPIS	147
12. PRILOZI	148

12.1. POPIS NAZIVA GENA I PROTEINA SPOMENUTIH U TEKSTU	148
12.2. UPITNIK KORIŠTEN U ISTRAŽIVANJU	156
12.3. TABLICE S PRIKAZOM KARAKTERISTIKA BOLESNIKA	173

POPIS KRATICA

α -1M/UAE - omjer mokraćnog alfa1-mikroglobulina i albumina

α -1MCR - omjer alfa1-mikroglobulina i kreatinina

AA - aristolohična kiselina

AAN - nefropatija aristolohične kiseline

A:T->T:A - transverzija adenina u timin

BCIP/NBT - bromokloroindolilfosfat/nitroblutetrazolinklorid

BSA - goveđi serumski albumin

cDNA - komplementarna DNA

CHN - nefropatija kineskih trava

COSMIC - katalog somatskih mutacija u karcinomu

COX - ciklooksigenaza

cRNA - komplementarna RNA

dA-AL - dA-aristolaktam

DAB - diaminobenzidintetraklorid

DAVID - Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

dG-AL - dG-aristolaktam

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

EMT - epitelijalno mezenhimalna tranzicija

EN - endemska nefropatija

ESRD - završni stadij bubrežne bolesti, od engl. End stage renal disease

FC - omjer promjene, od engl. fold change

FDR - stopa za lažna otkrića, od engl. false discovery rate

GO - Gene Ontology

GSEA - Gene Set Enrichment Analysis

KDOQI - inicijativa za procjenu ishoda bubrežne bolesti

MCV - prosječni volumen eritrocita

MIBC - karcinom mokraćnog mjehura s mišićnom invazijom

miRISC - mikroRNA posredovani kompleks za utišavanje, od engl. miR-mediated silencing complex

miRNA - mikro RNA

miR - mikro RNA

MR - magnetska rezonanca

mRNA - glasnička RNA

MSCT - višeslojna kompjuterizirana tomografija

NMIBC - karcinom mokraćnog mjehura bez mišićne invazije

ORF - otvoreni okvir čitanja, od engl. open reading frame

PBS - fosfatom puferirana fiziološka otopina

PCR - lančana reakcija polimerazom

Pre-miRNA - prekursorska mikroRNA

Pri-miRNA - primarna mikroRNA

PTEC - epitelne stanice proksimalnog tubula

RISC - RNA inducirani sustav za utišavanje, od engl. RNA induced silencing complex

RT - reverzna transkripcija/real time

RMA - Robust Multichip Average, algoritam za normalizaciju

RNA - ribonukleinska kiselina

RNAi - RNA uvjetovana interferencija

RNA POL II, III - RNA polimeraza II i III

TMA - tkivni *microarray*

TNM - klasifikacija proširenosti tumora (Tumor, lymph Node metastasis, distant Metastasis)

3'UTR - 3' neprepisujuća regija

UUC - karcinom prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

1.1. ENDEMSKA NEFROPATIJA

Endemska nefropatija (EN) kronična je tubulointersticijska bolest koja zahvaća stanovništvo ruralnog područja u dolinama velikih pritoka rijeke Dunav u Bosni i Hercegovini, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumunjskoj i Srbiji (1). Bolest je u literaturi prvi put opisana u kasnim 1950-im godinama, premda je sudeći prema crkvenim zapisima bila prisutna i prije Drugog svjetskog rata (2). Svjetska zdravstvena organizacija prihvatila je naziv "endemska nefropatija" 1964. kada su postavljeni i prvi dijagnostički kriteriji (3).

EN zahvaća dva ciljna tkiva - proksimalni bubrežni tubul dovodeći do intersticijske fibroze, bubrežnog zatajenja i potrebe za nadomjesnim bubrežnim liječenjem te prijelazne stanice mokraćog sustava uzrokujući karcinome prijelaznog epitela.

1.1.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Epidemiološke karakteristike EN uključuju žarišno pojavljivanje bolesti u zemljoradničkog stanovništva točno određenih sela, dok populacija sela u njihovoj neposrednoj blizini ostaje nezahvaćena; može se javiti u članova istih kućanstava, no nije nasljedna; oboljevaju isključivo osobe starije od 18 godina; zahvaćeno je <10% kućanstava u endemskim selima, te je karakteristično da postoji snažna povezanost s karcinomima prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (4). Hrvatsko endemsko žarište obuhvaća 14 sela zapadno od Slavenskog Broda uz obalu rijeke Save s populacijom od 10 865 stanovnika (5). Prevalencija oboljelih od EN u hrvatskom žarištu je oko 5%, dok se broj sumnjivih da boluju kreće između 10 i 15% (5,6). Žene oboljevaju nešto češće od muškaraca, no ovo je vjerojatno lažno pozitivan rezultat budući da muškarci češće umiru od kardiovaskularnih bolesti prije ispoljavanja bubrežne bolesti. EN nikad nije opisana u djece. Prema nedavnim

epidemiološkim istraživanjima EN je prisutna još uvijek u svim endemskim žarištima (5,7,8), no u Hrvatskoj je uočen trend pada pojavnosti ove bolesti, dok je u svim edemskim žarištima evidentiran pomak prema starijoj životnoj dobi oboljelih osoba (9).

1.1.2. ETIOLOGIJA

Predlagane su i testirane brojne hipoteze o uzročnom čimbeniku odgovornom za nastanak EN, uključujući elemente u tragovima (olovo, kadmij, silicij), viruse, mikotoksine (okratoksin A), aromatske ugljikovodike, imunološke poremećaje i nasljeđe. Međutim, niti jedna od ovih teorija nije se pokazala točnom i sve su odbačene. Jedan od ključnih čimbenika za rasvjetljavanje etiologije EN bila je Ivićeva hipoteza iz 1967. godine koja je potom puna 3 desetljeća bila zanemarena. Naime, Ivić je uočio da se sjemenke biljke *Aristolochia clematitis* miješaju i melju sa sjemenkama žita tijekom godišnje žetve, te je pretpostavio da se toksični sastojak ove biljke nenamjerno unosi putem domaćeg kruha, prehrambene okosnice zemljoradničkih obitelji endemskog područja. Time je formulirao hipotezu da bi *Aristolochia* mogla biti odgovorna za razvoj EN (10). U prilog ovog opažanja ide i ranije izvješće hrvatskih veterinara o nefrotoksičnosti u konja koji su se hranili sijenom onečišćenim *Aristolochijom clematitis*, biljkom koja sadrži aristolohičnu kiselinu (engl. *aristolochic acid*, AA). Konji su razvili bubrežnu bolest sličnu EN, dok su patohistološki u konjskim bubrezima nađene promjene jednake onima u bolesnika s EN (11). Ivićeva hipoteza ponovno je osviještena 2004. godine kada su Jelaković i suradnici proveli "case control" epidemiološku studiju u koju su bili uključeni stanovnici nekolicine endemskih sela i kontrolnih obližnjih neendemskih sela. Pokazali su da su bolesnici s EN imali znatno veću vjerojatnost izloženosti AA. Izračunata je kumulativna doza aristolohične kiseline unošene tijekom 15 godina koja se pokazala dostatnom za razvoj tubulointersticijske nefropatije i karcinoma prijelaznog epitela (12). Dodatno su određeni i biomarkeri izloženosti aristolohičnoj kiselini određivanjem

kovalentno vezanih adukata metabolita AA: koristeći kvantitativnu ^{32}P -*postlabeling* metodu detektirani su dA-aristolaktam (dA-AL) i dG-aristolaktam (dG-AL) adukti u bubrežnom korteksu bolesnika s EN i tkivu karcinoma prijelaznog epitela bolesnika iz endemskih krajeva. Nadalje, A:T->T:A transverzija, sada poznata i kao "potpisna AA mutacija" , mutacija koja se rijetko nalazi u karcinoma urotela drugih regija, dominirala je mutacijskim spektrom *TP53* gena u karcinomima urotela bolesnika iz endemskih područja (13). Ovi rezultati kasnije su dokazani i u drugim državama s endemskim žarištima: Bosni i Hercegovini, Rumunjskoj i Srbiji (14, 15, 16).

1.1.3. KLINIČKA PREZENTACIJA

EN je bolest sporog, podmuklog tijeka i može dovesti do završnog stadija bubrežnog zatajenja. Klinički postaje manifestna u osoba starosti između 30 i 50 godina, premda se u posljednje vrijeme uočava pomak prema starijoj životnoj dobi. Jedan od prvih znakova EN kojeg je moguće uočiti isključivo ukoliko se provodi adekvatan probir (analiza urina test trakicom ne detektira niskomolekularnu proteinuriju) je tubularna disfunkcija karakterizirana ekskrecijom proteina male molekulske mase, posebno alfa1 mikroglobulina. Tijekom godina javlja se progresivan pad sposobnosti koncentracije urina te dolazi do smanjenja glomerularne filtracije. Arterijska hipertenzija i periferni edemi ne uočavaju se u EN sve do završnog stadija bubrežnog zatajenja. Normocitna normokromna anemija javlja se rano u sklopu bolesti i postaje naglašenija kako bubrežna bolest napreduje. Bubrezi su na početku normalne veličine, no kako EN napreduje postaju mali, skvrčeni, ali simetrični, glatkih kontura i s normalnim pijelokalicealnim sustavom. U bolesnika s EN karakteristična je velika učestalost urotelnih karcinoma, dominantno bubrežne nakapnice i uretera (17, 18).

1.1.4. PATOHISTOLOŠKI NALAZ

Ne postoji patohistološki nalaz patognomoničan za EN, no obrazac bubrežnog oštećenja u odsutnosti druge bolesti koji s velikom vjerojatnošću upućuje na EN uključuje mikroskopski nalaz hipocelularne intersticijske fibroze s tubularnom atrofijom što najprije zahvaća superficijalni dio korteksa s postupnim širenjem prema unutarnjem dijelu korteksa i meduli tijekom daljnje progresije bolesti. U otprilike jedne trećine slučajeva ove promjene mogu biti udružene s kroničnim intersticijskim upalnim infiltratom mononuklearnim stanicama većinom u području vanjske medule, i to obično u znatno manjoj količini no u drugim bubrežnih bolesti. Glomeruli su očuvani, ali u uznapredovaloj fazi mogu biti sekundarno zahvaćeni posljedično progresivnom propadanju bubrega uslijed procesa tubulointersticijske fibroze (19, 20). Makroskopski bubrezi su mali, skvrčeni, simetrični, glatkih kontura i teže svega 20-30g (18).

1.1.5. DIJAGNOSTIČKI KRITERIJI

Postoji više različitih dijagnostičkih kriterija koji se godinama koriste u zemljama zahvaćenim EN što uvelike otežava usporedbu podataka o prevalenciji i incidenciji bolesti među pojedinim žarištima. Od nedavno dostupna je nova klasifikacija temeljena na konsenzusu stručnjaka iz područja EN (18). Ovi kriteriji uzimaju u obzir epidemiološke i laboratorijske podatke i klasificiraju stanovništvo endemskog područja u 4 skupine: bolesni od EN, sumnjivi da boluju od EN, osobe s visokim rizikom za obolijevanje od EN, skupina ostalih (nezahvaćeni, bez rizika od obolijevanja). Također je uveden pojam "sporadične EN" kojim se definira bolesnik iz neendemskog kraja čiji je nalaz biopsije bubrega indikativan za EN uz prethodno isključenje ostalih mogućih uzroka kronične intersticijske nefropatije. Inače biopsija bubrega u osoba s intersticijskom nefropatijom iz endemskog područja i sumnjom na EN nije indicirana osim ako se sumnja na preklapanje s drugom bubrežnom bolesti.

Dijagnostički kriteriji uzimaju u obzir boravak u kućanstvu s EN ili EN selu dulje od 20 godina, disfunkciju proksimalnog tubula definiranu tubularnom proteinurijom niske molekulske mase mjerenu alfa1-mikroglobulinurijom, glomerularnu filtraciju procijenjenu CKD-EPI formulom, anemiju i podatak o preboljelom karcinomu prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava. Potrebno je isključiti okolišnu izloženost ostalim mogućim nefrotoksičnim uzrocima osim AA. Nova klasifikacija prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Nova klasifikacija populacije u endemskim selima

<p>Bolesni/Oboljeli od EN</p> <p>1. Bolest dokazana biopsijom (indikativna za EN) ILI</p> <p>2. Boravak u EN selima > 20 godina + tubularna proteinurija¹ + smanjena glomerularna filtracija + anemija² ILI</p> <p>3. Boravak u EN kućanstvima > 15 godina + tubularna proteinurija¹ ILI</p> <p>4. Boravak u EN selima > 20 godina + UUC³ + tubularna proteinurija¹</p>	<p>Sumnjivi da boluju od EN</p> <p>1. Boravak u EN kućanstvima > 15 godina + smanjena glomerularna filtracija + anemija² ILI</p> <p>2. Boravak u EN selima > 20 godina + tubularna proteinurija¹ ILI</p> <p>3. Boravak u EN selima > 20 godina + UUC³</p>
<p>Visokorizična skupina za EN</p> <p>1. Boravak u EN kućanstvima > 15 godina 2. Boravak u kućanstvima sa sporadičnim EN slučajevima > 15 godina</p>	<p>Sporadična EN⁴</p> <p>Dokazano biopsijom/indikativno za EN u bolesnika s UUC iz neendemskih područja ili u osoba iz njihovog kućanstva</p>

¹ Omjer mokraćnog alfa1-mikroglobulina i kreatinina (α -1MCR) > 31,5 mg/g i omjer mokraćnog alfa1-mikroglobulina i albumina (α -1M/UAE) \geq 0.91

² Hemoglobin < 120 g/l za muškarce i žene > 50 godina, i < 110 g/l za žene < 50 godina

³ UUC – (od engl. *upper urothelial cancer*) karcinom prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava

⁴ Osobe s kroničnom intersticijskom nefropatijom u kojih treba isključiti druge uzroke nefropatije (refluksna nefropatija, kronični pijelonefritis, recidivirajući pijelonefritis, hipertenzivna nefroskleroza, izloženost olovu, kadmiju, biljkama koje sadržavaju aristolohičnu kiselinu, ciklosporinu A, ifosfamid, pamidronat, litiju ili nitrozoureji, nesteroidnim antireumeticima)

**Prilagođeno prema Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z i sur. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2014; 29:2020-2027.*

1.1.6. LIJEČENJE

Ne postoji specifična terapija EN. Liječenje je suportivno: nastoji se odgoditi napredovanje kronične bubrežne bolesti odnosno liječe se njezine komplikacije. Bolesnicima koji dosegnu završni stadij bubrežnog zatajenja nadomješta se bubrežna funkcija dijalizom i/ili

transplantacijom bubrega. Zbog visokog rizika za razvoj karcinoma prijelaznog epitela mokraćnog sustava bolesnicima se prije transplantacije preporuča bilateralna nefroureterektomija, dok se citologija urina i cistoskopija provodi svakih 6 mjeseci u bolesnika s EN u terminalnoj renalnoj insuficijenciji odnosno u transplantiranih bolesnika s EN (18).

1.1.7. EN=CHN=AAN

Usporedivši kliničku prezentaciju, patohistološke nalaze, epidemiološke i molekularne podatke bolesnika s EN i bolesnika iz Belgije, Tajvana i ostalih zemalja sa zabilježenim slučajevima nefropatije kineskih trava (engl. *Chinese herbs nephropathy*, CHN), može se zaključiti da su EN i CHN dva entiteta jedne bolesti - nefropatije aristolohične kiseline (engl. *Aristolochic acid nephropathy*, AAN). Za razliku u kliničkom tijeku bolesti (naglo, akutno propadanje bubrežne funkcije u CHN naspram kroničnog, sporog tijeka u EN) odgovorna je količina toksina unesena u određenom vremenskom razdoblju (velika doza u kratkom vremenskom periodu u CHN i manja doza tijekom duljeg vremena u EN), dok su ostala obilježja ove dvije bolesti jednaka. Danas se s pravom može reći da je EN=CHN=AAN (Tablica 2).

Tablica 2. Obilježja CHN (AAN) i EN

	Doza AA	Klinički tijek bubrežne bolesti	% obijelih od svih izloženih	Karcinomi urotela	Jačina fibroze	Celularnost	Kortikomedularni gradijent	AA-DNA adukti	A-T mutacija u UUC
AAN	Visoka doza u kratkim vremenskim razdobljima	Akutni brzoprogresivni (6 m-2 godine do završnog stadija bubrežne bolesti)	5%	40-46%	+++	-	+	pozitivni	prisutna
EN	Manja doza u dužem vremenskim razdobljima	Kronični, spori razvoj (>20 godina do završnog stadija bubrežne bolesti)	5%	41%	+++	-	+	pozitivni	prisutna

1.2. NEFROPATIJA KINESKIH TRAVA / NEFROPATIJA ARISTOLOHIČNE KISELINE

Nefropatija kineskih trava opisana je 1992. godine u Belgiji u skupine žena koje su se prezentirale teškom intersticijskom nefropatijom koja je tijekom nekoliko mjeseci napredovala do završnog stadija bubrežnog zatajenja (engl. end-stage renal disease, ESRD), a naknadno je u 44% bolesnica došlo do razvoja karcinoma prijelaznog epitela mokraćnog sustava (21). Sve ove bolesnice bile su uključene u tretman mršavljenja u jednoj od klinika u Bruxellesu prilikom čega su koristile tablete za mršavljenje koje su sadržavale ekstrakte korijena kineskih trava označenih kao *Stephania tetrandra* i *Magnolia officinalis* u obliku praška. Kasnijom fitokemijskom analizom i analizom DNA adukata u bubrega oboljenih bolesnica pokazalo se da tablete nisu sadržavale tetrandrin nego aristolohičnu kiselinu, glavnu komponentnu otrovne biljke vrste *Aristolochia* (22, 23). *Stephania* je slučajno zamijenjena *Aristolochiom fangchi* budući da ove dvije biljke dijele slični naziv u kineskoj farmakopeji (Han Fang Ji i Guang Fang Ji). Oko 100 slučajeva zabilježeno je u Belgiji dok su sporadični slučajevi opisani u Francuskoj, Španjolskoj, Njemačkoj, Velikoj Britaniji i Sjedinjenim Američkim Državama gdje su kineske trave korištene za mršavljenje, ali također i za druge indikacije poput liječenja hepatitisa, artritisa, terapije boli. Mnogi slučajevi također su opisani i u azijskim zemljama (Kina, Tajvan, Japan, Indija) gdje tradicionalne farmakopeje sadrže biljke roda *Aristolochia* (24). Termin nefropatija kineskih trava zamijenjen je pojmom nefropatija aristolohične kiseline. Razvijeni su životinjski modeli AAN na ženkama novozelandskih bijelih kunića i muških Wistar štakora koji su pokazali tipične karakteristike CHN/AAN (tubularna atrofija, intersticijska fibroza, urotelna atipija) (25,26).

1.2.1. KLINIČKA PREZENTACIJA

Inicijalna prezentacija CHN/AAN bila je tiha te je bubrežno zatajenje otkriveno rutinskim krvnim testovima (27), premda je bilo i slučajeva koji su se prezentirali Fanconijevim sindromom ili akutnim bubrežnim zatajenjem uslijed tubularne nekroze (28, 29). Bolesnici su imali anemiju izraženiju od stupnja bubrežne bolesti, proteinuriju niske molekulske mase (beta2-mikroglobulin, cistatin C, protein Clara stanica, retinol vezajući protein, alfa1-mikroglobulin) dok je enzimurija neutralnom endopeptidazom zabilježena u bolesnika s umjereno narušenom bubrežnom funkcijom, a nije nađena u bolesnika u terminalnom stadiju bubrežne bolesti. Stanice proksimalnog bubrežnog tubula predstavljaju dakle ciljno tkivo AA.

1.2.2. PATOHISTOLOŠKI NALAZ

Bubrezi su mali, skvrčeni, asimetrični, dok je mikroskopski nalaz uključivao izraženu intersticijsku fibrozu s atrofijom i gubitkom proksimalnih tubula i karakterističnim kortikomedularnim gradijentom uz očuvane glomerule. Infiltracija intersticija upalnim stanicama bila je oskudna (30).

1.2.3. PATOGENEZA

Cijeli mehanizam nefrotoksičnosti AA nije jasan, no poznato je da blokada renin-angiotenzin sustava ne prevenira intersticijsku fibrozu uzrokovanu AA (31). Također je nejasno u kojoj mjeri transdiferencijacija stanica i apoptoza igra ulogu u nastanku ove bolesti (32). Jedna od studija pokazala je da AA uzrokuje smrt tubularnih epitelnih stanica apoptozom putem defosforilacije STAT3 i posttranslacijske aktivacije p53, što

je u skladu s hipotezom da p53 pospješuje oštećenje bubrega u nefropatiji aristolohične kiseline (33).

1.2.4. PROGNOZA I LIJEČENJE

U bolesnika s uznapredovalom bolešću dolazi do daljnje progresije bubrežnog zatajenja što u konačnici rezultira nadomještanjem bubrežne funkcije dijalizom ili transplantacijom, čak i u slučaju ako se spriječi daljnja izloženost AA. Rizik za napredovanje bolesti povećava se s trajanjem izloženosti AA. Zbog visoke incidencije stanične atipije genitourinarnog sustava kod ovih bolesnika nužna je redovita citološka analiza urina, a preporuča se i bilateralna nefroureterektomija, posebno u osoba kod kojih se planira transplantacija bubrega.

Nema lijeka za AAN, premda je jedna studija ukazala da kortikosteroidi mogu usporiti gubitak bubrežne funkcije (34). Transplantacija je učinkovit način liječenja za bolesnike u terminalnom stadiju bubrežne bolesti.

1.2.5. POVEZANOST S KARCINOMIMA PRIJELAZNOG EPITELA

MOKRAĆNOG SUSTAVA

Čak 40-45% belgijskih bolesnika s CHN/AAN u završnom stadiju bubrežnog zatajenja razvilo je multifokalne karcinome prijelaznog epitela visokog gradusa i to dominantno gornjeg dijela mokraćnog sustava (23), dok je u manjeg broja zabilježen karcinom mokraćnog mjehura (35). Opisan je također i slučaj generaliziranog UUC bez postojanja značajnog bubrežnog zatajenja nakon ingestije AA (36). UUC povezani s AA opisani su i izvan Belgije - u Tajvanu, Velikoj Britaniji, Francuskoj i Hong Kongu (24).

1.3. UROTELNI KARCINOMI GORNJEG DIJELA MOKRAĆNOG SUSTAVA U OPĆOJ POPULACIJI

1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA

Urotelni karcinomi maligni su tumori epitela koji predstavlja unutrašnji sloj mokraćnog sustava. Mogu se javiti u donjem (mokraćni mjehur i uretra) ili gornjem dijelu mokraćnog trakta (pijelokalicealne šupljine i ureter). Tumori mjehura sačinjavaju 90-95% karcinoma urotela i predstavljaju najčešći tumor mokraćnog sustava (37). S druge strane karcinomi gornjeg dijela mokraćnog sustava (UUC) nisu česti i čine svega 5-10% svih urotelnih tumora (38). Procijenjena godišnja incidencija UUC u zapadnim zemljama iznosi otprilike 2 nova slučaja na 100 000 stanovnika. Pijelokalicealni tumori su dva puta češći od ureteralnih tumora. U 17% slučajeva uz postojeći UUC prisutan je i karcinom mokraćnog mjehura (39). Povrat bolesti u mokraćni mjehur javlja se u 22-47% bolesnika s UUC, dok se relaps bolesti u kontralateralni gornji urotrakt viđa u 2-6% bolesnika (40, 41). Kod primarnih karcinoma mokraćnog mjehura relaps u gornji urotrakt javlja se u 2-4% bolesnika i to pretežno u distalni ureter (42). Gotovo 60% UUC su invazivni u vrijeme postavljanja dijagnoze dok je svega 15-20% karcinoma mjehura invazivno (43). Najveća pojavnost ovih tumora jest u osoba u 7.i 8. desetljeću života, i 3 puta su češći u muškaraca nego žena (44). Javljaju se 2 puta češće u bijelaca nego u crnaca (45). Također su opisani obiteljski/nasljedni oblici UUC povezani s hereditarnim nepolipoznim kolorektalnim karcinomima (46).

1.3.2. RIZIČNI ČIMBENICI

Glavni vanjski rizični čimbenici koji predisponiraju nastanku urotelnih tumora osim AA su pušenje koje povećava relativni rizik za razvoj UUC s 2,5 na 7 (47) i profesionalna

izloženost aromatskim aminima (industrije boja, tekstila, ugljena, kemikalija, petrokemijska industrija) poput benzidina i B-naftalena s procijenjenim rizikom za nastanak UUC 8,3 (47). U prošlosti su UUC bili povezani s korištenjem fenacetina, analgetika koji je sada zabranjen za uporabu (47). Povećan rizik za razvoj UUC dovodi se u vezu s izloženosti ciklofosfamidu, arsenu, i u sklopu tzv. bolesti crnog stopala (engl. *Blackfoot disease*), a prema literaturi određeni genetski polimorfizmi doprinose povećanom riziku za nastanak UUC ili bržoj progresiji bolesti, primjerice varijanta SULT1A1*2, koja smanjuje aktivnost sulfotransferaze te polimorfizam na T alelu rs9642880 na kromosomu 8q24 nose rizik za razvoj UUC (48).

1.3.3. PATOHISTOLOŠKI NALAZ

Histološki urotelni karcinomi u 95% slučajeva nastaju iz urotela i odgovaraju UUC ili karcinomu mokraćnog mjehura (43), dok se rijetko javljaju podtipovi poput skvamoznog karcinoma, adenokarcinoma, karcinoma malih stanica i sarkoma (49). Karcinom sabirnih kanalića ima slične karakteristike kao i UUC budući da ovi tumori imaju zajedničko embriološko porijeklo. Nekoliko je morfoloških varijanti UUC koje nalazimo u UUC tumora visokog gradusa: mikropapilarni, svjetlostanični, neuroendokrini i limfoepitelijalni (50).

Poput karcinoma mokraćnog mjehura UUC su često multifokalni, a fenomen kojim se ovo objašnjava naziva se "field cancerization" i uzrokovana je izloženošću urotela potencijalnim karcinogenima koji se ili izlučuju urinom ili se aktiviraju hidrolizirajućim enzimima u urinu. UUC se može širiti na ostale urotelne strukture distalno ili proksimalno od primarnog tumora (tzv. "drop metastaze"). Osim izravno, UUC se mogu širiti i limfom odnosno hematogeno. Regionalni limfni čvorovi (hilarni, para-

aortalni, parakavalni i zdjelični limfni čvorovi) najčešća su mjesta inicijalnih metastaza (51).

1.3.4. KLASIFIKACIJA TUMORA

UUC se najčešće klasificiraju kao neinvazivni papilarni tumori (papilarni tumori niskog malignog potencijala, papilarni UC niskog gradusa, papilarni UC visokog gradusa), ravne lezije (karcinom "in situ") ili invazivni karcinomi. Definiranje tumorskog stadija temelji se na TNM klasifikaciji (52) što je prikazano u tablici 3. S druge strane tumorski gradusi do nedavno su se određivali prema WHO klasifikaciji iz 1973. koja je razlikovala samo 3 gradusa (G1, G2 i G3), no od 2004. godine koristi se nova WHO klasifikacija koja uključuje 3 skupine neinvazivnih tumora: papilarnu urotelnu neoplaziju niskog malignog potencijala, karcinom niskog gradusa i karcinom visokog gradusa (53).

Tablica 3. TNM klasifikacija urotelnih karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava

<p>T: Primarni tumor</p> <p>TX Primarni tumor se ne može odrediti T0 Bez znakova za primarni tumor Ta Neinvazivni papilarni karcinom Tis CIS T1 Tumor zahvaća subepitelno vezivno tkivo T2 Tumor prodire u mišićni sloj T3 Tumor bubrežnog pijelona prodire u peripijelično masno tkivo ili bubrežni parenhim; tumor uretera invadira u periureteralno masno tkivo T4 Tumor zahvaća obližnje organe ili se preko bubrega širi u perirenalno masno tkivo</p>
<p>N: Regionalni limfni čvorovi</p> <p>NX Zahvaćenost regionalnog limfnog čvora se ne može odrediti N0 Bez metastaza u regionalne limfne čvorove N1 Metastaza u jedan limfni čvor veličine ≤ 2 cm u najvećem promjeru N2 Metastaza u jednom limfnom čvoru > 2 cm, ali ne >5 cm u najvećem promjeru, ili multipli limfni čvorovi ali < 5 cm u najvećem promjeru N3 Metastaza u limfni čvor > 5 cm u najvećem promjeru</p>
<p>M: Udaljene metastaze</p> <p>M0 Bez udaljenih metastaza M1 Udaljene metastaze</p>

* Prilagođeno prema *Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Urological tumours, renal pelvis and ureter. ed. 7. rev. New York, NY: Wiley-Blackwell; 2009. p. 258–61.*

Otpriblike 55-75% ureteralnih tumora su niskog gradusa i stadija. Oko 85% tumora pijelona su papilarni karcinomi, dok su ostali sesilni. Invazija u laminu propriju ili mišićni sloj (stadiji T1 ili T2) viđa se u 50% papilarnih i više od 80% sesilnih tumora. Između 50 i 60% tumora bubrežnog pijelona invadiraju u laminu propriju ili mišićni sloj. U tumora uretera invazija je također česta (54).

Rutinska procjena proširenosti bolesti bi trebala uključivati radiogram ili MSCT pluća, scintigrafiju kostiju ukoliko su prisutni simptomi koji ukazuju na moguću propagaciju bolesti u kosti ili je povišena koštana alkalna fosfataza, te evaluaciju jetrene, bubrežne i hematološke funkcije. MSCT ili MR abdomena može se učiniti kako bi se potvrdila retroperitonealna limfadenopatija kao i ostala mjesta propagacije bolesti.

1.3.5. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI

Tumorski stadij i gradus su značajni prognostički čimbenici za UUC. Dodatno su prognostički značajni zahvaćenost limfnih čvorova, istovremeno postojanje CiS, dob, limfovaskularna invazija, građa tumora, postojanje nekroze, lokacija tumora, multifokalnost i spol bolesnika (55). Molekularni biljezi kao potencijalni prognostički markeri predmet su mnogih istraživanja koja su u tijeku. Unatoč tome do danas niti jedan od markera još nije ispunio kliničke i statističke kriterije potrebne za uvođenje biomarkera u svakodnevnu kliničku praksu.

1.3.6. KLINIČKA PREZENTACIJA

Najčešći simptom karcinoma gornjeg dijela urotrakta je hematurija, bilo makroskopska, bilo mikroskopska, prisutna je u 56-98% bolesnika (56). Bol se javlja u 30% tumora, a oko 15% bolesnika nema nikakve simptome. Dijagnoza se postavlja slučajno u sklopu obrade incidentalne lezije nađene radiološkom obradom. Bolesnici se također mogu prezentirati i uznapredovalom bolešću - postojanjem intraabdominalne mase, gubitkom na tjelesnoj masi, anoreksijom i bolovima u kostima.

1.3.7. DIJAGNOSTIČKA OBRADA

Dijagnostička obrada karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava uključuje citološku analizu urina, radiološku obradu i ureteropijeloskopiju.

Citologija urina manje je pouzdana kod urotelnih karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava nego kod novotvorina mokraćnog mjehura. Pouzdanost je poglavito niska kod UUC niskog gradusa, a u ovom slučaju pozitivan nalaz citologije urina može ukazivati i na istovremeni karcinom mokraćnog mjehura. Prema literaturi, osjetljivost ove metode varira od 20% za tumore gradusa 1, 45% gradusa 2 i 75% za tumore s gradusom 3 (57). Bolje rezultate pokazalo je retrogradno skupljanje uzorka za citologiju prilikom ureteroskopije s diuretikom.

Radiološke metode uključuju intravensku pijelografiju, ultrazvuk urotrakta, koje su danas uglavnom zamijenjene MSCT urografijom. Osjetljivost MSCT urografije za otkrivanje UUC varira između 67 i 100%, dok je specifičnost ove metode između 93 i 99%, ovisno o korištenoj tehnici (58). MSCT urografija omogućuje bolju vizualizaciju mokraćnog kanalnog sustava, a istovremeno detektira i eventualnu propagaciju bolesti. MR urografija uz gadolinij alternativna je metoda ukoliko je kontraindicirana primjena jednog kontrasta ili zračenja. Osjetljivost MR urografije za tumore manje od 2 cm nakon aplikacije kontrasta iznosi 75% (59). Radiološki nalazi koji upućuju na postojanje UUC uključuju defekt punjenja kontrastom, opstrukciju, nevizualizaciju kanalnog sustava ili zadebljanje stijenke bubrežnog pijelona ili uretera.

Endoskopske metode uključuju cistoskopiju i ureteropijeloskopiju. Cistoskopija je obavezna kako bi se isključilo paralelno postojanje karcinoma mokraćnog mjehura, budući da su ova dva entiteta često istodobno prisutna. Ureteroskopija koristeći fleksibilne fiber ureteroskope, koja je danas dostupna, omogućava direktnu vizualizaciju

uretera, bubrežnog pijelona i sabirnih kanalića. Uz ovu pretragu moguće je učiniti i biopsiju kako bi se potvrdila dijagnoza te također omogućava i endourološko liječenje u pažljivo odabrane skupine bolesnika. Ukoliko je moguće, ureteroskopiju s biopsijom trebalo bi učiniti u sklopu preoperativne obrade u svakoga bolesnika s UUC (60).

1.3.8. LIJEČENJE

Lokalizirana bolest:

Radikalna nefroureterektomija s ekscizijom dijela mokraćnog mjehura zlatni je standard liječenja UUC, bez obzira na lokalizaciju tumora u gornjem dijelu mokraćnog sustava (61). Konzervativni pristup dolazi u obzir u bolesnika sa solitarnim bubregom, bubrežnim zatajenjem ili u tumora niskog stupnja i niskog gradusa i uključuje endoskopsku ablaciju tumora prikom ureteroskopije, perkutani pristup kod tumora bubrežnih kaliksa te segmentalnu resekciju (ureteroureterostomiju) kod tumora proksimalnog ili srednjeg uretera niskog stadija i gradusa ili tumora visokog gradusa/invazivne tumore kada postoji imperativ očuvanja bubrežne funkcije. Potpuna distalna ureterektomija s neocistostomijom indicirana je u neinvazivnih tumora niskog gradusa distalnog uretera koje nije moguće ukloniti endoskopskim putem ili pak za lokalno invazivne tumore visokog gradusa. Adjuvantna terapija antegradnom instilacijom bacila Calmette-Guerin ili mitomicina C putem perkutane nefrostome nakon potpunog operativnog uklanjanja tumora koristi se katkad nakon konzervativnog operativnog zahvata ili u sklopu liječenja CiS, iako nije dokazana dugoročna korist ovog postupka (60).

Uznapredovala bolest:

Nije dokazana korist radikalne nefroureterektomije u metastatskoj bolesti, iako ovaj zahvat može doći u obzir kao vid palijativnog liječenja. Kemoterapijski protokoli temelje se na primjeni platine, međutim nisu svi bolesnici s uznapredovalim UUC kandidati za kemoterapiju što zbog komorbiditeta, što zbog oslabljene funkcije bubrega nakon radikalnog operativnog zahvata. Adjuvantna kemoterapija nema utjecaj na preživljenje no smanjuje rizik od relapsa bolesti za 50% (62). Za sada nisu dostupni podaci o učinkovitosti neoadjuvantne kemoterapije u UUC. S druge strane adjuvantna radioterapija može poboljšati lokalnu kontrolu bolesti, a kada se radioterapija primjenjuje u kombinaciji s cisplatinom može rezultirati duljim razdobljem bez bolesti i boljim sveukupnim preživljenjem (63).

1.3.9. PRAĆENJE

Nužno je strogo praćenje bolesnika operiranih zbog UUC zbog čestih metakronih karcinoma mokraćnog mjehura, lokalnog relapsa i udaljenih metastaza (u slučaju invazivnih tumora). Praćenje se bazira na cistoskopiji, citološkoj analizi urina i MSCT pregledima barem 5 godina nakon zahvata. Nakon radikalne nefroureterektomije kod neinvazivnih tumora uputno je učiniti cistoskopiju/citologiju urina nakon 3 mjeseca, potom jednom godišnje te jedanput godišnje MSCT. Kod invazivnih tumora preporuča se cistoskopija/citologija urina nakon 3 mjeseca i potom jednom godišnje te MSCT urografija svakih 6 mjeseci prve 2 godine, a kasnije jednom godišnje. Nakon konzervativnog zahvata citologiju urina i MSCT urografiju potrebno je učiniti nakon 3 i 6 mjeseci i potom jednom godišnje dok se cistoskopija, ureteroskopija i citologija in situ preporuča nakon 3, 6 mjeseci i potom svakih 6 mjeseci prve 2 godine, a kasnije jednom godišnje (60).

1.4. UROTELNI KARCINOMI U EN/CHN/AAN

1.4.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Ciljno tkivo AA osim proksimalnog bubrežnog tubula jesu i stanice prijelaznog epitela mokraćnog sustava uzrokujući staničnu atipiju i karcinome mokraćnog sustava. U općoj populaciji UUC su izrazito rijetki, dok čak 50% bolesnika s AAN obolijeva od urotelnih karcinoma i to predominantno gornjeg dijela mokraćnog sustava, tj pijelokalicealnih šupljina i uretera (23). U hrvatskom endemskom žarištu specifični mortalitet od UUC 55 puta je veći nego u ostalim dijelovima Hrvatske (64). Ovaj tip tumora može se javiti istovremeno s bubrežnom bolešću, može joj prethoditi ili se javiti neovisno o nefropatiji (65, 36). U endemskim područjima od UUC jednako obolijevaju oba spola, a pojavnost je najčešća u 7. desetljeću života. UUC može biti multifokalan, bilateralan i česti su relapsi bolesti. U bolesnika s EN češće su nižeg gradusa i rijetko metastaziraju, iako su opisani i tumori visokog gradusa; dok su tumori u belgijskih bolesnika češće bili visokog gradusa (6, 23). Razlog za predominaciju gornjeg dijela mokraćnog sustava još uvijek nije razjašnjen.

1.4.2. KLINIČKA PREZENTACIJA

Klinička prezentacija jednaka je onoj u bolesnika s UUC u drugim dijelovima svijeta, tako da hematurija predstavlja vodeći simptom koji bolesnika dovodi liječniku, osim u slučajevima kada se UUC nađe tijekom provođenja redovitog *screening* programa u endemskim žarištima.

1.4.3. DIJAGNOSTIČKA OBRADA i KLASIFIKACIJA TUMORA

Dijagnostička obrada s ciljem postavljanja definitivne dijagnoze, kao ni klasifikacija tumora određivanjem proširenosti bolesti ne razlikuje se od UUC u općoj populaciji.

1.4.4. LIJEČENJE

Standardna terapija za UUC u sklopu AAN uključuje totalnu nefroureterektomiju s ekscizijom dijela mokraćnog mjehura uz ušće uretera i regionalnu limfadenektomiju. Cistektomija se ne preporuča rutinski u bolesnika budući da je pojavnost karcinoma mokraćnog mjehura manja od pojavnosti urotelnih karcinoma gornjeg mokraćnog sustava. Cistektomija se preporuča jedino u slučaju kada su u mokraćnom mjehuru detektirani AA-DNA adukti. Konzervativni kirurški pristup rezerviran je za strogo odabranu skupinu bolesnika s bilateralnim tumorima u kojih je bitno očuvanje bubrežne funkcije. No ovi bolesnici ostaju pod povišenim rizikom lokalnog relapsa. Bolesnike s UUC treba pomno pratiti radi mogućeg razvoja novog tumora. Sistemska kemoterapija indicirana je za neresektabilnu i metastatsku bolest (18).

1.4.5. UUC U BOLESNIKA S AAN I TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM

U bolesnika s transplantiranim bubregom čija je osnovna bolest AAN uočena je veća incidencija urotelnih karcinoma nego u bolesnika s ostalim uzrocima bubrežnog zatajenja (33.3% naspram 0.67%) (66). Na temelju ovih opservacija donešena je konsenzusna odluka o bilateralnoj nefroureterektomiji u bolesnika s AAN prije transplantacije bubrega. U transplantiranih bolesnika se preporučuje rutinska citološka analiza urina i cistoskopija, a preporuča se primjeniti mTOR inhibitore u skupu imunosupresive terapije (18).

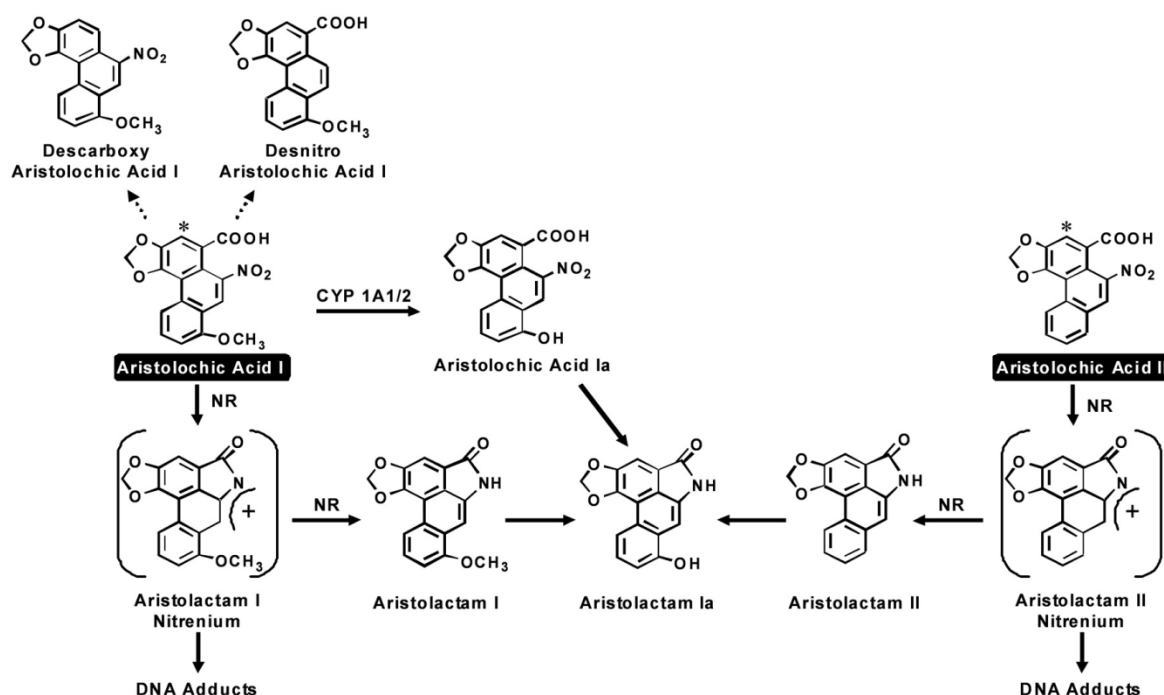
1.5. MEHANIZMI NEFROTOKSIČNOSTI I KARCINOGENOSTI

ARISTOLOHIČNE KISELINE

1.5.1. METABOLIZAM ARISTOLOHIČNE KISELINE

Aristolohična kiselina dokazano je nefrotoksična, mutagena i karcinogena (IARC skupina 1 ljudskih karcinogena), a karakteristično zahvaća dva ciljna tkiva: stanice proksimalnog bubrežnog tubula i urotelne stanice (67). Pojam aristolohična kiselina odnosi se na dvije strukturno slične nitrofenantrenske karboksilne kiseline - AA I i AA II koje nalazimo u ekstraktima biljaka roda *Aristolochia*. Nakon unosa u organizam AA se metabolizira u dvije faze. Prva faza, između ostalih metaboličkih reakcija uključuje nitroredukciju AA u ciklički N-acilnitrenium ion s delokaliziranim pozitivnim nabojem koji se može kovalentno vezati s egzocikličkim amino skupinama purinskih baza i tako formirati DNA adukte. Tri glavna adukta nađena u bolesnika s AAN su: deoksiadenozin-aristolaktam I, deoksigvanozin-aristolaktam II i deoksiadenozin-aristolaktam II. U ljudskim jetrenim mikrosomima reduktivna aktivacija AA provodi se većinom putem citokroma P450(CY)1A2, u manjoj mjeri preko CYP1A1, dok je u bubrežnim mikrosomima u ljudi NADPH/CYP reductaza najučinkovitija u biotransformaciji AA. Također NAP(P)H/kinin oksidoreduktaza (NQO1) i ksantin oksidaza, dva citosolna enzima prisutna u ljudskoj jetri i bubrezima kataliziraju aktivaciju AAI u DNA adukte. Prostaglandin H sintetaza (ciklooksigenaza, COX) odgovorna je za metabolizam AA u urotelnom tkivu. NQO1 se čini najbitnijim enzimom odgovornim za aktivaciju AA I u ljudi. Različiti čimbenici uključujući lijekove, pušenje, kemikalije i genetske polimorfizme utječu na razinu ekspresije i aktivnost ovih enzima što može objasniti razlike u osjetljivosti na toksičnost posljedično AA. Faza 2

metabolizacije AA rezultira prisutnošću metabolita AA u urinu i fecesu u konjugiranoj formi poput glukuronida, sulfata ili acetatnih estera (69).



Slika 1. Metabolizam AA i stvaranje adukata

*Prilagođeno prema Dickman K, Sweet D, Bonala R et al. *Physiological and Molecular Characterization of Aristolochic Acid Transport by the Kidney. J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338:588-597.

1.5.2. MUTAGENE I KARCINOGENE ODLIKE ARISTOLOHIČNE KISELINE

Deoksiadenozin-aristolaktam I, adukt je koji je najčešće detektiran u ciljnom tkivu i predstavlja mutagenu leziju koja dovodi do A:T->T:A transverzije. Ova specifična mutacija nađena je s velikom učestalošću u životinjskim modelima i u ljudi nakon korištenja AA: u H-ras protoonkogenu u tumorima uzrokovanih s AAI u glodavaca i u TP53 genu u DNA izoliranoj iz UUC povezanih s AA gdje je ova mutacija bila dominantna, a mutirani adenini prisutni isključivo na neprepisujućem lancu DNA. Prisutnost isključivo na neprepisujućem lancu DNA može se pripisati selektivnoj obradi aristolaktam-dA adukata putem popravka izrezivanjem nukleotida vezanim uz

transkripciju, dovodeći do dugogodišnjeg prisustva adukata u ljudskom tkivu (70, 14, 71, 72, 73). Do nedavno nije bilo jasno jesu li i ostali geni također podložni formaciji AA-DNA adukata i mogu li se AA adukti povezati s drugim oblicima karcinoma osim UUC. Dvije neovisne istraživačke skupine 2013. godine analizirale su potpisnu AA mutaciju u cijelom ljudskom genomu u osoba s UUC izloženih AA. Song Ling Poon i sur. i Margaret L. Hoang i sur. identificirali su konsenzusnu sekvencu (T/ CAG) kao potpisnu AA mutaciju (A>T) i uočili da su transverzije bile prisutne većinom na neprepisujućem lancu DNA, s čestom pojavnosću među genima vezanim uz remodeliranje kromatina i na akceptorskim mjestima izrezivanja (engl. *acceptor splice site*), što može doprinijeti karcinogenezi AA. Nadalje, Poon i sur. su detektirali AA-slični obrazac mutacije u 11 od 93 analizirana slučaja hepatocelularnog karcinoma (72, 73). Ova mutacija opisana je i u druga dva neovisna istraživanja hepatocelularnih karcinoma te u intrahepatičkih kolangiokarcinoma (74, 75, 76). Isti obrazac mutacije nedavno je nađen i u karcinomu svijetlih stanica bubrega u bolesnika porijeklom iz endemskog područja (77). Ova karakteristična potpisna mutacija sada ima svoje mjesto u COSMIC (*Catalog of somatic mutations in cancer*) bazi pod brojem 22, tzv. *Signature 22* (78).

1.5.3. NEFROTOKSIČNOST ARISTOLOHIČNE KISELINE

Mutagene i karcinogene odlike aristolohične kiseline sada su većinom poznate, no molekularni mehanizmi nefrotoksičnosti koji vode do progresivne intersticijske fibroze još nisu razjašnjeni. Čini se da je toksični učinak AA u bubregu koji rezultira nekrozom i apoptotskom ozljedom rezerviran isključivo za stanice proksimalnog tubula. Ovaj dio nefrona inače je podložan toksičnom oštećenju zbog svoje uloge u eliminaciji lijekova i

drugih ksenobiotika. Toksični učinak na proksimalni tubul moguće uključuje metaboličke i/ili procese posredovane transportom. Nedavno je dokazano da organski ionski prijenosnici 1 i 3 posreduju unosu AA I u proksimalni tubul miša i da mogu biti odgovorni za selektivnu toksičnost ovog nefrotoksina (68). Još uvijek nije jasno kolika je uloga transdiferencijacije i apoptoze u ovom brzonapredujećem tipu tubulointersticijske bolesti. Prema Pozdziku i suradnicima u AA modelu štakora aristolohična kiselina uzrokuje apoptozu proksimalnog tubula i epitelijalno-mezenhimalnu transformaciju. Ova studija pokazala je da je tubulotoksičnost rezultirala neispravnom aktivacijom antioksidativnih enzima i mitohondrijskim oštećenjem. Progresivna tubularna atrofija povezana je s oštećenom regeneracijom i apoptozom epitelnih stanica proksimalnog tubula (PTEC). Transmembranska migracija ovih stanica sa znakovima epitelijalno mezenhimalne tranzicije (EMT) rijetko je zabilježena. Nakupljanje stanica pozitivnih na vimentin i alfa-aktin glatkog mišića u intersticiju koje su pokazivale ekspresiju transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF β) uputilo je na povećanje broja rezidualnih peritubularnih fibroblasta i njihovu aktivaciju u miofibroblaste - što znači da se aktivirani rezidualni fibroblasti mogu smatrati glavnim izvorom odlaganja kolagena u eksperimentalnoj AAN (79). Druga studija dala je naznaku da AA uzrokuje smrt tubularnih epitelnih stanica putem apoptoze preko defosforilacije STAT3 i posttranslacijske aktivacije p53, što ide u prilog teoriji da p53 promovira ozljedu bubrega u AAN (80).

1.6. FUNKCIONALNA GENOMIKA

Središnja dogma molekularne biologije glasi da se kodirana genetska informacija (DNA) prepisuje u glasničku RNA prema kojoj se potom sintetiziraju proteini. Ljudski

genom sadrži otprilike $3,1 \times 10^9$ parova baza i 20 000 - 30 000 kodirajućih gena. Transkriptom pak sadrži 100 000-200 000 molekula mRNA dok proteom sadrži više od 1 000 000 proteina. Područje molekularne biologije koje koristi genomske podatke i proučava izražaj gena i proteina na globalnoj razini, fokusira se na transkripciji gena, translaciji i interakcijama između proteina i često uključuje analitičke metode visoke propusnosti (engl. *high-throughput methods*), naziva se funkcionalna genomika.

Stanice odgovaraju na okolišne signale mijenjajući izražaj gena koje sadrže u svojoj jezgri. Sve ljudske stanice imaju jednaki genetski kod sadržan u molekuli DNA, no u različitim su stanicama različiti geni aktivni, dok su ostali geni suprimirani. Otprilike 3-5% gena je aktivno u pojedinoj stanici i prepisuje se u mRNA i kasnije u proteine. Većina gena je selektivno suprimirana, tj potisnuta i to djelovanjem različitih mehanizama regulacije genske ekspresije, većinom na razini transkripcije gena. Kao odgovor na različite signale dolazi do promjene u ekspresiji gena što rezultira ekspresijom stotina produkata navedenih gena odnosno supresijom ostalih.

Karcinogeneza je proces koji se događa u više koraka, uključuje genske i epigenetske mehanizme rezultirajući u izmijenjenoj ekspresiji brojnih gena i posljedično tome dovodeći do nekontroliranog dijeljenja stanica i formiranjem maligne mase. Dostupne metode funkcionalne genomike koje daju uvid u poremećenu gensku ekspresiju u tumorima analizirajući tisuće gena istovremeno jesu metode profiliranja genske ekspresije pomoću genskih čipova, takozvanih *microarraya*. Alternativa genskim čipovima je metoda sekvenciranja RNA koja postaje sve popularnija i dostupnija. Analiza obrazaca genske ekspresije daje vrijedne podatke, korisne u tumorskoj klasifikaciji i prognozi.

1.7. GENSKI ČIPOVI I PROFILIRANJE GENSKE EKSPRESIJE

Microarray ili genski čip je pločica koja sadrži ciljano raspoređene DNA (cDNA *microarray*) ili oligonukleotide (*oligoarray*) koji predstavljaju pojedine gene. Glavni princip na kojem počiva tehnologija genskog čipa je uparivanje komplementarnih nukleotida, tj. formiranje nukleinskih kiselina s dvostrukom uzvojnicom. Nekoliko je koraka u analizi genskim čipovima:

- priprema genskog čipa
- generiranje fluorescentnih ciljnih molekula od RNA uzoraka
- hibridizacija s probama
- generiranje podataka: skeniranje intenziteta signala označenih hibridiziranih proba
- analiza podataka: probiranje biološki korisnih informacija iz velike količine podataka koji se dobivaju analizom genskih čipova (81).

Kako bi se učinila analiza na genskim čipovima potrebno je izolirati glasničku RNA iz uzoraka tkiva. Glasnička ili mRNA predstavlja sve gene koji su u tom trenutku eksprimirani. mRNA se pretvara u cDNA koja se potom prepisuje u cRNA u prisustvu nukleotida označenih biotinom. Biotinizirana cRNA se hibridizira na oligo probe na čipovima nakon čega slijedi vezanje na konjugirane fluorofore. Svako mjesto na čipu predstavlja kvantifikaciju ekspresije pojedinog gena u danom uzorku. Nakon završetka hibridizacije slijedi ispiranje *microarraya*, te obasjavanje laserskim zrakama kako bi se aktivirali fluorofori vezani na hibridizirane ciljne molekule. Količina ciljnih molekula u pojedinoj točki procjenjuje se skeniranjem intenziteta emitirane fluorescencije vezanih reporterskih molekula. Neobrađeni podaci parova genskih čipova (čip tumorskog tkiva i čip zdravog kontrolnog uzorka) međusobno se uspoređuju ne bi li se identificirali

različito eksprimirani geni. Potom slijedi normalizacija podataka. Normalizirani neobrađeni podaci genske ekspresije izraženi su u obliku omjera ekspresije. Na ovim podacima provode se daljnje statističke analize kako bi se odredili geni koji su značajno različito eksprimirani između dvaju tkiva.

Brojne su mogućnosti kliničke primjene genskih čipova u tumorima: profiliranje genske ekspresije identificira gene i puteve koji su aberantno eksprimirani tijekom karcinogeneze, pomaže u razumijevanju molekularne patogeneze karcinoma, postavljanju dijagnoze, prognozi i klasifikaciji bolesti te može ukazati na nove terapijske ciljne molekule.

Profiliranje genske ekspresije na genskim čipovima ne primjenjuje se još u svakodnevnoj kliničkoj praksi u onkologiji, međutim korist njihove potencijalne primjene pokazana je na brojnim hematoloških i solidnim tumorima poput akutne leukemije, karcinoma prostate, kolona, dojke, pluća i limfoma.

1.7.1. ISTRAŽIVANJA EKSPRESIJE GENA U UUC I KARCINOMIMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Za sada postoji samo nekoliko objavljenih istraživanja genske ekspresije u UUC uzorcima. Zhang i suradnici proveli su profiliranje mRNA UUC i drugih tumora bubrega koristeći genske čipove i identificirali nekolicinu gena različito eksprimiranih u UUC u odnosu na normalno tkivo bubrega, između kojih su bili FXYD3 (MAT-8) kao najznačajnije disreguliran gen, S100P, TRIM29 (ATDC gen). FXYD3 se pokazao kao visoko specifičan za UUC u usporedbi s ostalim bubrežnim tumorima i preporučan je kao potencijalni marker za razlikovanje UUC i normalnog tkiva odnosno karcinoma svijetlih stanica bubrega (82). Isti autori proveli su usporedno profiliranje genske

ekspresije UUC i karcinoma mokraćnog mjehura i definirali profile koji su bili skoro jednaki osim malog broja gena vezanih uz signalni put vezanja kloridnog iona prisutnih u UUC (83). Još jedno istraživanje istih autora identificiralo je aktivnost PI3K/AKT puta u ljudskim urotelnim karcinomima pijelona, dijelom zbog postojanja aktivirajućih mutacija PIK3CA i gubitka funkcije PTEN (84). Wu i suradnici prvi su analizirali ekspresiju mRNA koristeći metodu masivnog paralelnog sekvenciranja. Identificirali su 5231 dereguliranu mRNA. Putevi koji su bili značajno poremećeni u UUC bili su distribuirani u dvije funkcionalne kategorije: putevi vezni uz staničnu proliferaciju poput p53 signalizacije i staničnog ciklusa koji su bili obogaćeni genima u skupini povišeno eksprimiranih u tumorskom tkivu te metabolički putevi poput PPAR signalnog puta i glicin serin treonin metabolizirajućeg puta, koji su bili obogaćeni genima smanjeno izraženim u tumorima. Među brojnim značajno disreguliranim znanim tumorskim genima izdvojila su se tri: ALDH2, CCNE1, SMAD3. Produkti ovih gena bili su povezani s prognozom UUC (85).

S druge strane puno više studija je objavljeno na temu profiliranje genske ekspresije mokraćnog mjehura. Glavni cilj istraživača bio je otkriti "genske potpise" značajne za klasifikaciju i prognozu ovih tumora. Lindgren i suradnici definirali su genske potpise na temelju kojih se može klasificirati karcinom u tumor niskog gradusa (G1,G2) i visokog gradusa (G3), kao i potpise gena neinvazivnih i invazivnih tumora. Autori su predložili molekularno stupnjevanje bolesti kao komplementarnu metodu standardnom patološkom stupnjevanju. Također su identificirali set disreguliranih gena prognostički važnih za metastaze i preživljenje bez povrata bolesti (86). Sanchez-Carbayo i sur. učinili su ekspresijsko profiliranje gena karcinoma mokraćnog mjehura pomoću oligonukleotidnih genskih čipova i našli 8 najznačajnije dismoduliranih gena kojima je

moгуće razlikovati površne i invazivne tumore: RAB31, COL16A1, AEBP1, MT1L, ACTB2, NNMT, ACTB1, GAS1. Identificirali su gene povezane s preživljenjem analizirajući obje skupine (invazivni i nenvazivni) tumora mjehura: PPIA, TCG9, NXF1, HCLS1 te gene povezane s preživljenjem isključivo u skupini invazivnih karcinoma: HCLS1, ANK3, BIRC3, CD54 i TP53 AP1. Na kraju su identificirali genski potpis povezan s metastazama u limfne čvorove i lošim ishodom (87). Velika metaanaliza Riestera i sur. ukazala je na genske potpise prediktivne za ukupno preživljenje bolesnika s invazivnim tumorima (T2-T4) koji su između ostalih uključivali i ove gene: APOBEC3B, ATF3, CCL5, DGCR2, ENDOD1, FADD, JUNB, LMO7, MAP2K1, MAP3K1, PDGFC, PEA15, PFN1, PPP1R12A, PRDX1, PRMT1, SLC1A5, TNFAIP6, TSG101, TSPAN5. Također su uspoređujući gensku ekspresiju invazivnih i neinvazivnih karcinoma identificirali 636 različito eksprimirana gena: među genima povišenog izražaja u invazivnih tumora bili su FN1, gen koji je dio integrin signalnog puta, kao i nekoliko ostalih članova ovog puta (ACTN1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL6A3, COL11A1, COL16A1, FBN1, FLNA, LUM, TGFBI, i TNC). Uočili su da su geni TGF- β signalnog puta prisutni među značajno eksprimiranim genima: SMAD3, SMAD6 i BMP7 našli su se među povišeno izraženim genima u neinvazivnim tumorima, dok u INHBA, NNMT i POSTN bili povišeno eksprimirani u invazivim tumorima. Geni koji su bili značajno dismodulirani u bolesnika s metastazama i lošim ishodom uključivali su PERP, ATXN10 i PCM1 (88).

1.7. 2. ISTRAŽIVANJA EKSPRESIJE GENA U UUC POVEZANIH S ARISTOLOHIČNOM KISELINOM

Dosad nije provedeno istraživanje profiliranja genske ekspresije UUC povezanih s aristolohičnom kiselinom u ljudi. Dostupno je nekoliko studija na životinjama (miševi, štakori) tretiranim s AA i to u dozama za koje je ranije dokazano da su karcinogene, tj da dovode do nastanka tumora. Chen i sur. učinili su profiliranje ekspresije gena tkiva bubrega i jetre štakora tretiranim s karcinogenim dozama AA. Geni koji su bili značajno dismodulirani u tkivu bubrega uključivali su gene s ulogom u različitim stadijima karcinogeneze uključujući metabolizam AA, popravak DNA, stanični ciklus, stanični razvoj, staničnu signalizaciju, stanični rast i proliferaciju, morfologiju stanica, staničnu smrt i morfologiju tumora. Dodatna analiza pokazala je najznačajnije procese povezane s izloženošću AA u bubregu: obrambeni odgovor (uključujući apoptozu i imuni odgovor) s genima koji su bili značajno povišeni u tumoru i metabolizam organskih kiselina među značajno sniženim genima (89). Arlt i sur. učinili su analizu genske ekspresije bubrežnog i jetrenog tkiva Hupki miševa (ljudski TP53 *knock-in*) liječenih karcinogenim dozama AA. U ovoj studiji nije opažen nastanak neoplazmi, no neovisno o tome istraživanje daje uvid u promjene u genskoj ekspresiji uzrokovane s AA. Analiza genske ekspresije otkrila je veliki broj značajno dereguliranih gena u tkivu bubrega koji su funkcionalno bili vezani s apoptozom, staničnim ciklusom, odgovorom na stres, imunim sustavom, upalnim odgovorom i razvojem bubrega. Najznačajnije modulirani putevi bili su Nfkb, aril hidrokarbon receptor, Tp53 i signalizacija staničnog ciklusa (90). Li i suradnici proveli su integriranu studiju koja je uključivala određivanje mikroRNA, mRNA i proteinsku ekspresiju tkiva bubrega štakora koji su dobivali karcinogene doze AA. Pronađeno je 6794 različito eksprimiranih mRNA, a većina ovih

gena povezana je s tumorima, dok su najznačajniji putevi uključivali WNT/ β -aktin, mitohondrijsku disfunkciju i degradaciju valina. Podaci o mikroRNA bit će izloženi kasnije u tekstu (91).

1.8. MikroRNA

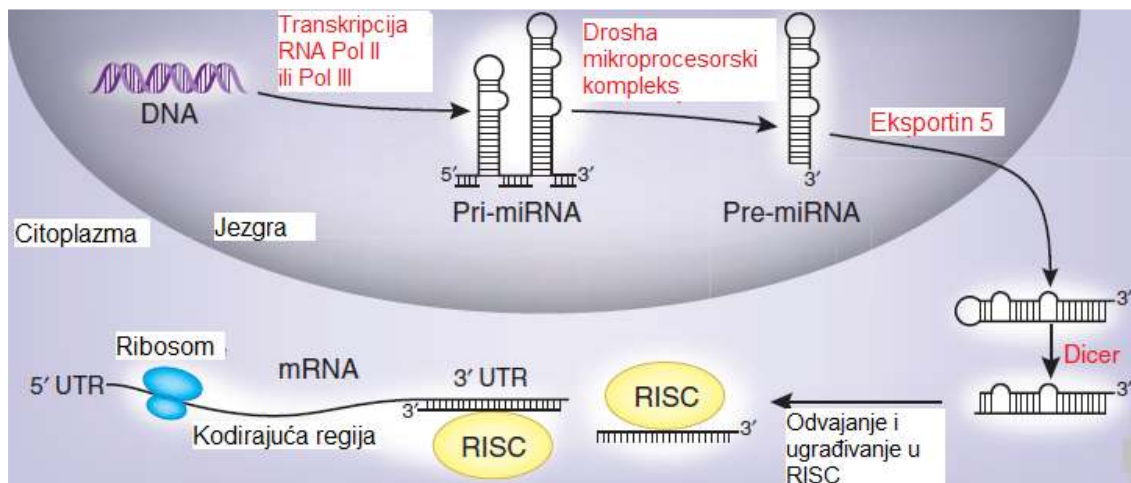
MikroRNA (ili miRNA, miR) skupina su malih, 22-nukleotida dugih nekodirajućih RNA koji funkcioniraju kao posttranskripcijski regulatori genske ekspresije u genomima životinja i biljaka (92). Ove molekule otkrivene su 1993. godine u organizmu *Caenorhabditis elegans*, a formalno ime dobile su 2001. godine (93).

U ljudi mikroRNA čine >1% svih gena i smatra se da reguliraju >30% svih gena koji kodiraju proteine. Prema bazi mikroRNA miRBase verzija 21 postoji 2588 zrelih ljudskih miRNA (94). MikroRNA imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije u različitim razvojnim i fiziološkim procesima poput diferencijacije, proliferacije, apoptoze i metaboličke homeostaze. S druge strane njihova disregulacija povezana je s brojnim humanim bolestima uključujući i tumore, gdje je pokazano da imaju značajnu ulogu u njihovom razvoju i progresiji, utječući na proliferaciju tumora, apoptozu, invazivnost/metastaze i angiogenezu.

MikroRNA su grupirane u obitelji prema motivima za raspoznavanje ciljnih molekula koji se nalazi uglavnom na 5' kraju zrele mikroRNA. Jedna mikroRNA može imati više različitih ciljnih mRNA, dok jedna mRNA može biti meta više različitih mikroRNA.

MikroRNA se prepisuju RNA polimerazom II, a inicijalno postoje u obliku velike prekursorske molekule koja se zove primarna miRNA (pri-miRNA). Pri-miRNA se dalje prerađuje u jezgri pomoću enzima RNaze III zvanog Drosha te proteina vezajućeg za dvostruku RNA zvanog Pasha prilikom čega nastaje 70 nukleotida duga

prekursorska miRNA (pre-miRNA). Za napomenuti je da postoje alternativni mehanizmi biogeneze mikroRNA za koje nije potreban enzim Drosha. Pre-miRNA se potom eksportira iz jezgre u citoplazmu pomoću transportera eksportin 5 i podliježe dodatnom koraku pregradnje prilikom čega se iz molekule pre-miRNA generira dvostruka, 22 nukleotida duga RNA, koja se naziva miRNA:miRNA* dupleks. Za ovaj korak ključan je još jedan enzim RNAza III - Dicer. Nakon ovoga slijedi uklapanje miRNA:miRNA* dupleksa u miRISC kompleks (RISC- RNA inducirani sustav za utišavanje, od engl. RNA induced silencing complex). Zreli lanac miRNA ostaje zadržan u miRISC kompleksu i negativno regulira svoje ciljne gene. Ovisno o stupnju podudarnosti između mikroRNA i njene ciljne molekule moguća je regulacija mRNA na dva načina: ukoliko se miRNA veže s potpunom ili skoro potpunom komplementarnosti za sekvencu mRNA, dolazi do takozvane RNA-uvjetovane interferencije (RNAi) prilikom čega se mRNA "cijepa" pomoću ribonukleaza koje su dio miRISC kompleksa, u konačnici dovodeći do raspada mRNA. Ovaj se mehanizam najčešće nalazi u biljaka, međutim opisan je i u životinja. Većina životinja pak najčešće koristi drugi način genske regulacije koja ne uključuje raspad ciljane mRNA. U ovom slučaju komplementarnost između molekula miRNA i mRNA nije potpuna. Nakon vezanja ove dvije molekule dolazi do represije genske ekspresije na nivou translacije putem RISC kompleksa koji je sličan onome korištenom u RNA interferenciji. Na ovaj način dolazi do smanjenja razine proteina, dok nivo mRNA nije zahvaćen (95).

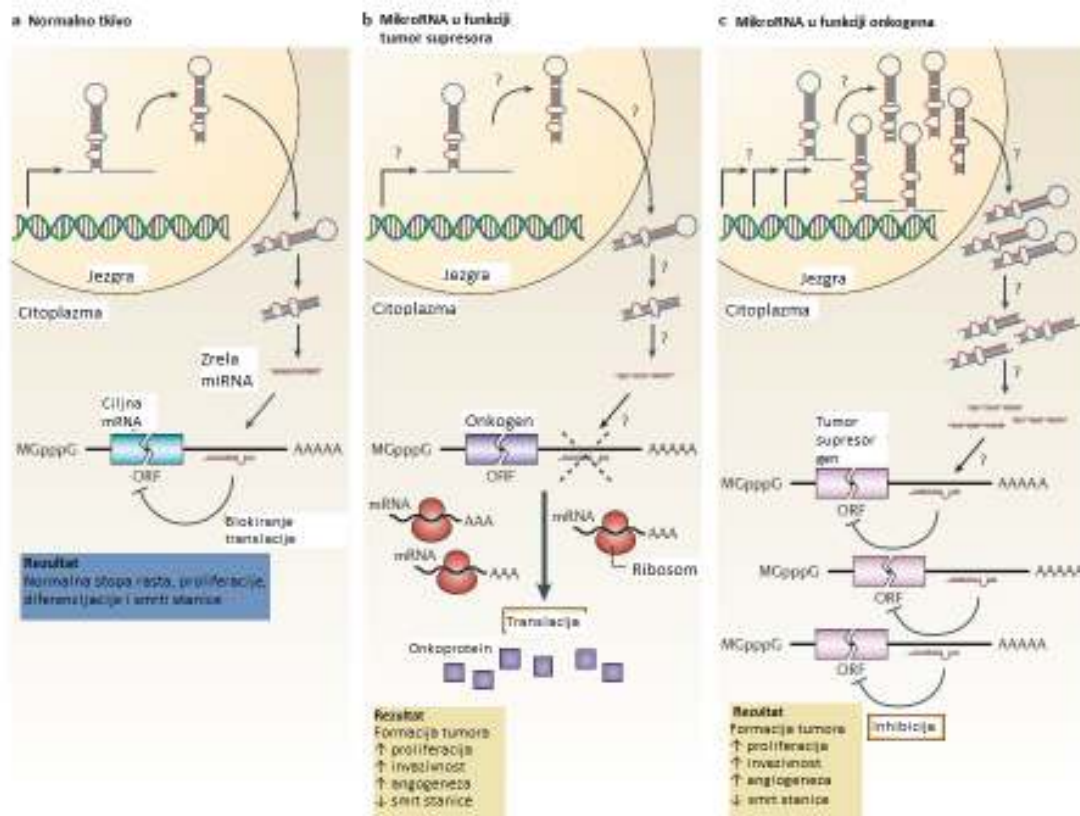


Slika 2. Biogeneza mikroRNA

Legenda: Pri-miRNA-primarna mikroRNA, Pre-miRNA-prekursorska mikroRNA, RISC-RNA inducirani sustav za utišavanje, RNA Pol II, III- RNA polimeraza II, III, 3'UTR-3' neprepisujuća regija

*Prilagođeno prema: Jeffrey SS. *Cancer biomarker profiling with microRNAs*. *Nat Biotech* 2008; 26: 400-401.

Većina ljudskih miRNA nalazi se u intronima gena koji kodiraju proteine ili nekodirajućim mRNA transkriptima, dok je ostatak lociran u egzonima nekodirajućih mRNA gena, u području 3' kraja mRNA gena ili u klasterima s drugim miRNA genima. MikroRNA u tumorima funkcioniraju kao tumor supresori ili onkogeni. One miRNA koje su locirane u genomskim regijama amplificiranim u tumorima funkcioniraju kao onkogeni, dok miRNA koje se inače nalaze u područjima kromosoma koji su brisani u tumorima funkcioniraju kao tumor supresori. Glavni podležeci mehanizam uslijed kojeg dolazi do promjene funkcije miRNA u tumorima uključuje aberantnu gensku ekspresiju, karakteriziranu abnormalnom razinom ekspresije zrelih ili prekursorskih miRNA sekvenci u usporedbi s normalnim tkivom. Za sada su opisana 3 mehanizma koja mogu objasniti nenormalnu ekspresiju specifičnih miRNA gena: lociranost miRNA u genomskim regijama povezanim s tumorima, epigenetska regulacija miRNA ekspresije i pogreške u genima i proteinima koji sudjeluju u procesuiranju miRNA.



Slika 3. Funkcioniranje mikroRNA kao tumor supresora odnosno onkogene

Legenda: ORF - otvoreni okvir čitanja

* Prilagođeno prema: *Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006;6: 259-269.*

Primjeri tumor supresorskih i onkogenih mikroRNA:

Tumor supresori:

MiR-15/16 klaster (sniženo eksprimirane u kroničnoj limfatičnoj leukemiji, karcinomu prostate, multiplom mijelomu)

Let-7 (negativno reguliraju Ras onkogen; u karcinomu pluća reguliraju staničnu proliferaciju i diferencijaciju; sniženo eksprimirane u karcinomu dojke, urotelnim karcinomima i karcinomu cerviksa)

MiR-34 (sniženo eksprimirane u karcinomu pluća nemalih stanica)

MiR-200 obitelj (sniženo eksprimirana u ljudskim tumorima primjerice karcinomu dojke, dovodi do EMT i olakšava invaziju i razvoj metastaza, gubitak miR-200 povezan je s agresivnim fenotipom tumora).

MiR-143/145 (sniženo eksprimirane u kolorektalnom karcinomu, u karcinomu dojke, prostate, cerviksa, limfoidnim neoplazmama)

Onkogeni:

MiR-155 (povišeno eksprimirana u NHL, Mb Hodgkin, akutnoj mijeloičnoj leukemiji i solidnim tumorima: karcinomu dojke, kolona, cerviksa, duktalnom adenokarcinomu gušterače, karcinomu štitnjače, karcinomu pluća)

MiR 17/92 klaster (povišeno eksprimiran u karcinomu pluća malih stanica, karcinomu kolona, neuroblastomu, meduloblastomu, karcinomu želuca, osteosarkomu; povišena uslijed djelovanja MYC, negativno modulira E2F1 onkogen)

MiR-222/221 (povišeno eksprimirane u hepatocelularnom karcinomu, ER negativnom karcinomu dojke, karcinomu štitnjače, melanomu, karcinomu pluća nemalih stanica).

MiR-21 (antiapoptotska miRNA, pojačano eksprimirana u glioblastomu i karcinomu dojke).

I tumorsko i zdravo tkivo imaju svoj specifičan mikroRNA potpis. Različita ekspresija mikroRNA prisutna je u različitim tipovima tumora. MikroRNA potpis korelira s kliničkim i biološkim karakteristikama tumora, uključujući tip tkiva, stupanj diferencijacije, agresivnost i odgovor na terapiju. MikroRNA imaju nekoliko uloga u kliničkom radu, u prvom redu mogu služiti kao dijagnostičko sredstvo (primjerice dijagnostika karcinoma nepoznatog primarnog sijela), imaju prognostičku ulogu (npr. očekivano trajanje života u bolesnika s karcinomom pluća) i predstavljaju novo mjesto

potencijalne terapije tumora (inhibicija mikroRNA koristeći tzv. antimiR, antagomiR molekule ili zatvorene nukleinske kiseline (od engl. *locked nucleic acid*) ili nadomještanje funkcije mikroRNA koristeći takozvane mikroRNA *mimic* molekule).

Profiliranje mikroRNA obično se provodi jednom od sljedećih metoda: oligonukleotidni miRNA čipovi, protočna citometrijska metoda s kuglicama (od engl. *bead-based flow cytometry*), kvantitativni *real-time* PCR, miRAGE analiza (miRNA analiza cijelog genoma sa serijskim analizama genske ekspresije), RAKE analiza (visoko propusna *array* bazirana Klenowa enzimskom metodom) ili sekvenciranje sljedeće generacije.

1.8.1. MikroRNA U EN/AAN

Za sada su jedini podaci o ekspresiji mikroRNA u nefropatiji aristolohične kiseline dostupni od grupe autora Jenkins i suradnici koji su kultivirali epitelne stanice proksimalnog tubula i tretirali ih aristolohičnom kiselinom. Identificirali su skupinu povišeno reguliranih mikroRNA koja je uključivala miR-192, miR-194, miR-450a, miR-542-3p. Pojačana ekspresija miR-192 utjecala je na zaustavljanje staničnog ciklusa u G2/M fazi preko utišavanja E3 ubikvitin ligaze MDM2, negativnog regulatora p53. p53 uzrokovao je transkripciju p21^{cip1}, zastoj rasta i oštećenja DNA rezultirajući inaktivacijom i disocijacijom kompleksa za promicanje sazrijevanja. Zaključno, ovi podaci ukazuju na ključnu ulogu miR-192 u posredovanju zaustavljanja staničnog ciklusa u G2/M fazi u epitelnim stanicama proksimalnog bubrežnog tubula nakon toksičnog oštećenja uzrokovanog aristolohičnom kiselinom (97).

1.8.2. MikroRNA U UROTELNIM KARCINOMIMA

Dostupna su dva istraživanja o mikroRNA u UUC i puno više istraživanja o mikroRNA u karcinomima mokraćnog mjehura. Prema Izquierdo i suradnicima 26 mikroRNA različito su eksprimirane u metastatskim naspram nemetastatskim UUC, 20 sniženih i 6 povišenih: miR-31, miR-34a, miR-141, miR-149, miR-200a, miR-205, miR-378, miR-93, miR-7, miR-15a, miR-106b, miR-200c, miR-210, miR-610, miR-17, miR-200b, miR-181a-2, miR-93, miR-183, miR-378 (snižene) i miR-99a, miR-195, miR-487b, miR-493, miR-629, miR-95 (povišene). MiR-31 i miR-149 bile su povezane s progresijom tumora, a miR-149 s tumor specifičnim preživljenjem (98). Prema Zaravinosu 16 mikroRNA bile su specifično snižene u UUC naspram normalnog tkiva bubrega (parenhim/korteks): miR-3144-5p, miR-193b-3p, miR-587, miR-3177-3p, miR-769-5p, miR-617, miR-3615, miR-148-5p, miR24-2-5p, miR-142-5p, miR-3164, miR-514b-5p, miR-375, miR-520c-3p, miR-191-5p, miR-520b/miR-520c-3p, dok je 5 mikroRNA bilo značajno povišeno u UUC: miR-885-5p, miR-1912, miR-378a-5p, miR-24-3p, miR-26a-2-3p. MiR-3648, miR-3656 i miR-3687 proizašle su kao najbolji molekularni pokazatelji za razliku između UUC i normalnog tkiva bubrega. Najznačajnije biološke funkcije dereguliranih miRNA definirane *Ingenuity pathway* analizom uključivale su sljedeće: upala, upalni odgovor, bubrežne i urološke bolesti, karcinomi i bolesti reproduktivnog sustava, dok su funkcije vezane uz 2 najveće miRNA mreže bile: 1) poremećaj vezivnog tkiva, upalne bolesti, upalni odgovor i 2) karcinom, bolest reproduktivnog sustava, bubrežne i urološke bolesti. Inzulin, hidrogen peroksid i ribosomalni protein S15 sačinjavali su glavne sredšnje čvorove u prvoj mreži, dok je tumor supresorski protein p53 činio središnji čvor u drugoj mreži (99).

Brojna istraživanja miRNA profila u karcinomima mokraćnog mjehura otkrila su mnoštvo različito eksprimiranih mikroRNA. Budući da su korištene različite metode profiliranja moguće je da su varirajući rezultati između studija dijelom uzrokovani navedenom razlikom u metodologiji. Najčešće snižene miRNA u istraživanjima mokraćnog mjehura bile su miR-145, 125b, 143, dok su kao najčešće povišene bile miR-182 i miR-183.

Bit će prikazano nekoliko studija provedenih u posljednjih desetak godina, dok je opsežan popis različito moduliranih mikroRNA u karcinomima mokraćnog mjehura u odnosu na zdravo tkivo prikazano u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Ljudske mikroRNA sniženo eksprimirane u karcinomu mokraćnog mjehura

ZRELA SEKVENCA	SEKVENCA MATIČNE PETLJE	LOKUS	GEN DOMAĆIN	miRNA U KLASTERU	CILJNI GENI	CILJNI PUTEVI
miR-145-5p	miR-145	5q32	-	miR-143	CBFB, PPP3CA, CLINT1	Apoptoz a i provoden je signala
miR-125b	miR-125b-1	11q24	RP11-166D19.1	-	E2F3	Apoptoz a i prolifera cija
miR-125b	miR-125b-2	21q21	LINC00478	-	E2F3	Apoptoz a i prolifera cija
miR-143-3p	miR-143	5q32	-	miR-145	MAPK7; AKR1; SERPIN E1	MAPK, Plazmino gen aktivator sustav
miR-1	miR1-1	20q13	C20orf166	miR-133a-2	SRSF9,T AGLN2	Apoptoz a
miR-1	miR1-2	18q11	RP11-26819.2	miR-133a-1	SRSF9,T AGLN2	Apoptoz a
miR-26a	miR-26a-1	3p22	CTDSPL	-	-	-
miR-26a	miR-26a-2	12q14	CTDSPL2	-	-	-
miR-29a	miR-29a	7q32	MIR291	miR-29b-1	-	-
miR-29c	miR-29c	1q32	-	miR-29b-2	-	-
miR-100	miR-100	11q24	-	let-7a-2	FGFR3	Prolifera cija
miR-133a	miR-133a-1	18q11	-	miR-1-2	TAGLN 2;LASP1 ;KRT7;F SCN1	Apoptoz a; Citoskele ton; Diferenci jacija
miR-133a	miR-133a-2	20q13	C20orf166	miR-1-1	TAGLN 2;LASP1 ;KRT7;F SCN1	Apoptoz a; Citoskele ton; Diferenci jacija
miR-133b	miR-133b	6p12	-	miR-206	-	-
miR-195	miR-195	17p13	MIR497HG	miR-497	CDK4	Stanični ciklus

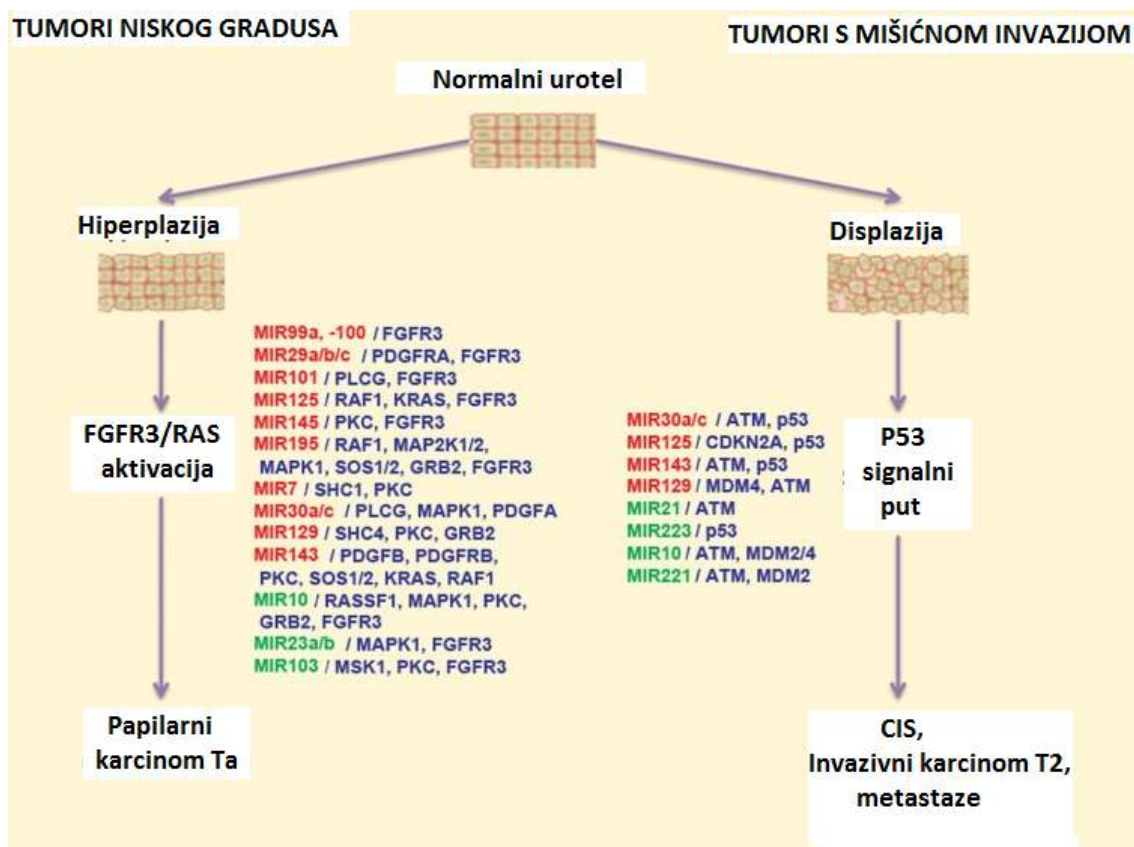
* Prilagođeno prema: *Yoshino H, Seki N, Itesako T et al. Aberrant expression of microRNAs in bladder cancer. Nat Rev Urol. 2013;10:396-404.*

Tablica 5. Ljudske mikroRNA povišeno eksprimirane u karcinomu mokraćnog mjehura

ZRELA SEKVENCA	SEKVENCA MATIČNE PETLJE	LOKUS	GEN DOMAĆIN	miRNA U KLASTERU	CILJNI GENI	CILJNI PUTEVI
miR-182	miR-182	7q32	-	miR-183, miR-96	-	-
miR-183	miR-183	7q32	-	miR-182, miR-96	-	-
miR-17-5p	miR-17	13q31	MIR17HG	miR-18a, 19a, 20a, 19b-1, 92a-1	MYC; PTEN (clustered miRs)	Apoptoza i mTOR (miR iz klastera)
miR-20a	miR-20a	13q31	MIR17HG	miR-17, 18a, 19a, 19b-1, 92a-1	MYC PTEN (clustered miRs)	Apoptoza i mTOR (miR iz klastera)
miR-93	miR-93	7q22	MCM7	miR-106b, miR-25	-	-
miR-200c	miR-200c	12p13	U47924.27	miR-141	Zeb1/2; ERFF1	EMT
miR-224	miR-224	Xq28	GABRE	miR-452	-	-

* Prilagođeno prema: *Yoshino H, Seki N, Itesako T et al. Aberrant expression of microRNAs in bladder cancer. Nat Rev Urol. 2013;10:396-404.*

Za molekularne mehanizme karcinoma mokraćnog mjehura važno je naglasiti da postoje dva glavna puta uključena u karcinogenezu rezultirajući ili nastankom papilarnog/neinvazivnog karcinoma ili invazivnog oblika ovog tumora. Riječ je o ova dva puta: RAS signalni put (FGFR3 i ostali receptori za faktore rasta sudjeluju u aktivaciji puta dovodeći do pojačane proliferacije stanica, motiliteta i karcinozne transformacije preko hiperplazije normalnog urotela), i p53 signalnom putu (razvoj karcinoma in situ, invazivni i metastatski preko urotelne displazije) (101). Dva glavna puta i povezane miRNA prikazai su na slici 4.



Slika 4. Model "dva puta" u nastanku karcinoma mokraćnog mjehura i mikroRNA koje sudjeluju u regulaciji tih puteva. Snižene mikroRNA prikazane su crvenom bojom, dok su povišeno eksprimirane miRNA prikazane u zelenoj boji. Ciljni geni ovih mikroRNA prikazani su plavom bojom.

*Prilagođeno prema: Zabolotneva AA, Zhavoronkov A, Garazha AV et al. *Characteristic patterns of microRNA expression in human bladder cancer. Front Genet.* 2013;3:310-314.

Catto i suradnici prikazali su sniženu ekspresiju miR-99a, miR-100, miR-101 i miR-145 u karcinomu mokraćnog mjehura bez muskularne invazije (od eng. *non muscle invasive bladder cancer*, NMIBC) u usporedbi s invazivnim tumorima (engl. *muscle invasive bladder cancer*, MIBC). Za MiR-99a i miR-100 eksperimentalno je dokazan ciljni gen FGFR3. Među najznačajnijim povišeno moduliranim miRNA u MIBC bila je miR-21, za koju je poznato da suprimira p53 put u stanicama glioblastoma i miR-373 koja inače promovira prometastatske puteve u brojnim tumorima (103). Gottardo i suradnici identificirali su povišenje sljedećih miRNA u NMIBC i MIBC naspram normalnog

urotela: miR-17-5p, miR-23a/b, miR-26b, miR-103-1, miR-185, miR-203, miR-205, miR-221, miR-223 (104). Baffa i sur uočili su sniženu ekspresiju miR-143, 145, 320 i povišenu ekspresiju miR-10b, 29b, 142-5p u primarnih MIBC u usporedbi s metastatskim limfnim čvorovima, zaključujući da ekspresija mikroRNA postaje progresivno poremećena kako urotelne stanice razvijaju invazivni i potom metastatski fenotip (105). Veerla je koristeći metodu hijerarhijskog klasteriranja podataka dobivenih profiliranjem mikroRNA identificirao ekspresijski profil od 51 mikroRNA na temelju kojeg je bilo moguće razlikovati 3 velika klastera karcinoma mokraćnog mjehura koji su odgovarali Ta, T1 i T2-T3 tumorima. MikroRNA visoko eksprimirane u T2/T3 tumorima bile su miR-125b i miR-222, do je miR-10 bila visoko izražena u Ta tumorima. MiR-452 bila je povezana s metastazama u limfnim čvorovima (106). Summerhayesova grupa identificirala je omjer miR-21:miR-205 koji je bio povišen za invazivne naspram neinvazivnih tumora (107). Han i suradnici prvi su koristili sekvenciranje sljedeće generacije i identificirali miR-96 kao najznačajnije povišenu, a miR-490-5p najznačajnije sniženu mikroRNA u MIBC u odnosu na normalni priležeci urotel. Također su opisali klaster mikroRNA koji su bili povišeni u karcinomu mokraćnog mjehura: miR-96, 182, 183 (kromosom 7); miR-200b and 429 (kromosom 1); mir-200c and 141 (kromosom 12); miR-17 and 92 (kromosom 13). Dodatno, klaster miR-143/145 na kromosomu 5 bio je značajno snižen (108). Lee i sur. izmjerili su nivo ekspresije miR-145, miR-205, miR-125b i miR-200c u različitim gradusima karcinoma mokraćnog mjehura. MiR-205 se pokazala da može razlikovati papilarni urotelni karcinom niskog gradusa od papilarnog urotelnog karcinoma visokog gradusa dok je miR-145 razlikovala papilarni karcinom visokog gradusa od infiltrativnog karcinoma. Isti autori uočili su češću ZEB1/2 imunoreaktivnost u papilarnim urotelnim

karcinomima visokog gradusa i invazivnim urotelnim karcinomima mokraćnog mjehura (109). Zaravinos i suradnici detektirali su miR-10b, 19a, 126, 145, 221, 296-5p i 378 kao značajno snižene mikroRNA u karcinomu mokraćnog mjehura u odnosu na prilježni normalni urotel, od kojih je miR-145 bila najznačajnije snižena. Nisu našli značajnih razlika između papilarnih urotelnih karcinoma niskog gradusa i invazivnih tumora visokog gradusa. Ovi autori preporučili su miR-21 i miR-210 kao mikroRNA prognostične čimbenike za ukupno preživljenje, miR-21 za tumorske metastaze, miR-21 i miR-378 za relaps tumora te miR-145 za stadij tumora (110). MiR-183 i posebno miR-96 izolirane iz urina predložene su od Yamade i suradnika kao potencijalni tumorski markeri karcinoma mokraćnog mjehura s osjetljivošću i specifičnošću od 70 i 90% (111).

1.8.3. MikroRNA U UROTELNIM KARCINOMIMA POVEZANIM S AA

Nema ljudskih ili životinjskih studija profiliranja mikroRNA u urotelnim karcinomima povezanim s AA. Nedavno su objavljena dva istraživanja na životinjama o mikroRNA odgovoru u tkivu bubrega štakora nakon tretmana s mutagenom i karcinogenom dozom AA. Prva studija provedena od Menga i sur. uključivala je tretman transgeničnih *Big Blue* štakora s visokim dozama AA za koje je ranije dokazano da uzrokuju tumore bubrega. Ovi autori učinili su analizu miRNA ekspresije tkiva bubrega navedenih štakora na čipovima, koristeći štakore netretirane s AA kao kontrolnu skupinu. Ovom analizom identificirali su potpis od 19 različito eksprimiranih mikroRNA, od kojih je 8 bilo povišeno (miR-21, miR-34a, miR-10b, miR-182, miR-30e, miR-183, miR-10a, miR-15b), 11 sniženo (miR-206, miR-409a, miR-140, miR-103, miR-107, miR-192, miR-320, miR-194, miR-122, miR-296, miR-378a). Najznačajnije dismodulirane

mikroRNA bile su miR-21, miR-34a, miR-10b-5p, miR-182, miR-30e. Sve ove mikroRNA bile su povezane s funkcijom karcinoma. Prilikom evaluiranja odnosa među ovim mikroRNA koristeći analizu mreža uočeno je da dvije najznačajnije mreže sadrže mikroRNA povezane s tumorima, staničnom smrću i preživljenjem. Sedamnaest značajno eksprimiranih mikroRNA bile su povezane s p53. Povišena ekspresija miR-21 korelirala je s karcinogenošću AA dok je povišena ekspresija miR-34a korelirala s mutagenošću AA (112). Li i sur proveli su integriranu analizu mikroRNA, mRNA i proteinske ekspresije bubrega štakora tretiranih s karcinogenim dozama AA i identificirali disreguliranu ekspresiju 63 mikroRNA, uključujući najznačajnije povišene - miR-881, miR-880, miR-741, miR-511, miR-187, miR-449a i miR-34 obitelj te najznačajnije sniženu miR-383. Ostale značajno modulirane mikroRNA bile su miR-21 (povišena) i let-7e, miR-135a, miR-375 (snižena). Polovica ovih mikroRNA bila je povezana s karcinomom kada je učinjena IPA analiza. Analiza mRNA ekspresije identificirala je 6794 različito eksprimirane mRNA. Većina ovih gena također su bili povezani s tumorom, dok su najznačajniji putevi uključivali WNT/ β -aktin, disfunkciju mitohondrija i degradaciju valina. Integracijom svih podataka autori su zaključili da mikroRNA reguliraju svoje ciljne molekule i stišavanjem i aktivacijom, i na nivou transkripcije i translacije. MikroRNA su utjecale na gensku translaciju bez promjene u količini mRNA i obratno, a posttranskripcijska regulacija pretpostavljena je djelovanju mikroRNA i moguće još kakvim drugim faktorima (113).

1.9. TKIVNI *MICROARRAYI*

Istraživanja u području genomike poput analize genske ekspresije na genskim čipovima često trebaju validaciju, a jedna od validacijskih metoda koja se u tom slučaju koristi

jest imunohistokemijska analiza na parafinskim tkivnim rezovima. Imunohistokemijsko bojenje se može provesti ili na cijelom rezu tkiva uklopljenog u parafin, tzv. parafinskim kockama, što iziskuje dosta vremena i potrošnog materijala ili pak na tkivnim *microarrayima* (TMA). TMA je parafinska kocka s više različitih cilindara tkiva promjera 0,6-2 mm, poredanih u nekoliko redova jedan do drugoga po dužoj osi kocke, s ciljem istovremene histološke analize više uzoraka. Ovisno o veličini tkivnog cilindra, primateljska kocka može primiti i do 1000 uzoraka, a od TMA se može dobiti oko 150 rezova. Cilindri tkiva se uzimaju iz točno određenih područja donorskih parafinskih kocka. Nakon uzimanja cilindra tkiva iz donorske kocke, uzorak se prenosi na novu parafinsku kocku - primateljski TMA. Svi rezovi TMA imaju iste uzorke tkiva na istim koordinatnim pozicijama. Svaki pojedini rez TMA može se koristiti za različite analize, pritom uz manju potrošnju reagensa i vremena, a uz minimalnu štetu načinjenu originalnim kockama. S druge strane, svaki cilindar tkiva predstavlja samo dio cijele lezije, što čini upitnom podudarnost TMA i cijelog reza. Ovaj problem se nadilazi povećanjem broja cilindara istog uzorka tkiva i povećanjem broja tumora uključenih u analizu. Ukoliko se koriste cilindri debljine 1 mm potrebna su minimalno dva, dok se kod veličine cilindra 0,6 mm preporuča uzeti 3 cilindra istog tkiva. Studije pokazuju da se uzorci tkiva u triplicatu u gotovo 98% poklapaju s rezultatima cijelih rezova (114, 115).

Konstrukcija TMA provodi se u nekoliko koraka. Prije svega potrebno je dizajnirati TMA kartu (koristeći Microsoft excel tablice) koja sadrži točnu lokaciju svakog pojedinog uzorka, uključujući i duple uzorke i kontrole. Sljedeći korak je pronalaženje područja od interesa na donorskim kockama i označavanje tog područja kako bi se kasnije mogli uzeti cilindri tkiva. Ovo se obično radi na rezovima bojanim hemalaun-

eozinom koristeći svjetlosnu mikroskopiju. Primateljska TMA kocka je svježa prazna parafinska kocka. Uređaji, tzv *tissue arrayeri*, koji se koriste za formiranje praznih jezgara u primateljskoj TMA kocki i kojima se uzimaju cilindri tkiva iz donorskih kocki mogu biti manualni, poluautomatski i automatski. Svaki od ovih uređaja ima dvije igle kojima se uklanjaju cilindri parafina iz primateljske TMA kocke ne bi li se učinilo mjesta (engl. *core*) za uzorke tkiva iz donorske kocke, odnosno da bi se uzeo uzorak tkiva iz donorske kocke i prenio u prazni *core* primateljske kocke. Osim navedenog tkiva, TMA kocka mora sadržavati i kontrole kako bi se mogla učiniti kontrola kvalitete i odrediti heterogenost tumora. Mogu se koristiti tri tipa kontrolnog tkiva: tkivno specifične kontrole, biološke kontrole, kontrole po organskim sustavima koje uključuju nadbubrežnu žlijezdu, mozak, dojku, kolon, bubreg, jetru, pluća, gušteraču, placentu, prostatu, testis, žlijezdu slinovnicu, miometriju (glatki mišić). Posljednji tip kontrola je posebno koristan kada se istražuju novi markeri, tada jedno od ovih tkiva služi kao unutarnja kontrola. Jednom kad je TMA konstruiran koristi se standardno rezanje kocke mikrotomom. Na kraju, analiza TMA sastoji se od dva dijela: prva komponentna uključuje analizu preparata i snimanje/skeniranje preparata dok je druga komponenta analiza dobivenih podataka. Analiza preparata radi se ili manualno ili koristeći programe za analizu slika. Analiza podataka ima dva dijela - pročišćavanje podataka (isključuju se neinformativni slučajevi, dok se informativni uzorci iste donorske kocke konvertiraju u jedinstveni podatak, npr. srednju vrijednost (engl. *mean*)) i statističku obradu (vrsta testa ovisi o tipu podataka i stupnju varijance podataka, ali strategija koja se najčešće koristi jest podjela materijala bolesnika u skupine s visokim i niskim rizikom na temelju ekspresije novog biomarkera) (116).

1.10. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA

Imunohistokemijsko bojenje metoda je koja se koristi za lokalizaciju antigena (proteina) u rezovima tkiva koristeći označena protutijela koja reagiraju s ciljnim proteinima, dok se vizualizacija postiže koristeći markere poput enzima, fluorescentnih boja, radioaktivnih elemenata ili koloidnog zlata. Imunohistokemijska analiza omogućava potvrdu prisutnosti traženog antigena kao i točno mjesto u stanici/tkivu gdje se antigen nalazi. Ova metoda ima svoju ulogu u dijagnostici bolesti, razvoju lijekova i u biološkim istraživanjima.

Komercijalno dostupna protutijela koja se koriste u imunohistokemiji mogu biti poliklonalna (heterogena smjesa protutijela usmjerena na različite epitope istog antigena) i obično su kunićja ili pak monoklonalna (homogena populacija imunoglobulina usmjerenih na jedan jedini epitop), obično proizvedena u miševa i kunića, dok je ispitivano tkivo obično tkivo uklopljeno u parafin. Princip imunohistokemijske analize jest inkubacija rezova tkiva s protutijelima usmjerenim na antigen od interesa (tzv. primarna protutijela), zatim vezivanje protutijela na tkivne antigene i potom njihova vizualizacija. Cijeli postupak se odvija u nekoliko koraka:

1. prikupljanje uzoraka tkiva
2. fiksacija tkiva (najčešće formaldehid)
3. uklapanje tkiva u parafin/formacija TMA
4. rezanje parafinske kocke, nanošenje rezova na predmetna stakalca
5. demaskiranje antigena: uklanjanje parafina i otkrivanje antigena toplinom koristeći mikrovalnu pećnicu, lonac pod tlakom, parnu kupelj ili autoklav, uz otopinu za demaskiranje, primjerice citrati pufer s pH 6. Alternativa metodi s toplinom je

enzimatska degradacija korištenjem enzimatske aktivnosti pronaze, pepsina, ficina, tripsina ili proteinaze K.

6. blokiranje endogene aktivnosti: za bojenje temeljeno na biotinu, peroksidazi ili fosfatazi potrebno je blokirati endogene forme ovih proteina kako bi se prevenirao lažno pozitivni rezultat i snažna pozadinska detekcija

7. blokiranje nespecifičnih reaktivnih mjesta korištenjem albumina goveđeg seruma (BSA, bovine serum albumin), želatine, normalog seruma i nemasnog suhog mlijeka

8. imunodetekcija: direktnom ili indirektnom metodom. Obje metode koriste primarna protutijela specifična za ciljni tkivni antigen koja ili imaju konjugiranu oznaku (enzim, fluorokrom i sl.) u direktnoj metodi ili su neoznačena i kasnije detektirana s označenim reagensima, tj. sekundarnim protutijelima usmjerenim na primarno protutijelo (indirektna imunohistokemija). Enzimi (kromogena detekcija) koji se koriste kao oznake su peroksidaza iz hrena i alkalna fosfataza. Kako bi se vizualirala enzimskom komponentna enzim-protutijelo reagensa, a prije nego li će se evaluirati tkiva, nužno je provesti enzimatsku reakciju. Supstrati za ove reakcije obično su diaminobenzidintetraklorid (DAB) i BCIP/NBT (od engl. *bromo-chloro-indolyl phosphate* i *nitro blue tetrazolium chloride*). Kao rezultat dobiju se obojeni netopivi precipitati koje je moguće vidjeti pod mikroskopom. Ovaj korak nije potreban ukoliko se koriste oznake poput fluorokroma ili čestica zlata. Kod fluorescentne detekcije reporter koji je konjugiran za primarno ili sekundarno protutijelo je fluorofor koji se detektira fluorescentnom mikroskopijom.

Metoda s avidin-biotin kompleksom (ABC metoda) je jedna od najčešće korištenih tehnika imunohistokemijskog bojenja. Uključuje avidin, veliki glikoprotein koji se može označiti peroksidazom ili fluoresceinom i ima snažni afinitet za biotin. Biotin je

vitamin niske molekularne težine na koji se mogu vezati protutijela. Metoda uključuje 3 sloja - prvi sloj je neoznačeno primarno protutijelo, drugi sekundarno protutijelo označeno biotinom dok je treći sloj kompleks avidin-biotin peroksidaza. Dodatkom DAB reagensa dolazi do aktivacije peroksidaze i posljedične proizvodnje različitih kolorimetrijskih krajnjih produkata.

9. vizualizacija uzoraka - koristeći svjetlosnu ili fluorescentnu mikroskopiju ili pak digitalni scanner za pohranu i kasniju digitalnu mikroskopiju.

Rezultati imunohistokemijskog bojenja nemaju klasične kvantitativne mjere već su temeljeni na subjektivnoj interpretaciji osobe koja mikroskopira. Dvije su glavne metode analize i skoriranja rezultata imunohistokemije: automatska softverska metoda i ručna metoda. Još uvijek se preferira i češće koristi manualna metoda. Uključuje semikvantifikaciju intenziteta bojenja koristeći skalu od 0 (nema obojenja) do +3 (najjače obojenje) dok tzv. *H score* uzima u obzir i intenzitet bojenja, ali i postotak stanica s tim obojenjem. *H score* se izračunava sljedećom formulom:

$$H\ score = (\% \text{ intenziteta } 0) * 0 + (\% \text{ intenziteta } 1+) * 1 + (\% \text{ intenziteta } 2+) * 2 + (\% \text{ intenziteta } 3+) * 3.$$

2. HIPOTEZA

Karcinomi prijelaznog epitela gornjeg mokraćnog sustava uzrokovani aristolohičnom kiselinom u bolesnika iz endemskih područja karakterizirani su specifičnim obrascem genske i mikroRNA ekspresije.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Odrediti obilježja karcinoma prijelaznog epitela u bolesnika iz endemskih krajeva koji su bili izloženi aristolohičnoj kiselini.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti obrasce genske ekspresije specifične za karcinome prijelaznog epitela uzrokovane aristolohičnom kiselinom u sklopu endemske nefropatije, oblika nefropatije aristolohične kiseline, pomoću genskih čipova.
2. MikroRNA profiliranjem odrediti mehanizme posttranskripcijske regulacije genske ekspresije u navedenim karcinomima.

4. ISPITANICI I METODE

U istraživanje je inicijalno uključeno 15 uzastopnih bolesnika porijeklom iz endemskih krajeva Hrvatske i Bosne i Hercegovine, kojima je između lipnja 2009. i srpnja 2010. u Općoj bolnici "Dr Josip Benčević" u Slavonskom Brodu učinjen operativni zahvat nefroureterektomije ili ureterektomije zbog karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava. Dvoje bolesnika isključeno je iz daljnje analize nakon što im je postavljena definitivna dijagnoza karcinoma svijetlih stanica bubrega i karcinoma mokraćnog mjehura. Svi bolesnici bili su novodijagnosticirani, nitko nije imao povrat bolesti i nisu do tada bili liječeni kemoterapijom, radioterapijom ili operativno. Navedenih 13 bolesnika imalo je karcinome prijelaznog epitela bubrežnog pijelona, kaliksa ili uretera zbog čega je učinjena terapijska nefroureterektomija ili ureterektomija.

Svim bolesnicima prije operativnog zahvata učinjen je detaljni fizikalni pregled, uzeta je anamneza koja je uključivala i upitnik s pitanjima o mogućoj izloženosti biljci *Aristolochia clematitis* (vučja stopa). Bolesnicima je u svrhu ovog istraživanja prije operativnog zahvata izvađena krv za laboratorijske pretrage (kompletna krvna slika, serumski kreatinin), a većini bolesnika uzet je pojedinačni uzorak urina iz kojeg je određen kreatinin, alfa1mikroglobulin i albumin. Citologija urina koja je učinjena tijekom ranije dijagnostičke obrade također je uzeta u obzir. Svi bolesnici dali su svoj informirani pristanak za studiju, a istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva OB "Dr Josip Benčević" i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1. UPITNIK O MOGUĆOJ IZLOŽENOSTI *ARISTOLOCHIJI CLEMATITIS*

Provedeni upitnik uključivao je pitanja o ranijim poljoprivrednim običajima bolesnika (Jeste li imali polja?, Jeste li uzgajali pšenicu?), pitanja o eventualnom uočavanju *Aristolochie clematitidis* (Jeste li vidali *Aristolochiu clematitidis* na Vašim poljima?, Jeste li vidali sjemenke *Aristolochie clematitidis* među sjemenkama brašna?) i pitanja o unosu kruha (Jeste li kupovali ili pekli vlastiti kruh?, Koliko štruca kruha biste pojeli u tjedan dana?). Upitnik je bio potkrijepljen slikama biljke *Aristolochie clematitidis* i njezinih sjemenki.

4.2. LABORATORIJSKA OBRADA

Hemoglobin je određen koristeći optičku fluidnu citometrijsku metodu na elektroničkom brojaču ADVIA 2120 (Siemens, Njemačka), kreatinin na uređaju Olympus AU 2700 kontinuiranom fotometrijskom metodom s alkalnim pikratom, dok su alfa1mikroglobulin i albumin iz urina određeni lateks-imunonefelometrijski na uređaju Siemens Dade Behring BN II Nephelometer. Ove laboratorijske pretrage učinjene su u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Bubrežna funkcija procijenjena je koristeći modificiranu MDRD formulu za izračun glomerularne filtracije (117) : GFR u $ml/min/1.73 m^2 = 186.3 \times (kreatinin(s)^{-1.154}) \times (dob^{-0.203}) \times (0.742 \text{ kod žena})$. Na temelju procijenjene glomerularne filtracije određeni su stadiji kronične bubrežne bolesti prema KDOQI ("National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative") smjernicama (118). U vrijeme operativnog zahvata dvoje bolesnika bilo je u programu kronične hemodijalize.

4.3. CITOLOGIJA URINA

Citologija urina učinjena je iz tri uzastopna uzorka drugog jutarnjeg urina. Količina urina od 0,5-1ml centrifugirana je u citocentrifugi tijekom 5 minuta na 1000 okretaja u minuti. Uzorci su osušeni na sobnoj temperaturi za kasnije bojenje po metodi May-Grünwald-Giemsa ili su odmah fiksirani u 95% etanolu za kasnije bojenje po Papanicolau. Za svakog bolesnika analizirano je 6 stakalaca (2 stakalca za svaki od 3 uzorka urina), polovica je bojana po metodi May-Grünwald-Giemsa, a pola po Papanicolau. Mikroskopska analiza učinjena je pod povećanjem od 10, 40 i 100x.

4.4. UZORCI TKIVA

Za vrijeme operacije uzeti su uzorci tumora i bubrežnog korteksa te odmah smrznuti na -80°C, a korišteni su za kasniju analizu mutacija gena *TP53* (tumor) i određivanje AA-DNA-adukata (bubrežni korteks). Dodatni uzorci tkiva tumora i priležećeg zdravog urotelnog tkiva pohranjeni su u otopini RNA later (Qiagen, SAD) za kasnije genomske analize. Ostatak tkiva uključujući tumor, normalni urotel i bubrežni korteks pohranjen je za patohistološku analizu.

4.5. PATOHISTOLOŠKA ANALIZA

Uzorci za patohistološku analizu fiksirani su tijekom 24-72 sata u 10% puferiranom formalinu, procesuirani u automatskom tkivnom procesoru (histokinetu), uklopljeni u parafin i izrezani u rezove debljine 4-6 µm te potom bojani rutinskom hemalaun-eozin metodom. Dijagnozu su postavila dva nezavisna patologa. Osim tumora, analiziran je i bubrežni korteks s ciljem dijagnosticiranja endemske nefropatije koristeći

sljedeće kriterije: intersticijska fibroza s kortikomedularnim gradijentom, naglašena tubularna atrofija s očuvanim glomerulima, relativno malo upale.

4.6. IZDVAJANJE DNA

DNA je izdvojena iz uzoraka bubrežnog korteksa i tumorskog tkiva koristeći standardnu metodu fenolom i kloroformom (119). Izdvajanje DNA učinjeno je u Laboratoriju za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

4.7. ANALIZA ADUKATA AA-DNA

Razina adukata aristolaktama na DNA (10-20 mg) porijeklom iz bubrežnog korteksa određena je metodom obilježavanja s ^{32}P -ortofosfatom te detekcijom na poliakrilamidnoj gel elektroforezi (14). Sintetski oligonukleotidi s poznatom količinom dA-AL i dG-AL adukata korišteni su za identifikaciju položaja odgovarajućeg adukta na poliakrilamidnom gelu te za semikvantifikaciju. Analiza adukata DNA učinjena je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Sveučilišta Stony Brook, New York, SAD.

4.8. ANALIZA MUTACIJA GENA *TP53*

Analiza mutacija gena *TP53* iz izdvojene tumorske DNA učinjena je koristeći metodu AmpliChip p53 (Roche Molecular Diagnostics, SAD) koja detektira sve supstitucije i delecije pojedinačnih parova baza u egzonima 2 do 11 gena *TP53*. Navedena analiza mutacija *TP53* gena učinjena je Laboratoriju za kemijsku biologiju Sveučilišta Stony Brook, New York, SAD.

4.9. IZDVAJANJE RNA

Ukupna RNA izdvojena je iz uzoraka tumora i priležućeg normalnog urotelnog tkiva prethodno pohranjenih u otopini RNA later (Qiagen, SAD) na -80°C , koristeći miRNAeasy kit (Qiagen, SAD) slijedeći upute proizvođača. Svi uzroci tretirani su DNazom (RNase-free DNase set, Qiagen, SAD). Uzorci RNA alikvotirani su i pohranjeni na -80°C . Budući da je visokokvalitetna RNA apsolutni preduvjet za postizanje pouzdanih i reproducibilnih podataka dobivenih analizom na genskim čipovima i analizom mikroRNA, nad svim uzorcima provedena je ekstenzivna kontrola kvalitete. Koncentracija RNA mjerena je spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, SAD). Za daljnju analizu izabrani su uzorci RNA koncentracije $\geq 1,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ i čistoće $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$. Uređaj Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, SAD) korišten je za određivanje tzv. RIN-a (*RNA integrity number*). Razina raspadnute RNA određena je pomoću RNA 6000 Nano LabChip kita (Agilent Technologies, SAD). Uzorci s RINom 8-10 odabrani su za daljnje analize. Izolacija RNA učinjena je u Odjelu za funkcionalnu genomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb.

4.10. ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE POMOĆU GENSKIH ČIPOVA (DNA MICROARRAY)

Analiza genske ekspresije učinjena je uporabom DNA čipa za analizu cjelokupnog humanog genoma (Human Genome U133 PLUS 2.0 GeneChip, Affymetrix, SAD) koji sadrži 54675 25-nukleotidnih proba. RNA je obrađena koristeći standardni protokol proizvođača Affymetrix. Ukratko, 500 ng ukupne pročišćene RNA prepisano je u cRNA označenu biotinom pomoću 3'-IVT Express kita (Affymetri, SAD). Označena cRNA

hibridizirana je tijekom noći na genske čipove. Nakon hibridizacije čipovi su isprani, fluorescentno obilježeni i skenirani koristeći Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. U ovim eksperimentima korištene su uobičajene mjere kvalitete i normalizacije za Affymetrix GeneChip (3'/5' i tzv. *trimmed mean* normalizacija). Neobrađeni podaci unešeni su u Gene Spring GX 10 software (Agilent Technologies, USA) te je potom provedena normalizacija algoritmom RMA (*Robust Multichip Average*) specifičnim za Affymetrix. Različito eksprimirani geni određeni su pomoću nezavisnog T-testa ($p < 0,05$). Učinjena je korekcija za višestruko testiranje pomoću Benjamini-Hochberg stope za lažna otkrića (*false discovery rate, FDR*). U kombinaciji sa strogim statističkim parametrima granica omjera promjene (*fold change, FC*) postavljena je na 1,5x što odgovara promjeni u količini mRNA od bar 50%. Eksperimenti na genskim čipovima učinjeni su u Odjelu za funkcionalnu genomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb.



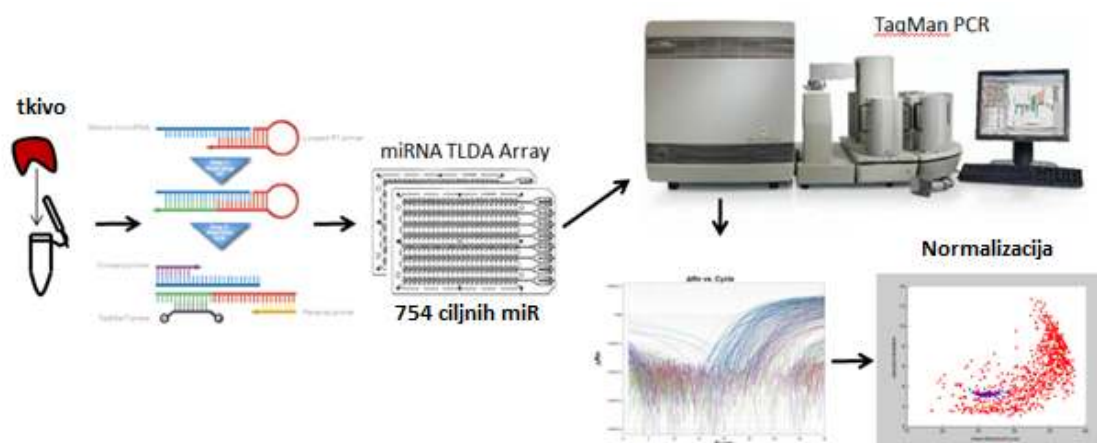
Slika 5. Affymetrixov genski DNA čip i Affymetrix radna stanica

4.11. PROFILIRANJE mikroRNA

Profiliranje mikroRNA učinjeno je umnažanjem ukupne RNA (500 ng) kvantitativnim PCR-om velikog kapaciteta (TaqMan Q-PCR) koristeći megaplex-komplet početnica reverzne transkripcije (Thermo Fisher Scientific Inc, SAD) za ~ 754 ljudskih

mikroRNA navedenih u mikroRNA bazi Sanger verzija 14, te ih se analiziralo korištenjem Applied Biosystems TaqMan Low Density Arrays (mikrofluid kartice s 384 mjesta i presintetiziranim setovima početnica TaqMan) na ABI 7900HT Sequence Detection System, uređaju Q-PCR visokog kapaciteta (Thermo Fisher Scientific Inc, SAD). Korišteni su TaqMan mikroRNA humani paneli sonde A v2.1 i B v3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc, SAD) koji sadrže kartice A i B u formatu s 384 bunarića. Kartica A sadrži 380 TaqMan mikroRNA sonde i omogućuje istovremenu kvantifikaciju 377 ljudske mikroRNA i 3 endogene kontrole; kartica B također sadrži 380 sonde za 377 humane mikroRNA i 3 endogene kontrole. Eksperiment je učinjen slijedeći upute proizvođača. Ukratko, ukupna RNA prvo je obrnuto prepisana s Megaplex RT setom (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) koristeći komplet za transkripciju TaqMan mikroRNA i početnice Megaplex RT (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD), tako da se početnica za reverznu transkripciju vezala za odgovarajuću mikroRNA i započela reverznu transkripciju. Smjesa za reverznu transkripciju uključivala je početnice Megaplex RT (10x), smjesu dNTP uključujući i dTTP (100 mM), reverznu transkriptazu MultiScribe (50 U/ μ l), pufer RT 10x, MgCl₂ (25 mM), inhibitor RNA-ze (20 U/ μ l), H₂O bez nukleaza. Sedam i pol μ l (4,5 μ l smjese za reakciju i 3 μ l ukupne RNA) reakcijske smjese inkubirano je na ledu 5 minuta nakon čega je uslijedio proces reverzne transkripcije: inkubacija na 16°C tijekom 2 minute, 42°C 1 minutu, 1 sekundu na 50°C (ukupno 40 ciklusa), inkubacija na 85 °C tijekom 5 minuta i na 4°C. Produkti reverzne transkripcije su zatim umnoženi na TaqMan MikroRNA Arrayu koristeći početnice specifičnog slijeda i sonde; korišten je uređaj Applied Biosystems 7900 HT Real-Time PCR. Šest μ l produkta reverzne transkripcije dodano je u 444 μ l vode bez nukleaza uz 450 μ l TaqMan Universal PCR Master Mixa, No AmpErase UNG, 2x;

potom je nanešeno na karticu TaqMan i spuštено na dno kartice centrifugiranjem. Kartica je inkubirana na 50 °C 2 minute, zatim na 95°C 10 minuta nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa od 15 sekundi na 95°C i 1 minutu na 60°C, i na kraju je zadržana na 72°C tijekom 10 minuta. Podaci su prikupljeni i obrađeni koristeći Gene Spring GX 10 software (Applied Biosystems, SAD). Za svaku mikroRNA razina ekspresije određena je koristeći C_t vrijednost putem sljedećeg izračuna: 2^{-C_t} , nakon čega je slijedila kvantilna normalizacija svih podataka. Nad normaliziranim podacima učinjen je nezavisni T-test (korigirani $p < 0,05$) i metoda Pavlidis "template matching" ($p < 0,01$). Učinjena je korekcija za višestruko testiranje pomoću Benjamini-Hochberg stope za lažna otkrića (*false discovery rate, FDR*). Granica omjera promjene (*fold change, FC*) postavljena je na 1,5x, u skladu s granicom promjene za mRNA. Analiza ekspresije mikroRNA učinjena je u Centru za genomsku tehnologiju na Sveučilištu New York, SAD.



Slika 6. Koraci u analizi ekspresije mikroRNA

4.12. BIOINFORMATIČKI PROGRAMI

Gene Spring GX10 softver (Agilent Technologies, SAD) korišten je za obradu i prikaz podataka. Za anotaciju gena i puteva korišteno je nazivlje "Gene Ontology" (120) i "KEGG pathways" (121). *Ingenuity pathway analysis* bazirana na predikcijama TargetScan služila je za predviđanje ciljnih molekula (IPA® , QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity), dok je miRconnX služio za analizu najvažnijih mikroRNA-mRNA veza (<http://mirconnx.csb.pitt.edu>). Analiza puteva učinjena je pomoću dva programa: DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (122, 123) i GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) koristeći skupine C2 i C5 (<http://www.broad.mit.edu/gsea>) (124). Analiza dobivenih rezultata učinjena je u suradnji s dr.sc.Jirijem Zavadilom iz Međunarodne agencije za istraživanje raka u Lyonu, Francuska.

4.13. TKIVNI *MICROARRAY*

U svrhu potvrde rezultata dobivenih metodama funkcionalne genomike učinjena je imunohistokemijska analiza tkivnih microarraya (TMA). Konstrukcija TMA učinjena je u nekoliko koraka. Formirane su mape TMA, zatim su konstruirane prazne primateljske parafinske kocke. Rezovi donorskih kocki obojani su hemalaun eozinom i pregledani pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se odredila područja od interesa (urotelni tumor i normalni urotel) koja su i obilježena na predmetnici kako bi se iz odgovarajućeg područja donorske kocke mogao uzeti uzorak za TMA. Donorske parafinske kocke optimizirane su za uzimanje materijala. Korišten je manualni uređaj *Beecher Instruments™ arrayer*, s promjerom igle 1 mm. Konstruirali smo dva TMA s po tri cilindra po uzorku normalnog tkiva i tri cilindra po uzorku tumorskog tkiva. Grupirali

smo uzorke istog tumora i podudarnog normalnog tkiva jedne do drugih po vodoravnoj osi (s lijeva na desno). U TMA su bili uključeni i kontrolni uzorci koje su sačinjavali cilindri tkiva kože, dojke, mišića, bubrega, štitnjače, limfnog čvora, dok se u gornjem lijevom kutu TMA nalazio orijentacijski cilindar. Nakon što je konstruirana primateljska kocka korišten je standardni protokol za pripremu za rezanje (125). Kocka TMA narezana je pomoću standardne tehnike mikrotomom, a rezovi su preneseni na predmetna stakalca.

TMA 1													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	1921/09 T	1921/09 T	1921/09 T	1921/09 N	1921/09 N	1921/09 N	Skin	2036/09 T	2036/09 T	2036/09 T	2036/09 N	2036/09 N	2036/09 N
B	2434/09 N	2434/09 N	2434/09 N	2434/09 T	2434/09 T	2434/09 T	Breast	2844/09 T	2844/09 T	2844/09 T	4089/09 N	4089/09 N	4089/09 N
C	4089/09 T	4089/09 T	4089/09 T	4306/09 N	4306/09 N	4306/09 N	Muscle	4306/09 T	4306/09 T	4306/09 T	4662/09 N	4662/09 N	4662/09 N
D	4662/09 T	4662/09 T	4662/09 T	5289/09 T	5289/09 T	5289/09 T	Kidney	5289/09 N	5289/09 N	5289/09 N	5662/09 T	5662/09 T	5662/09 T
E	5662/09 N	5662/09 N	5662/09 N	5663/09 N	5663/09 N	5663/09 N	Thyroid	5663/09 T	5663/09 T	5663/09 T	5968/09 N	5968/09 N	5968/09 N
F	5968/09 T	5968/09 T	5968/09 T	163/10 T	163/10 T	163/10 T	Lymphnode	163/10 N	163/10 N	163/10 N	2704/10 T	2704/10 T	2704/10 T
G	2704/10 N	2704/10 N	2704/10 N	2820/10 T	2820/10 T	2820/10 T	Skin	3367/10 N	3367/10 N	3367/10 N	3367/10 T	3367/10 T	3367/10 T
H	2434/09 3B	2434/09 3B	2434/09 3B	2434/09 3B	4662/09 1	4662/09 1							
	Bladder				Urothelium								
TMA 2													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	S11-13559 T	S11-13559 T	S11-13559 T	S11-15725 T	S11-15725 T	S11-15725 T	Skin	S11-15725 N	S11-15725 N	S11-15725 N	S11-16459 T	S11-16459 T	S11-16459 T
B	S11-16459 N	S11-16459 N	S11-16459 N	S11-16868 T	S11-16868 T	S11-16868 T	Breast	S11-17209 T	S11-17209 T	S11-17209 T	S11-17209 N	S11-17209 N	S11-17209 N
C	S11-24531 T	S11-24531 T	S11-24531 T	S11-24582 T	S11-24582 T	S11-24582 T	Muscle	S11-24582 N	S11-24582 N	S11-24582 N	S11-25756 T	S11-25756 T	S11-25756 T
D	S11-25756 N	S11-25756 N	S11-25756 N	S11-26043 T	S11-26043 T	S11-26043 T	Kidney	S11-26045 T	S11-26045 T	S11-26045 T	S11-28733 T	S11-28733 T	S11-28733 T
E	S11-28733 N	S11-28733 N	S11-28733 N	S11-36927 T	S11-36927 T	S11-36927 T	Thyroid	S11-37212 T	S11-37212 T	S11-37212 T	434-07 T	434-07 T	434-07 T
F	1423-08 T	1423-08 T	1423-08 T	1423-08 N	1423-08 N	1423-08 N	Lymphnode	5199-08 T	5199-08 T	5199-08 T	70-09 T	70-09 T	70-09 T



Slika 7. TMA mape (gore), tkivni manualni arrayer (dolje lijevo), TMA kocka (dolje desno)

4.14. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE

Imunohistokemijsko bojenje učinjeno je na rezovima TMA koristeći protutijela navedena u tablici 6:

Tablica 6. Popis i karakteristike protutijela korištenih u imunohistokemijskoj analizi

PROTUTIJELO	KLON	TIP	PROIZVOĐAČ	RAZRJEĐENJE
vimentin	EPR868(2)	kunićje monoklonalno	Epitomics	1:2000
aktin	C-4	mišje monoklonalno	MP Biomedicals	1:2000
Ki67	MM1	mišje monoklonalno	Novocastra	1:50
p53	1C12	mišje monoklonalno	Cell Signaling Technology	1:10000
p21	Ab-1	mišje monoklonalno	Calbiochem	1:1000
MSH2	Ab2	mišje monoklonalno	Calbiochem	1:500
IDH1	H09	mišje monoklonalno	Dianova	1:500
PCNA	PC10	mišje monoklonalno	Dako	1:1000
3meH3K27	K27	mišje monoklonalno	Abcam	1:2000
EZH2	AC22	mišje monoklonalno	Cell Signaling Technology	1:2000
SMAD3	nedostupno	kunićje poliklonalno	Abcam	1:2000
pSMAD3 (phospho S208)	nedostupno	kunićje poliklonalno	Abcam	1:2000
S100A4	nedostupno	kunićje poliklonalno	Dako	1:2000
TWIST	2C1a	mišje monoklonalno	Abcam	1:500
PTEN	A2B1	mišje monoklonalno	Santa Cruz	1:4000
GSK3-beta	nedostupno	kunićje poliklonalno	Cell Signalling	1:1000
phospho-GSK3B	Ser9	kunićje poliklonalno	Cell Signalling	1:750
ciklin D1	SP4	mišje monoklonalno	Neomarkers	prethodno razrijeđeno
E-cadherin	NCH-38	mišje monoklonalno	Dako	1:200
Brg1	N-15	kozje poliklonalno	Santa Cruz	1:2000
PAI	H135	kunićje poliklonalno	Santa Cruz	1:1000
BRCA1	D-9	mišje monoklonalno	Santa Cruz	1:1000
CDC25A	F-6	mišje monoklonalno	Santa Cruz	1:1000
nibrin	Ab-1	kunićje poliklonalno	Oncogene	1:1000
ATM	233	kunićje poliklonalno	Serotech	1:500

Postupak je učinjen na sljedeći način: TMA su narezani koristeći mikrotom; potom su rezovi deparafinizirani i rehidrirani. U svrhu demaskiranja antigena, stakalca su

zagrijana u otopini Trilogy (Cell Marque, SAD) ili citratnom puferu, pH 6 (Vector, SAD) u loncu pod pritiskom (95°C) ili mikrovalnoj pećnici tijekom 10 minuta i potom hlađeni na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Preparati su fiksirani, a endogena peroksidaza blokirana je pomoću 3% H₂O₂ u metanolu tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi stakalca su uronjena u PBS (od engl. *Phosphate Buffered Saline*) u sklopu pripreme za imunohistokemijsku analizu. Preparati su obrađeni na sljedeći način: učinjena je inkubacija primarnih protutijela tijekom noći na +4°C, potom inkubacija sa sekundarnim protutijelom anti-Ig (Elite kit, Vector, SAD) tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi. Uslijedila je vizualizacija koristeći 3,3'-diaminobenzidin otopinu (DAB) tijekom 15 minuta. Kontrastno bojanje učinjeno je hematoksilinom, a preparati su potom dehidrirani, uklopljeni u medij za uklapanje (Pertex; Microm Microtech France) i prekriveni pokrovnicom. Obojenje je ispitano pod svjetlosnim mikroskopom, skenirano i pohranjeno za digitalnu vizualizaciju koristeći Leica SCN400 Scanner (Leica Biosystems, Njemačka). Kvantifikacija rezultata vršila se ručno koristeći razinu intenziteta od 0 do 3 i postotak obojenih stanica na velikom povećanju. Ukupni rezultat dobiven je umnoškom jačine intenziteta i postotka obojenih stanica u vidnom polju na velikom povećanju, na sva 3 biološka replikata. U obzir je uzeta srednja vijednost. Neparometrijski test Mann Whitney u sklopu statističkog programa GraphPad Prism verzija 6.00 za Windowse (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) korišten je za testiranje značajnosti razlike između tumorskog i normalnog tkiva. Vizualizacija rezultata u obliku grafova također je učinjena u navedenom statističkom programu.

Konstrukcija TMA i imunohistokemijsko bojanje učinjeno je u Agenciji za istraživanje raka u Lyonu u Francuskoj.

5. REZULTATI

5.1. KARAKTERISTIKE BOLESNIKA

U istraživanje je uključeno 15 bolesnika operiranih u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević" u Slavanskom Brodu tijekom 2008.-2010. godine. Trinaestorici bolesnika učinjena je nefroureterektomija, jednoj bolesnici učinjena je samo ureterektomija, dok je dvama bolesnicima učinjen zahvat nefroureterektomije i cistektomije.

Četrnaest bolesnika imalo je tumore gornjeg dijela mokraćnog sustava, dok je jedan bolesnik (#14) imao jednostranu hidronefrozu, afunkcionalni bubreg i sumnju na istovremeni tumor gornjeg urotrakta i mokraćnog mjehura, međutim patohistološki tumor je nađen samo u mokraćnom mjehuru, tako da uzorci gornjeg dijela mokraćnog sustava ovog bolesnika nisu uključeni u analizu molekulskog profiliranja. Od navedenih 14 bolesnika s tumorima gornjeg dijela mokraćnog sustava, 13 osoba imalo je karcinom prijelaznog epitela pijelona i/ili uretera, dok je jednom bolesniku postavljena dijagnoza karcinoma bubrega svijetlih stanica. Uzorci ovog bolesnika također nisu uključeni u daljnje analize.

Jednoj bolesnici učinjena je ureterektomija, dok je sam bubreg pošteđen. Zbog navedenog kod ove bolesnica nije rađena analiza adukata DNA iz bubrežnog korteksa.

Zaključno, u analizu genske ekspresije i profiliranje mikroRNA uključeni su uzorci karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava od 13 bolesnika.

Od 13 uključenih bolesnika 3 su bili muškog, a 10 ženskog spola. Medijan dobi za cijelu skupinu u vrijeme zahvata bio je 75 (raspon: 59-85). Osmam bolesnika bilo je porijeklom iz Bosne i Hercegovine, od kojih je 6 dolazilo iz poznatih endemskih

sela, a 2 iz sela u blizini endemskog područja. Petero bolesnika bilo je porijeklom iz Hrvatske, 3 iz znanih endemskih sela, a 2 iz mjesta u blizini endemskog područja.

U vrijeme zahvata nekolicina bolesnika imala je multiple tumore mokraćnog sustava, dok su ostali imali solitarne neoplazme, što je prikazano u tablici 7.

Tablica 7. Lokalizacija svih tumora mokraćnog sustava u uključenih bolesnika

Lokalizacija tumora	N
Pijelon/kaliksi	4
Ureter	4
Pijelon i ureter	4
Pijelon, ureter i mokraćni mjehur	1

U analizu je uključen samo jedan uzorak tumora po bolesniku što je prikazano u tablici 8.

Tablica 8. Porijeklo uzoraka korištenih u analizi molekuskog profiliranja

Porijeklo analiziranog uzorka tumora	N
Pijelon/kaliksi	7
Ureter	6

Gradus tumora određen je po klasifikacijama Svjetske zdravstvene organizacije iz 1973. i 2004. godine.

Tablica 9. Gradus tumora

Gradus tumora	N	%
G1	2	15%
G2	4	30%
G3	7	65%
LG	2	15%
HG	11	85%

Stadij tumora određen je pomoću TNM klasifikacije. Podatak o limfnim čvorovima bio je dostupan za nekolicinu bolesnika, dok točan podatak o udaljenim metastazama nije bio dostupan u trenutku zahvata.

Tablica 10. Stadij tumora

Stadij tumora	N	%
Ta	2	15%
T1	2	15%
T2	3	23%
T3	5	39%
T4	1	8%
N2	1	8%
Nx	12	92%
Mx	13	100%

Glomerularna filtracija procijenjena je na temelju vrijednosti serumskog kreatinina te su određeni stupnjevi kronične bubrežne bolesti kao što je prikazano u tablici 11. Jedan je bolesnik već od ranije bio u programu kronične hemodijalize.

Tablica 11. Stadij kronične bubrežne bolesti

Stadij kronične bubrežne bolesti	N	%
2	2	15%
3	5	39%
4	4	31%
5	2	15%

Jednokratni uzorak "spot" urina bio je dostupan za 6 bolesnika, od kojih je 3 imalo α -1MCR > 15 mg/g. Ostatak bolesnika već je bio u uznapredovaloj fazi bubrežne bolesti i/ili bez rezidualne diureze ili je imalo pogoršanje bubrežne funkcije nakon zahvata, stoga nije bilo moguće niti je bilo od koristi određivati alfa1-mikroglobulin.

Od 13 bolesnika 8 je bilo anemično (mikrocitna do normocitna anemija). Medijan i raspon najmanje i najviše vrijednosti hemoglobina, hematokrita, prosječni volumen eritrocita (MCV) za cijelu skupinu bili su: 113 (74-126) g/l; 0,34 (0,226-0,413) l/l; 87,2 (59,8-91,1) fl.

Citologija urina bila je pozitivna u 3 bolesnika, a svi pacijenti učinili su bateriju dijagnostičkih pretraga koje su uključivale ultrazvuk abdomena, MSCT abdomena i zdjelice, IV urografiju i cistoskopiju u sklopu dijagnostičke odbrane.

5.2. IZLOŽENOST ARISTOLOHIČNOJ KISELINI TEMELJENA NA KLINIČKOM UPITNIKU

Svih 13 bolesnika imalo je u prošlosti poljoprivredne površine, i svi osim jednog bolesnika uzgajali su žito. Nitko nije kupovao kruh u to vrijeme, već su svi pekli vlastiti domaći kruh i konzumirali otprilike 2,5 štruce kruha tjedno (medijan 2,5; raspon: 0,5-7). Deset bolesnika vidalo je biljku *Aristolochia clematitis* na svojim poljima, dok ju 3 nije vidjelo na svojim poljima. Osam bolesnika pronalazilo je sjemenke *Aristolochije clematitis* među sjemenkama žita, dok 5 nije vidalo ove sjemenke (tablica 12).

Tablica 12. Opažanje biljke ili sjemenki biljke *Aristolochia clematitis*

Opažanje <i>A. clematitis</i>	Uočavanje biljke <i>A.clematitis</i> na poljima (N)	Uočavanje sjemenki <i>A.clematitis</i> među sjemenkama žita (N)
Uvijek	4	2
Povremeno	6	6
Nikad	3	5

Danas svi bolesnici kupuju kruh, nitko ne peče vlastiti kruh, većina bolesnika i dalje ima poljoprivredne površine (9 bolesnika), 7 od njih još uvijek uzgaja žito, a 4 još uvijek vidi biljku *Aristolochia clematidis* na svojim poljima, dok 2 još uvijek povremeno vidi sjemenke ove biljke među sjemenkama žita.

Jedanaest bolesnika potvrdilo je korištenje biljnih pripravaka za vrijeme prehlade (uvijek - 1 bolesnik, povremeno-10 bolesnika). Tri bolesnika bivši su pušači s 12 kutija cigareta na godinu (raspon 5-57), a u vrijeme postavljanja dijagnoze i operativnog zahvata nitko više nije pušio.

5.3. AA-DNA ADUKTI

Analiza adukata učinjena je na uzorcima DNA porijeklom iz korteksa 12 bolesnika. Jedan uzorak nije bio dostupan budući da u te bolesnice nije bilo potrebe za nefroureterektomijom već samo ureterektomijom. Sedam bolesnika imalo je pozitivne AL-I-dA-DNA adukate, s rasponom vrijednosti 0,27-2,86 adukata na 10^8 nukleotida. Ostalih 5 bolesnika imalo je razinu adukata ispod nivoa detekcije ove metode.

5.4. MUTACIJE GENA *TP53*

Tri bolesnika imala su tzv. potpisnu mutaciju aristolohične kiseline A-T transverziju u genu *TP53*. U 2 bolesnika transverzija je bila prisutna na mjestima izrezivanja (*splicing site*), dok je u jednoga bolesnika adenin zamijenjen timinom na poziciji 139.

Tablica 13. Izloženost AA na temelju rezultata upitnika, pozitivnih DNA adukata i potpisne AA mutacije u genu *TP53*

IDENTIFIKACIJSKI BROJ BOLESNIKA	UOČAVANJE BILJKE/SJEMENKI BILJKE A.CLEMATITIS	AA-DNA ADUKTI	MUTACIJA GENA <i>TP53</i>
3	+	+	A-->T
4	+	+	divlji tip
6	+	ispod razine detekcije	divlji tip
7	+	+	divlji tip
13	+	+	divlji tip
15	NE	+	A-->T
18	+	+	A-->T
20	+	+	divlji tip
21	NE	ispod razine detekcije	divlji tip
22	+	ispod razine detekcije	divlji tip
25	NE	ispod razine detekcije	divlji tip
26	+	nije učinjeno	divlji tip
27	+	ispod razine detekcije	divlji tip

Sedam bolesnika zadovoljavalo je prihvaćene kriterije izloženosti aristolohičnoj kiselini, tj imalo je ili pozitivne AA-DNA adukate i/ili potpisnu mutaciju u genu *TP53*.

5.5. HISTOLOGIJA BUBREGA

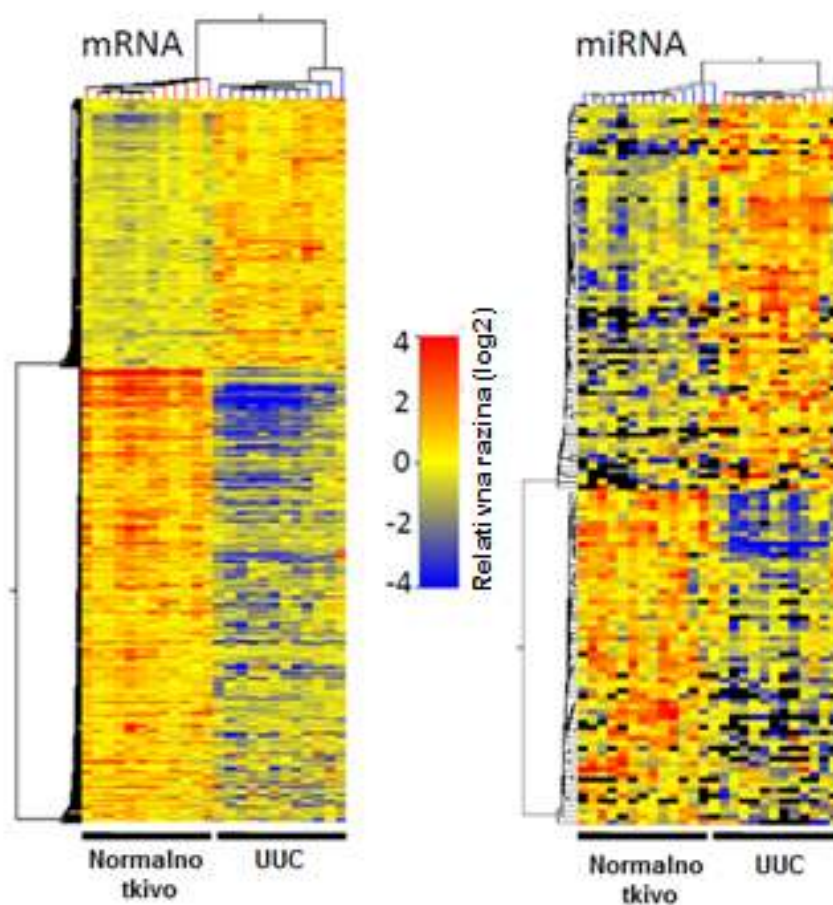
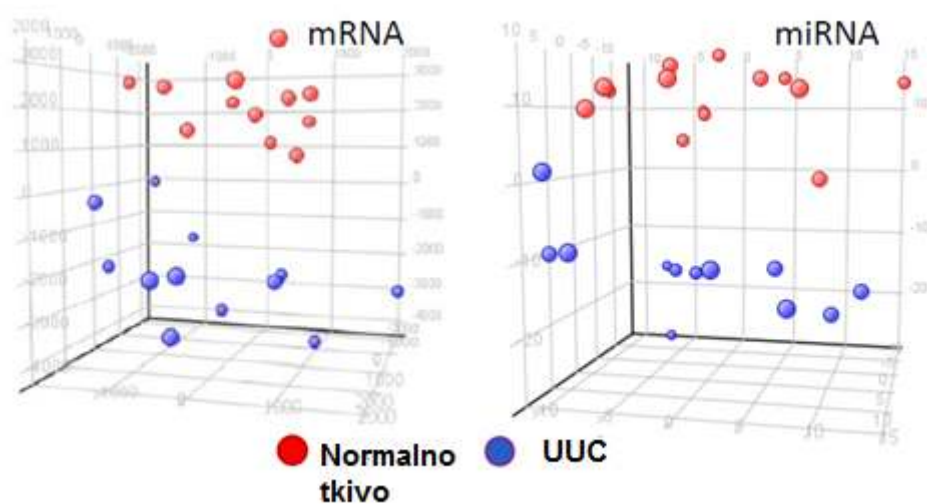
Za histološku analizu dostupno je bilo tkivo bubrega 12 bolesnika. Svi uzorci pokazivali su znakove kroničnog oštećenja, i to ili uslijed opstrukcije tumorom ili vaskularne bolesti; niti u jednom uzorku nije se sa sigurnošću našlo znakova EN.

5.6. PRAĆENJE BOLESNIKA

Od 13 bolesnika uključenih u istraživanje 2 bolesnika je preminulo nedugo nakon zahvata uslijed postoperativnih komplikacija. Tijekom 5-godišnjeg praćenja dvoje bolesnika razvilo je novi tumor, karcinom prostate; 3 bolesnika imala su relaps urotelnog karcinoma, a 2 osobe razvile su udaljene metastaze (jetra, intraabdominalni limfni čvorovi, kosti, mozak). Pacijent s presadnicama u jetri i limfnim čvorovima abdomena imao je i adenokarcinom prostate. Do prosinca 2014. od 13 bolesnika uključenih u studiju 4 je bilo živo, bez znakova povrata bolesti, od kojih je jedna osoba započela program kronične hemodijalize, a jedan bolesnik razvio karcinom prostate.

5.7. PROFILIRANJE mRNA I miRNA

Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis*) svih uzoraka, kao i strogo statističko filtriranje nakon čega je uslijedilo hijerarhijsko grupiranje (engl. *unsupervised hierarchical clustering*) mRNA i miRNA podataka odijelilo je uzorke tumorskog tkiva i uparenog nezahvaćenog priležećeg urotelnog tkiva u evidentno različite skupine (Slika 8.)



Slika 8. Rezultati analize glavnih komponenti (gore) i toplinske mape (engl. *heatmap*) za mRNA i mikroRNA normalog i tumorskog tkiva.

Korištenjem T testa za razlike u ekspresiji mRNA između normalnog i tumorskog tkiva uz p vrijednost $< 0,05$, $FC \geq 1,5x$, a nakon korekcije za multiplo testiranje po Benjamini-Hochbergu, identificirali smo 5438 mRNA transkripata koji su bili značajno dismodulirani u UUC, od kojih je 2021 mRNA bila povišena, a 3417 sniženo u UUC.

Također, korištenjem T testa uz $p < 0,05$, $FC \geq 1,5x$ i nakon korekcije po Benjamini-Hochbergu identificirano je 138 značajno dismoduliranih mikroRNA u tumorskom u odnosu na normalno tkivo, od kojih je 74 bilo povišeno, a 64 sniženo u tumorskom tkivu. Ovi brojevi predstavljaju ~10% i 19% svih analiziranih molekula mRNA i mikroRNA.

Tablica 14. Prikaz značajno promijenjenih mRNA i miRNA u UUC

	Ukupno analizirano	Značajno promijenjeno	Povišeno u UUC	Sniženo u UUC
mRNA	54000	5438 (10%)	2021 (4%)	3417 (6%)
mikroRNA	742	138 (19%)	74 (10%)	64 (9%)

Tablica 15. Popis značajno promijenjenih mikroRNA u UUC u odnosu na normalno priležeće tkivo ($p < 0,05$): gornja tablica-povišene miRNA, donja tablica-snižene miRNA

miRNA	FC	REGULACIJA
hsa-miR-203	15,51457896	povišeno
hsa-miR-429	12,5524195	povišeno
hsa-miR-135b	11,50019151	povišeno
hsa-miR-183	11,47808623	povišeno
hsa-miR-9	11,055236	povišeno
hsa-miR-182	8,324977779	povišeno
hsa-miR-106b	8,24239842	povišeno
hsa-miR-618	7,858495585	povišeno
hsa-miR-1269	7,433354279	povišeno
hsa-miR-210	7,366780075	povišeno
hsa-miR-200b	7,072939362	povišeno
hsa-miR-141	6,93664325	povišeno
hsa-miR-98	6,314342938	povišeno
hsa-miR-301a	6,239343737	povišeno
hsa-miR-148b	5,750673913	povišeno
hsa-miR-20a	5,536870909	povišeno
hsa-miR-183-3p	5,486026926	povišeno
hsa-miR-944	5,437725575	povišeno
hsa-miR-301b	5,378220242	povišeno
hsa-miR-93	5,281246743	povišeno
hsa-miR-19a	4,895473527	povišeno
hsa-miR-205	4,752749941	povišeno
hsa-miR-200a	4,638097945	povišeno
hsa-miR-296-5p	4,595220982	povišeno
hsa-miR-598	4,514345113	povišeno
hsa-miR-18a	4,48801841	povišeno
hsa-miR-582-5p	4,452184078	povišeno
hsa-miR-19b	4,435586319	povišeno
hsa-miR-21	4,138755131	povišeno
hsa-miR-15b	4,019636836	povišeno
hsa-miR-340	3,843426303	povišeno
hsa-miR-26b	3,836615337	povišeno

hsa-miR-224	3,772820052	povišeno
hsa-miR-1290	3,637724489	povišeno
hsa-miR-20b	3,453869789	povišeno
hsa-miR-1244	3,290977141	povišeno
hsa-miR-192	3,278239416	povišeno
hsa-miR-425	3,274677341	povišeno
hsa-miR-106b-3p	3,212776343	povišeno
hsa-miR-642	3,082954983	povišeno
hsa-miR-25	3,078035256	povišeno
hsa-miR-138	2,908193139	povišeno
hsa-let-7f	2,906904766	povišeno
hsa-miR-106a	2,895601373	povišeno
hsa-let-7a	2,888926281	povišeno
hsa-miR-101	2,859146233	povišeno
hsa-miR-107	2,705667868	povišeno
hsa-miR-769-5p	2,686932641	povišeno
hsa-miR-221	2,676441807	povišeno
hsa-miR-148a	2,674598903	povišeno
hsa-let-7g	2,669505249	povišeno
hsa-miR-200a-3p	2,646700422	povišeno
hsa-miR-200c	2,592978201	povišeno
hsa-miR-422a	2,571301893	povišeno
hsa-miR-17	2,5287757	povišeno
hsa-let-7e	2,498613682	povišeno
hsa-miR-103	2,403418306	povišeno
hsa-miR-374a	2,379851037	povišeno
hsa-miR-15a	2,346617737	povišeno
hsa-miR-362-5p	2,265097868	povišeno
hsa-miR-590-5p	2,258630784	povišeno
RNU44	2,201563055	povišeno
hsa-miR-185	2,150305822	povišeno
hsa-miR-32	2,102909527	povišeno
hsa-miR-181a	1,989999979	povišeno
hsa-miR-27a	1,984178872	povišeno
hsa-miR-15a-3p	1,974223436	povišeno
hsa-miR-494	1,930428878	povišeno
hsa-miR-194	1,853541955	povišeno
hsa-miR-92a	1,850287107	povišeno

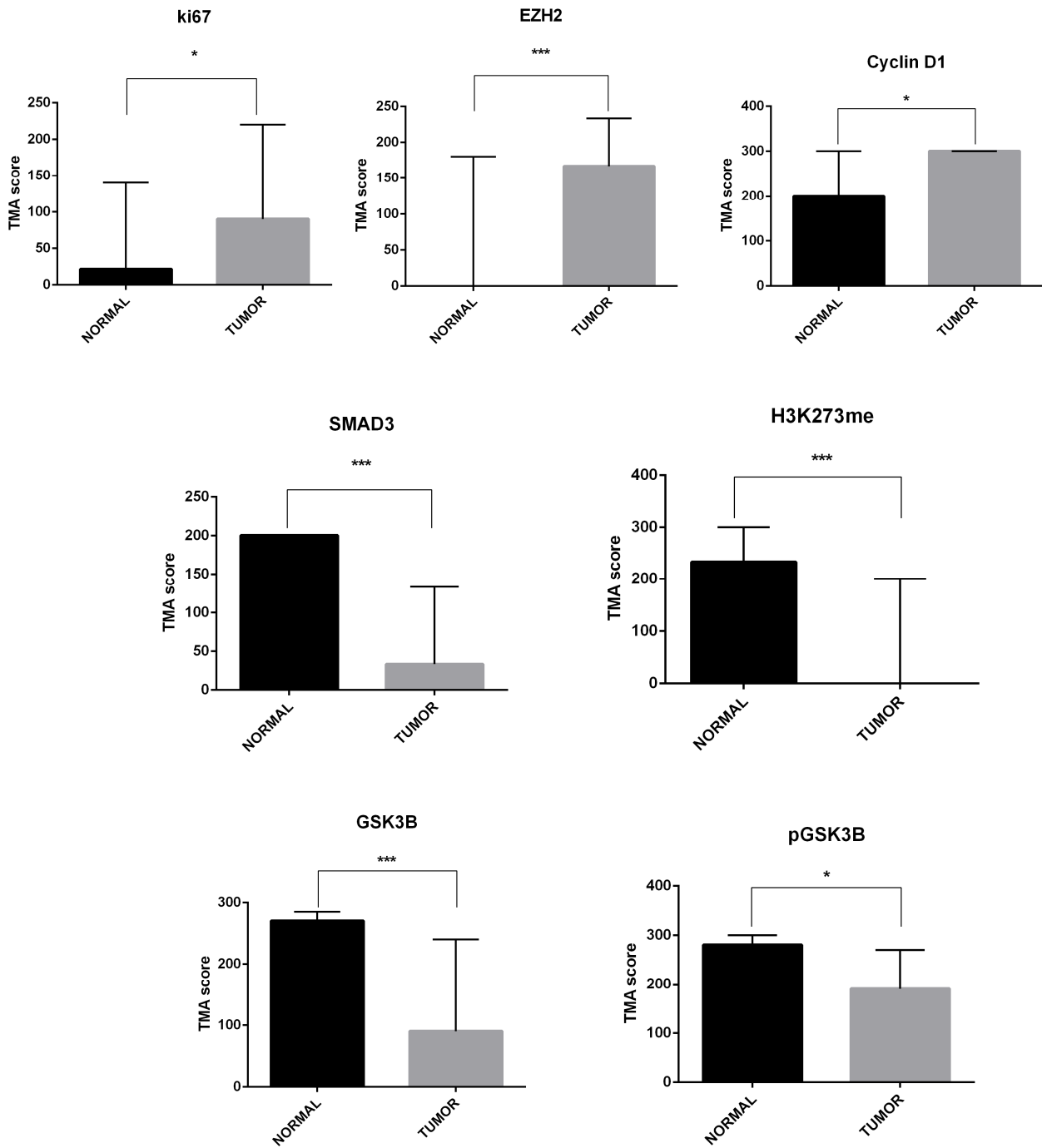
hsa-let-7d	1,848336248	povišeno
hsa-miR-636	1,842382588	povišeno
hsa-miR-374b	1,83227492	povišeno
hsa-miR-30b	1,820636808	povišeno

miRNA	FC	REGULACIJA
hsa-miR-532-3p	-1,65280618	sniženo
hsa-miR-126	-1,69161525	sniženo
hsa-miR-132	-1,83169128	sniženo
hsa-miR-340-3p	-1,84127101	sniženo
hsa-miR-28-3p	-1,89191717	sniženo
hsa-miR-323-3p	-1,8967251	sniženo
hsa-miR-186	-1,92365512	sniženo
hsa-miR-489	-2,12785282	sniženo
hsa-miR-193b	-2,13318797	sniženo
hsa-miR-342-3p	-2,22484581	sniženo
hsa-miR-628-5p	-2,31777552	sniženo
hsa-miR-136-3p	-2,32879772	sniženo
hsa-miR-339-3p	-2,40763868	sniženo
hsa-miR-127-3p	-2,47771251	sniženo
hsa-miR-487b	-2,48300785	sniženo
hsa-miR-212	-2,50759673	sniženo
hsa-miR-493	-2,5366165	sniženo
hsa-miR-145-3p	-2,61145268	sniženo
hsa-miR-485-3p	-2,61628559	sniženo
hsa-miR-199a-5p	-2,72885986	sniženo
hsa-miR-140-3p	-2,73674784	sniženo
hsa-miR-23b	-2,73733299	sniženo
hsa-miR-628-3p	-2,76196215	sniženo
hsa-miR-199a-3p	-2,80684652	sniženo
hsa-miR-539	-2,81081914	sniženo
hsa-miR-589	-2,8773295	sniženo
hsa-miR-30e-3p	-2,90083164	sniženo
hsa-miR-146b-5p	-2,95981059	sniženo
hsa-miR-218	-2,98774546	sniženo
hsa-miR-376a	-2,98894799	sniženo
hsa-miR-299-5p	-3,00948336	sniženo

hsa-miR-193b-3p	-3,01358018	sniženo
hsa-miR-886-5p	-3,02096206	sniženo
hsa-miR-99b-3p	-3,14335672	sniženo
hsa-miR-433-4373205	-3,18479706	sniženo
hsa-miR-770-5p	-3,29647681	sniženo
hsa-miR-152	-3,36236921	sniženo
hsa-miR-411	-3,40353409	sniženo
hsa-miR-376c	-3,55458945	sniženo
hsa-miR-370	-3,98688675	sniženo
hsa-miR-214-3p	-4,02835856	sniženo
hsa-miR-10b-3p	-4,05910232	sniženo
hsa-miR-150	-4,33520204	sniženo
hsa-miR-1	-4,69035478	sniženo
hsa-miR-574-3p	-4,94124416	sniženo
hsa-miR-486-5p	-5,16985815	sniženo
hsa-miR-766	-5,17715861	sniženo
hsa-miR-30a-3p	-6,91790453	sniženo
hsa-miR-143	-6,95327307	sniženo
hsa-miR-139-5p	-7,13864718	sniženo
hsa-miR-100	-7,87669457	sniženo
hsa-miR-134	-8,39495073	sniženo
hsa-miR-99a	-9,17426016	sniženo
hsa-miR-432	-10,6649645	sniženo
hsa-miR-1247	-10,8349895	sniženo
hsa-miR-125b	-11,2276025	sniženo
hsa-miR-214	-11,9811892	sniženo
hsa-miR-409-3p	-12,4710002	sniženo
hsa-let-7c	-12,8578669	sniženo
hsa-miR-133b	-14,0392977	sniženo
hsa-miR-204	-15,4136008	sniženo
hsa-miR-99a-3p	-17,1873199	sniženo
hsa-miR-145	-20,5291971	sniženo
hsa-miR-133a	-73,6198884	sniženo

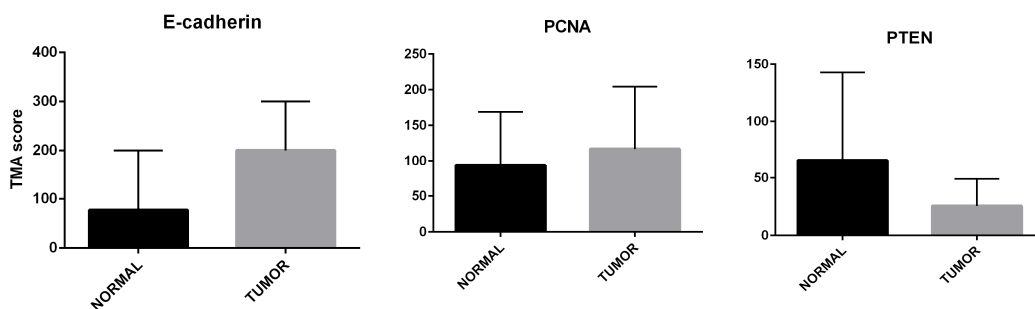
5.8. REZULTATI IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJENJA

Dvadeset pet različitih protutijela izabrano je za imunohistokemijsko bojenje. Tri protutijela od početka nisu adekvatno funkcionirala na testnim uzrocima (Brg1, PAI, CDC25A) pa nisu dalje korišteni. Budući je TMA kocka manualno konstruirana, nekoliko cilindara nije bilo idealno, posljedično čemu bojenje nije bilo mjerodavno, tako da u slučajevima proteina p53, PCNA, PTEN i ATM za izračun H scora nisu korištena sva tri replikata pojedinog uzorka nego dva iz kojih je izračunata srednja vrijednost. Značajne razlike u ekspresiji proteina između tumorskog i zdravog tkiva uočene su za proteine: Ki67, H3K273me, EZH2, SMAD3, GSK3B, pGSK3B, ciklin D. Rezultati su bili u skladu s rezultatima dobivenim genskom ekspresijom osim za protein GSK3B koji je bio snižen u tumorskom tkivu dok je gen GSK3B bio povišen u UUC. Za E-kadherin nije se našlo značajne razlike između tumorskog i zdravog tkiva, kao i za PCNA, no za oba proteina uočen je trend viših vrijednosti u tumoru u odnosu na zdravo tkivo. Trend sniženja razine proteina u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo uočen je za PTEN protein.



Slika 9. Prikaz značajno moduliranih proteina u UUC u odnosu na normalno tkivo.

Vrijednosti su prikazane kao medijan i raspon minimuma i maksimuma.



Slika 10. Prikaz E-kadherin, PCNA i PTEN proteina u UUC u odnosu na normalno tkivo. Vrijednosti su prikazane kao medijan i raspon minimuma i maksimuma.

5.9. GLOBALNA INTERPRETACIJA GENSKE EKSPRESIJE POMOĆU BIOINFORMATIČKOG PROGRAMA DAVID I *GENE SET ENRICHMENT* ANALIZE

Globalna biološka interpretacija genske ekspresije u UUC učinjena je paralelno s dva bioinformatička sučelja: Gene Set Enrichment analizom i programom DAVID. Ove dvije metode primijenjene na sve podatke dobivene analizom genske ekspresije na čipovima identificirale su sljedeće GO kategorije kao značajno obogaćene u tumorima: napredovanje mitoze staničnog ciklusa, DNA replikacija, odgovor na podražaj oštećenja DNA, popravak DNA, aktivnost helikaze; kategorije povezane sa strukturom kromatina i metaboličkim procesima DNA, kromatin, DNA ovisna aktivnost ATP-aze, aktivnost metiltransferaze, vezivanje kromatina; skupa s procesima genske regulacije uključujući inicijaciju transkripcije promotorom RNA polimeraze II i aktivnost faktora translacije vezača nukleinskih kiselina (od engl. *translation factor activity nucleic acid binding*). Nadalje, identificirane su biološke kategorije sinteze i degradacije (engl. *turnover*) RNA i proteina uključujući obradu

RNA, izrezivanja RNA, spliceosome, kataboličke procese proteina, kompleks ubikvitin ligaze.

Identificirane su i kategorije značajno snižene u UUC u odnosu na normalno tkivo koje su uključivale signalne puteve WNT/ β -katenin, Hedgehog, vezanje FGFR liganda i aktivaciju i signalizaciju pomoću FGFR mutanata, signalizaciju pomoću Rho GTP-aza, kaskadu fosfatidil-inozitol 3 kinaze (PIK3), kaskadu posredovanu fosfolipazom C, kalcijski signalni put. Snižene kategorije stvaranja kolagena, funkcije glatkih mišića i miogeneze vjerojatno odražavaju epitelijalni fenotip tumora, s čim je u skladu i povišena razina E-kadherina i na mRNA i proteinskoj razini, no ne može se sa sigurnošću odbaciti niti mogućnost utjecaja primjese stanica glatkog mišićja u kontrolnim uzorcima na ove rezultate.

Povećana specifičnost programa uključenih u biologiju UUC postignuta je analizom isključivo značajno moduliranih 5438 gena. DAVID i GSEA analiza 2021 povišeno reguliranih gena u UUC otkrila je uključenost onkogenih i tumor supresorskih puteva uključujući aktivnost *MYC* onkogeni, odgovor na oštećenje DNA temeljen na *ATM*, *TP53*, *CHEK2* i *RBI* potpisu, aktivnost *BRCA1* i *BRCA2*, karcinom mokraćnog mjehura. Biološki sadržaj baziran na 3417 sniženo moduliranih transkripata uključivao je ciljne molekule proteina p63, ciljne gene utišavajućeg polikombinacijskog kompleksa *PRC2* označenog histon 3 lizin 27 trimetilazom, sniženje komponenti stanica-matriks i fokalne adhezije, kompleksa s integrinom te sniženje čimbenika epitelijalno-mezenhimalne tranzicije.

5.10. DEREGULACIJA TUMORSKIH miRNA

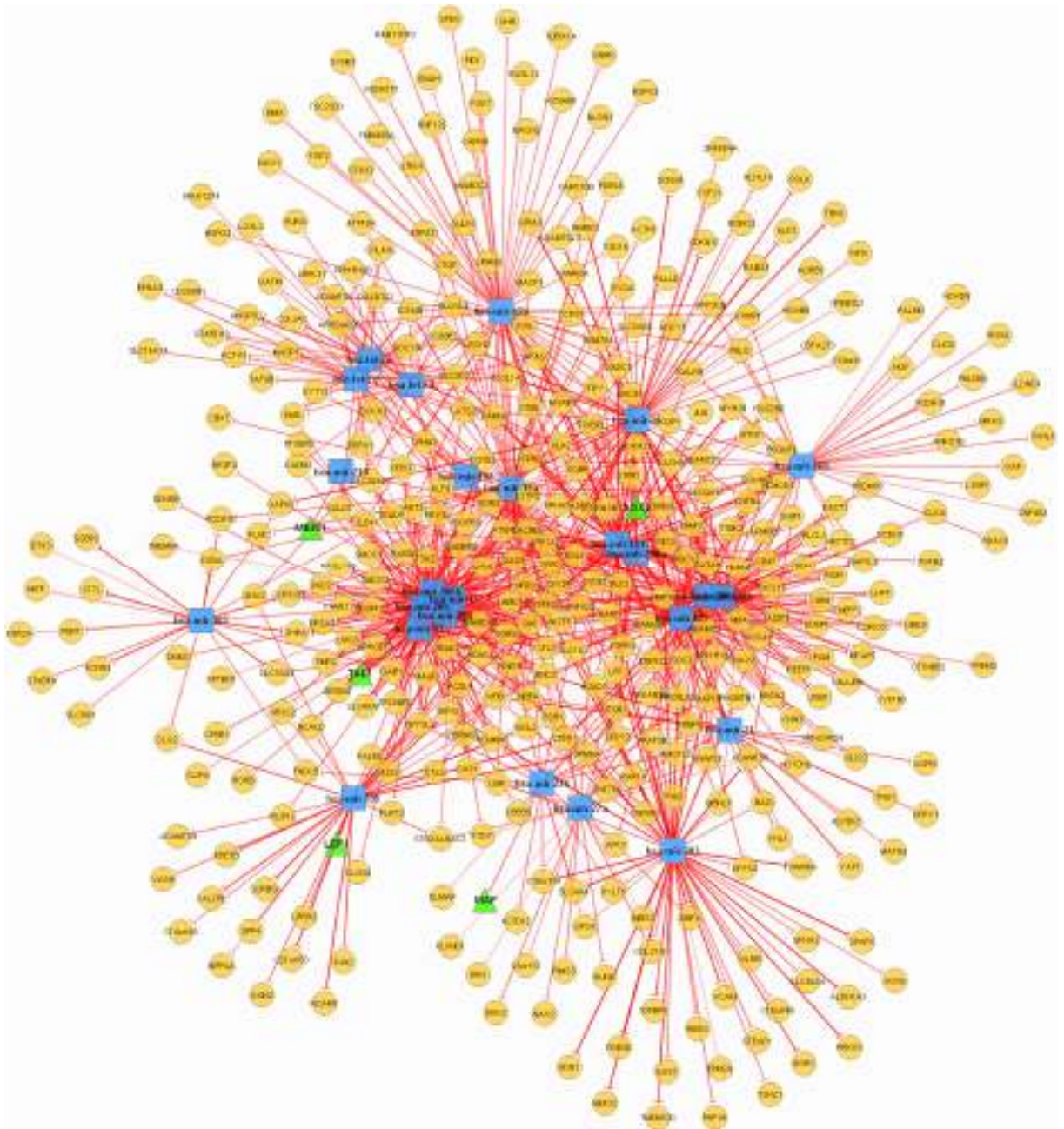
Rangiranjem 138 značajno moduliranih mikroRNA specifičnih za UUC na temelju njihovih relativnih razina u odnosu na normalno tkivo uočena je visoka razina modulacije mikroRNA ključnih za karcinogenezu. Najviše rangirane mikroRNA uključivale su članice miR-17 obitelji onkogenih mikroRNA smještenih na kromosomima 13 i 7 (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92a, miR-25, miR-93, miR-106b), dodatne članice miR-17 obitelji s kromosoma X uključujući miR-19b, 20b, 106a; zatim onkogenu i povezanu s odgovorom na stres miR-21 (kromosom 17) i miR-183 i miR-183, članice onkogene skupine s kromosoma 7. Nadalje, razine svih članica anti-metastatske miR-200 obitelji bile su značajno povišene u UUC: miR-200b, miR-200a, miR-429 (policistronska skupina na kromosomu 1) i miR-200c, miR-141 s kromosoma 12. S druge strane, tumor supresorske mikroRNA uključujući let-7c, miR-143/145 skupinu i miR-223b detektirane su među najniže moduliranim i najslabije rangiranim mikroRNA. Zaključno, identificirani specifični obrazac mikroRNA ekspresije u UUC podupire ulogu ovih nekodirajućih RNA u promociji rasta tumora, a paralelno s tim ima utjecaj na ograničenu metastatsku sposobnost tumorskih stanica.

5.11. INTEGRIRANI mRNA i miRNA PODACI

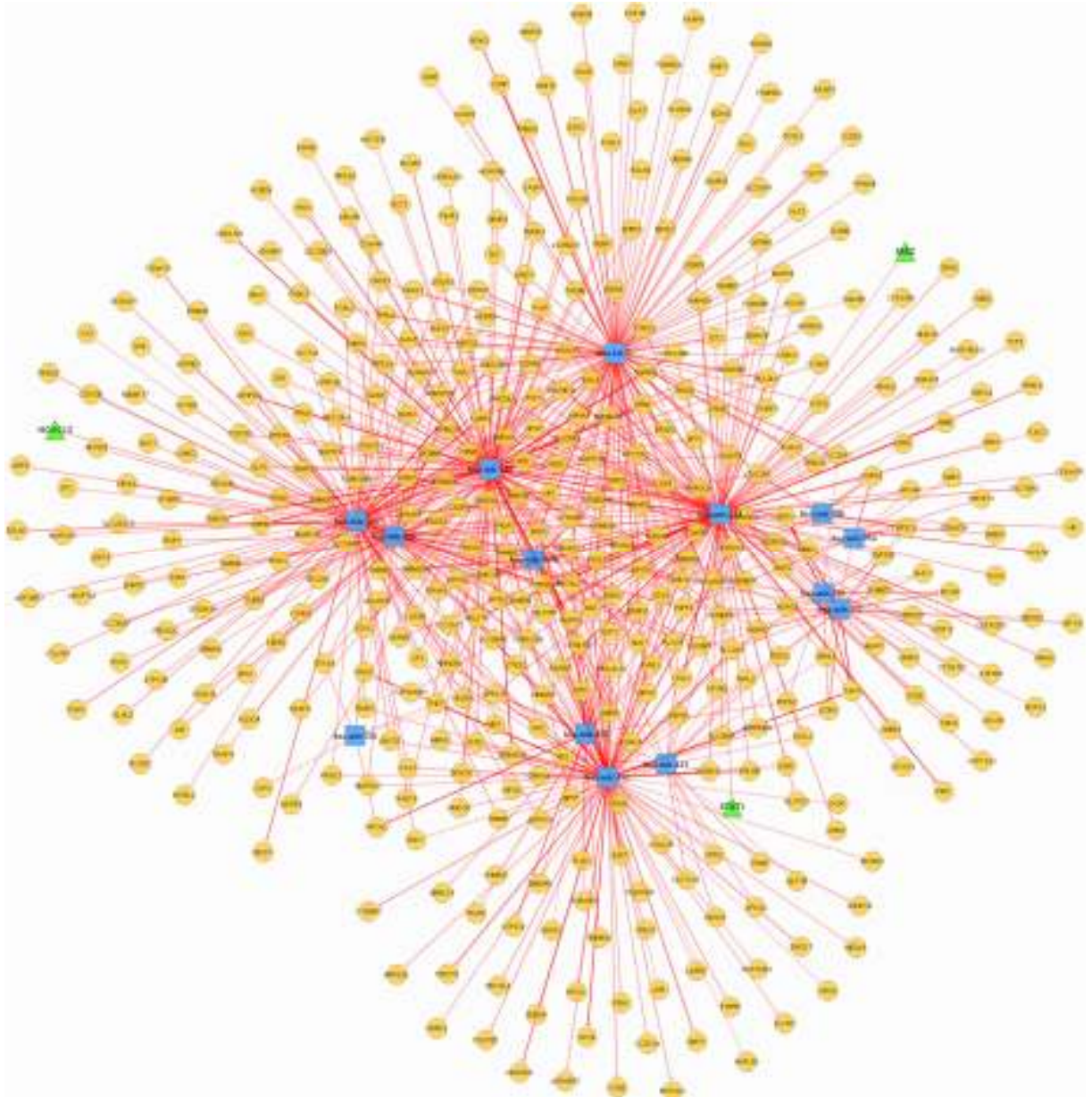
5.11.1. MREŽE GENSKIH PROGRAMA OVISNIH O miRNA

Kako bi se identificirali genski programi u UUC ovisni o posttranskripcijskoj regulaciji posredovnoj s mikroRNA, upotrijebljen je miRconnX, integrator mRNA-mikroRNA mreža specifičan za pojedino stanje (126). Ovaj bioinformatički program identificira obrnuto korelirane najbitnije mikroRNA povezane s njihovim

značajnim nizvodnim ciljnim molekulama. Dvadeset pet i četrnaest mikroRNA identificirane su kao najviše rangirane povišeno i sniženo modulirane mikroRNA. Obje ove skupine bile su obogaćene poznatim tumorskim mikroRNA. U grupi povišenih miRNA bile su: miR-15b, let-7a, let-7g, let-7d, miR-25, miR-26b, miR-210, miR-192, miR-19a, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429, miR-21, miR-185, miR-205, miR-224, miR-27a, miR-203, miR-106b, miR-17, miR-20b, miR-20a, miR-93. Grupa sniženih mikroRNA uključivala je let-7c, miR-145, miR-143, miR-766, miR-193b, miR-126, miR-150, miR-214, miR-100, miR-99a, miR-212, miR-132, miR-152, miR-411.



Slika 11. Mreže najznačajnijih povišenih mikroRNA i njihovih sniženih mRNA meta (legenda: gene ○, transkripcijski faktor Δ, mikroRNA □)



Slika 12. Mreže najznačajnijih sniženih mikroRNA i njihovih povišenih mRNA meta (legenda: gene ○, transkripcijski faktor Δ, mikroRNA □)

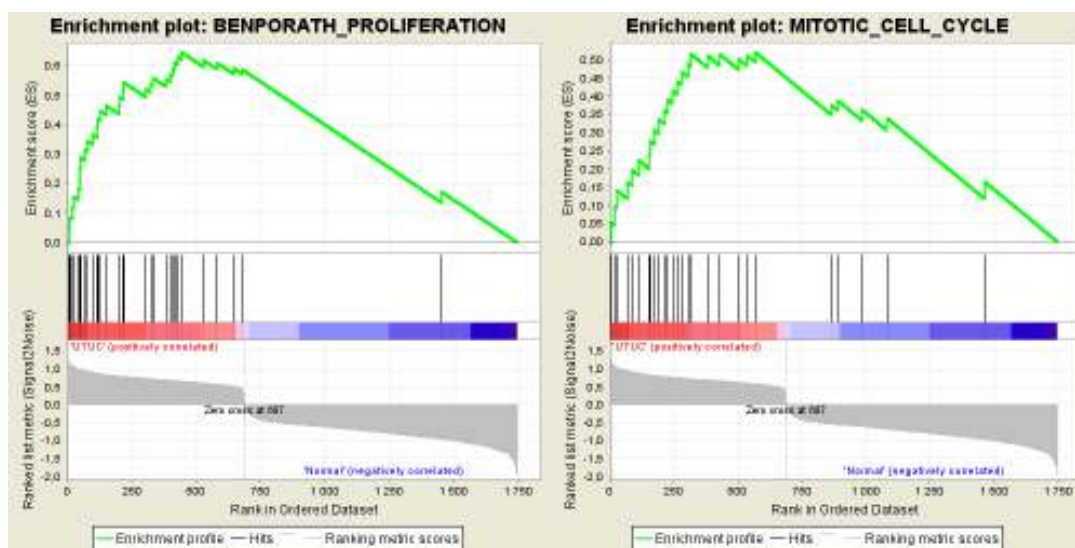
U nezavisnoj analizi korišteni su programi Targetscan i IPA kako bi se identificirale veze miRNA:mRNA obilježene snažnom predikcijom ciljnih molekula i obrnutom modulacijom. Četrdeset pet povišeno moduliranih miRNA bile su povezane s 1159 sniženih mRNA, dok su 44 snižene mikroRNA bile povezane s 703 povišeno

moduliranih mRNA. Povezivost mikroRNA s nizvodnim ciljnim mRNA varirale su između 2 i 220 ciljnih mRNA za povišeno eksprimirane mikroRNA, odnosno 7-88 mRNA za sniženo eksprimirane mikroRNA. Povezivost gena s uzvodnim mikroRNA varirala je od 1 do 10 miRNA za povišeno eksprimirane gene i 1-18 miRNA za sniženo eksprimirane gene. Među povišenim mikroRNA s najvišom povezivosti s nizvodnim ciljnim mRNA bile su mikroRNA iz obitelji 17 i 200: miR-429 (202 poveznica), miR-19a (179 poveznica), miR-106b (174 poveznica), miR-182 (165 poveznica), miR-141 (141 poveznica), dok su među sniženo eksprimiranim mikroRNA s najvišom povezivosti bile 23b (16 poveznica), let-7c (88 poveznica), miR-145 (77 poveznica). S druge strane, među povišeno eksprimiranim genima s najvećom povezivosti bili su *TET-3* (8 poveznica) - jedan od ključnih faktora u aktivnom demetilacijskom putu i *KRAS* (7 poveznica) - gen značajan za tumore za kojeg je poznato da je povišen u neinvazivnim karcinomima mokraćnog mjehura. *ENAH* je bio sniženo modulirani gen s najviše poveznica, njih 18, a riječ je o genu čiji je produkt uključen u regulaciju citoskeletona i poznato je da je povišen u invazivnim karcinomima (127).

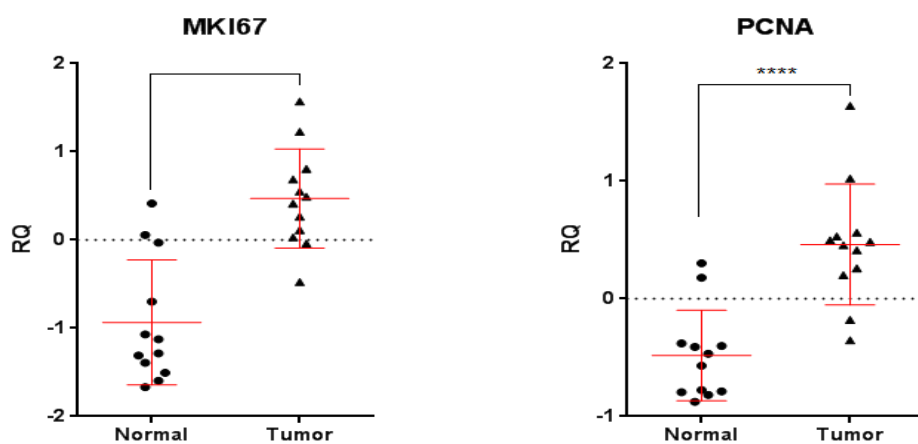
Paralelna DAVID i GSEA analiza mikroRNA ovisnih genskih programa dala je visoko specifični uvid u konkretne biološke puteve uključene u biologiju UUC. Obje grupe gena: povišeni geni vjerojatno uzrokovani sniženom modulacijom uzvodnim mikroRNA regulatorima, i sniženi geni posljedično povišenim mikroRNA bili su dijelom sličnih kategorije onima koje je ranije identificirala analiza svih značajno moduliranih gena.

5.11.2.STANIČNA PROLIFERACIJA

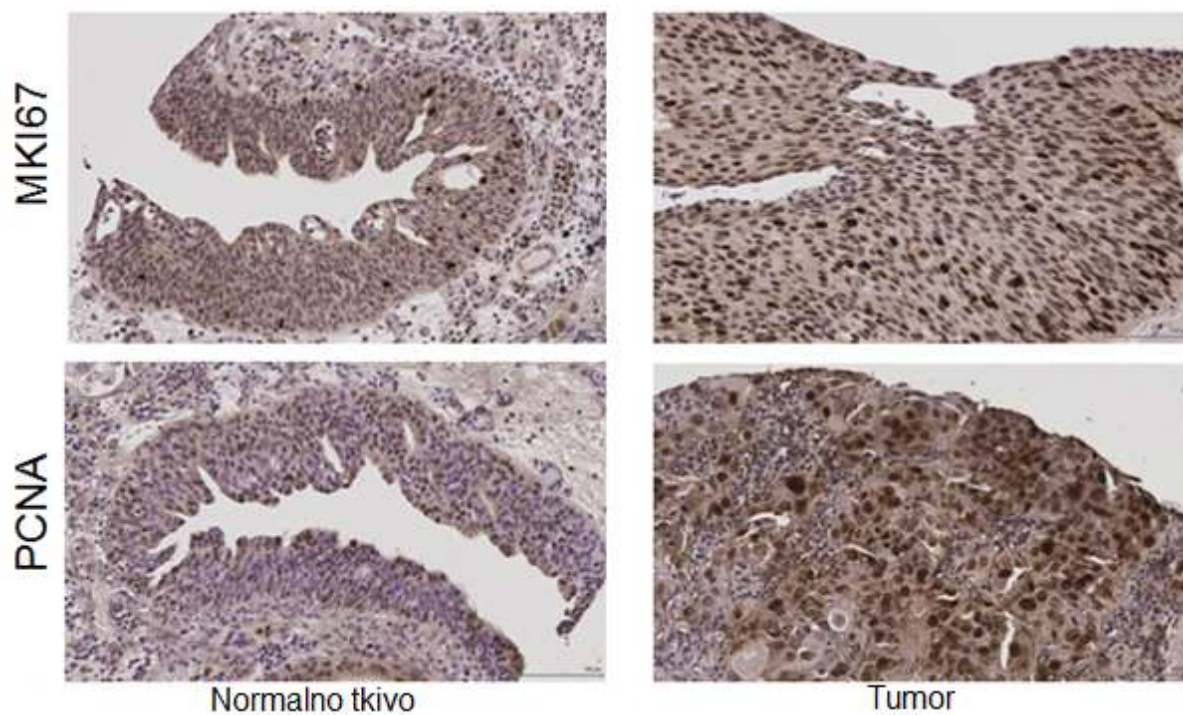
Transkripti mRNA uključeni u staničnu proliferaciju, stanični ciklus, mitozu, bili su povišeni u UUC u odnosu na normalno tkivo. Ki67, poznati marker proliferacije i PCNA, protein povezan s DNA replikacijom bili su povišeni u tkivu tumora u odnosu na zdravo tkivo i na razini gena i razini proteina. Dodatno, mikroRNA uključene u kontrolu regulacije staničnog ciklusa, za koje je poznato da su disregulirane u tumorima, opažene su i u ovom istraživanju: miR-17, 20a, 20b, 106a, 106b, 93, 19a, 181a, 210, 221 bile su povišene u UUC u odnosu na zdravo tkivo, dok su miR-100, miR-125b i miR-145 bile snižene u tumoru.



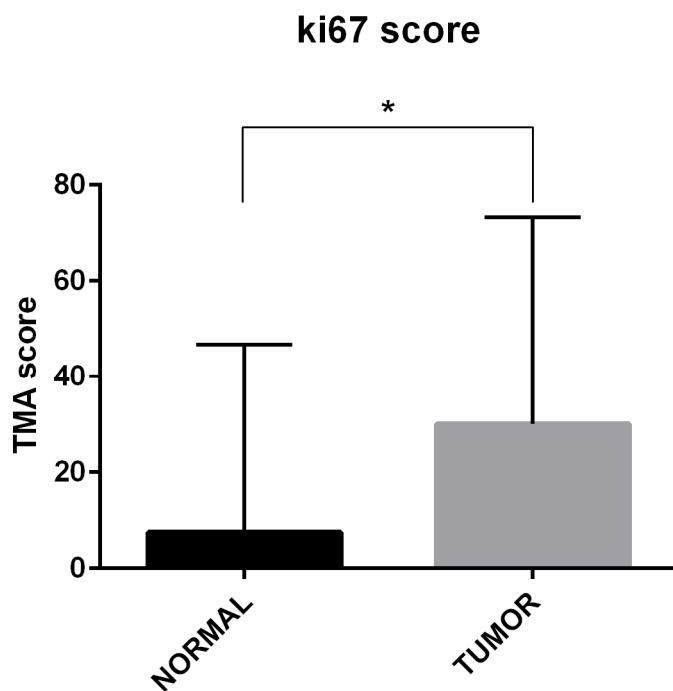
Slika 13. Rezultati GSEA za proliferaciju i stanični ciklus



Slika 14. Povišena ekspresija *Ki67* i *PCNA* u tumorima na genskoj razini



Slika 15. Bojenje na *Ki67* i *PCNA* u normalnom tkivu i UUC



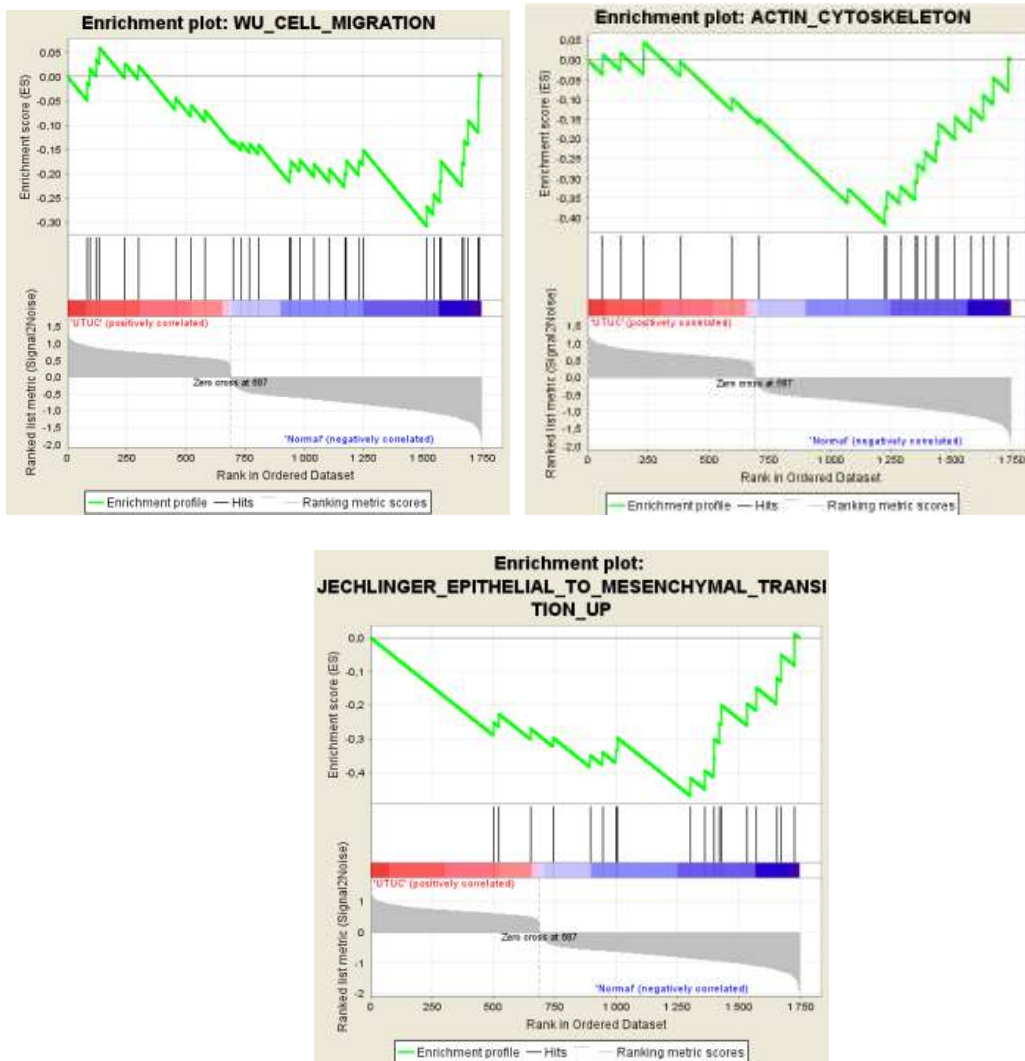
Slika 16. Ki67 indeks (ili *score*) za normalno i UUC tkivo

5.11.3. DEREGULACIJA MEĐUSTANIČNOG I STANICA-MATRIKS KONTAKTA

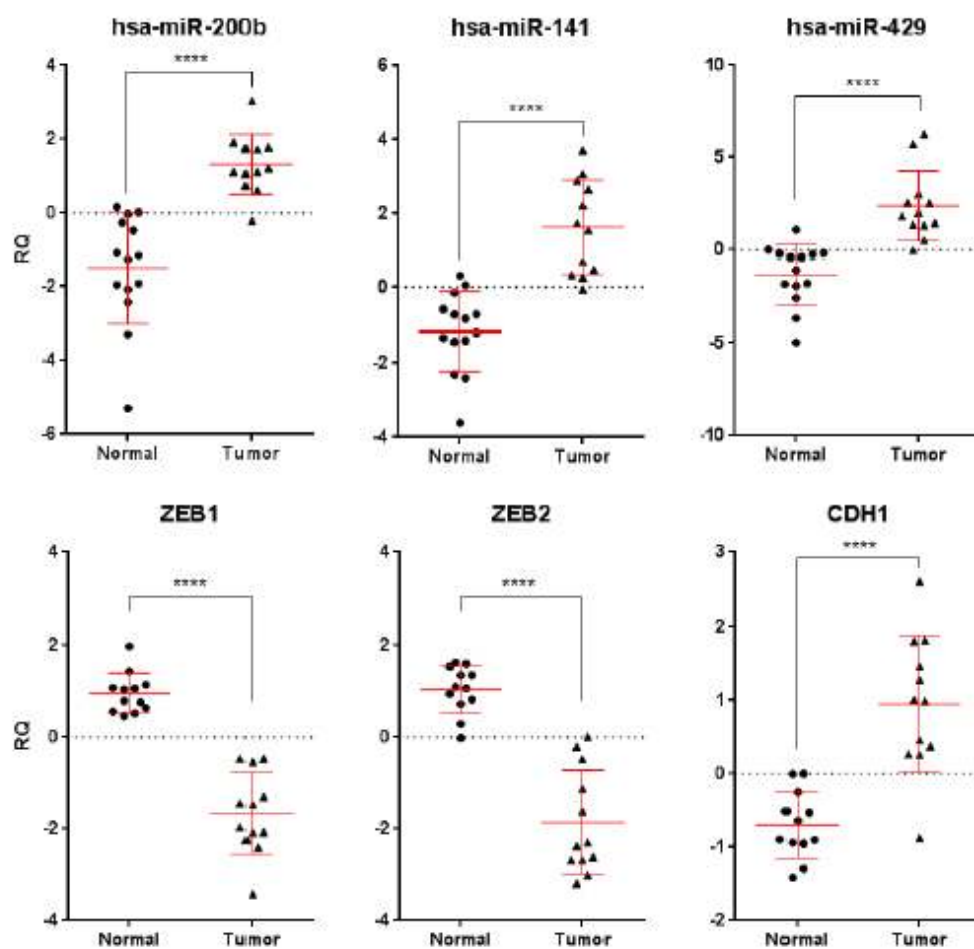
DAVID i GSEA analiza genske ekspresije identificirale su kategorije stanične pokretljivosti, migracije i aktin citoskeletona kao značajno snižene u UUC. Dodatno, uočili smo i UUC specifičnu povišenu ekspresiju svih članica miR-200b/429 i miR-200a/141 obitelji (Slika 20), anti-metastatskih mikroRNA koje za svoje ciljne molekule imaju *ZEB1* i *ZEB2*, transkripcijske represore *E-kadherina* (*CDH1*), a dodatno su identificirane još i 13 drugih mikroRNA, regulatora *ZEB1* i/ili *ZEB2* koje ciljaju 8- ili 7-nukleotidne *seeding* sekvence ovih transkripata (Slika 20). I *ZEB1* i *ZEB2* bili su značajno sniženi na razini RNA, dok je mRNA *E-kadherina* bila značajno povišena u UUC (Slika 18). Ovi rezultati upućuju da

regulacijska mikroRNA-*ZEB1/2-E-kadherin* os sprječava UUC stanice da steknu mezenhimalne karakteristike u procesu kao što je EMT, doprinoseći njihovom epitelijalnom, nemetastazirajućem fenotipu. Ovi podaci potkrijepljeni su rezultatima sustavne imunohistokemijske analize na TMA koja je pokazala trend viših vrijednosti E-kadherina u UUC u odnosu na normalno tkivo i jače CDH1 obojenje adherentnih veza u tumoru (Slika 21).

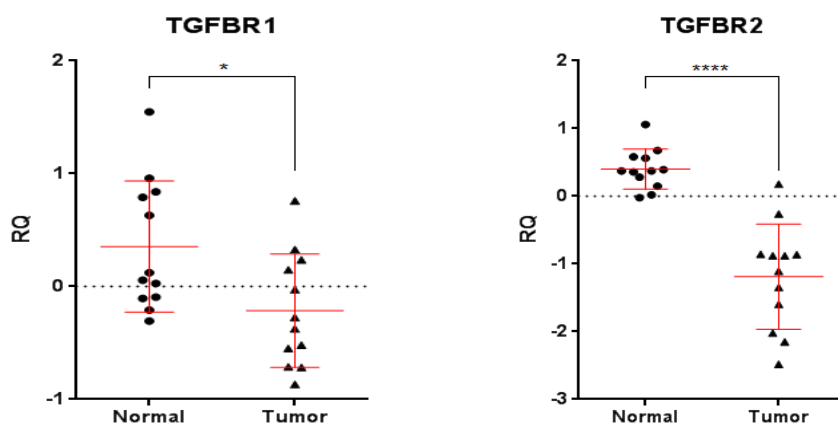
Dodatno, TGF- β , za kojeg je poznato da povećava ekspresiju transkripcijskih represora *E-kadherina* poput *ZEB1* i *ZEB2* kad je aktivan, u UUC bio je sniženo ekspimiran. Među značajno sniženim genima ovog signalnog puta bili su: *TGF- β 2*, *TGF- β 3*, *TGFB11*, *TGFBR1*, *TGFBR2* i *SMAD9*. *TGFBR2* je poznata ciljna molekula miR-106b, molekule koja je bila povišena u našim rezultatima. SMAD je na razini proteina bio sniženo ekspimiran u UUC (Slika 9).



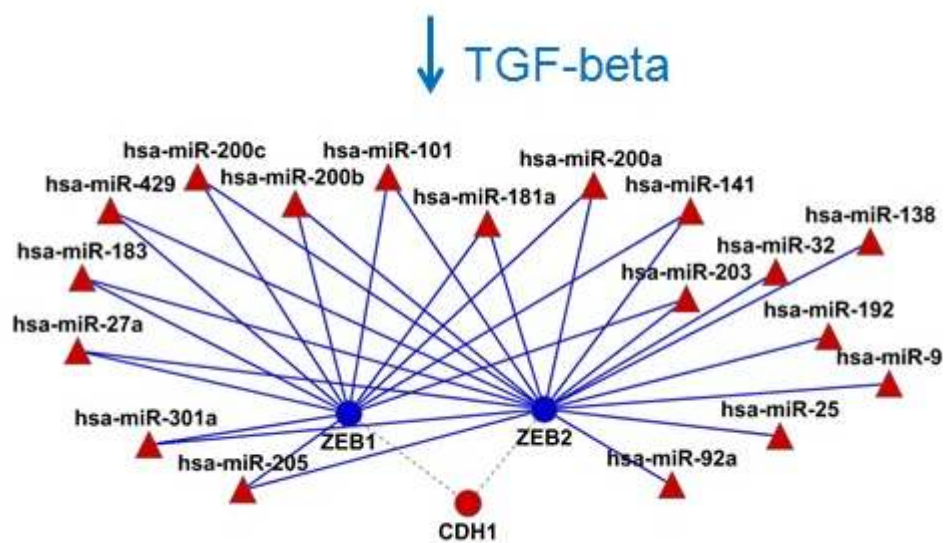
Slika. 17. Rezultati GSEA za migraciju stanica, aktin citoskeleton i EMT



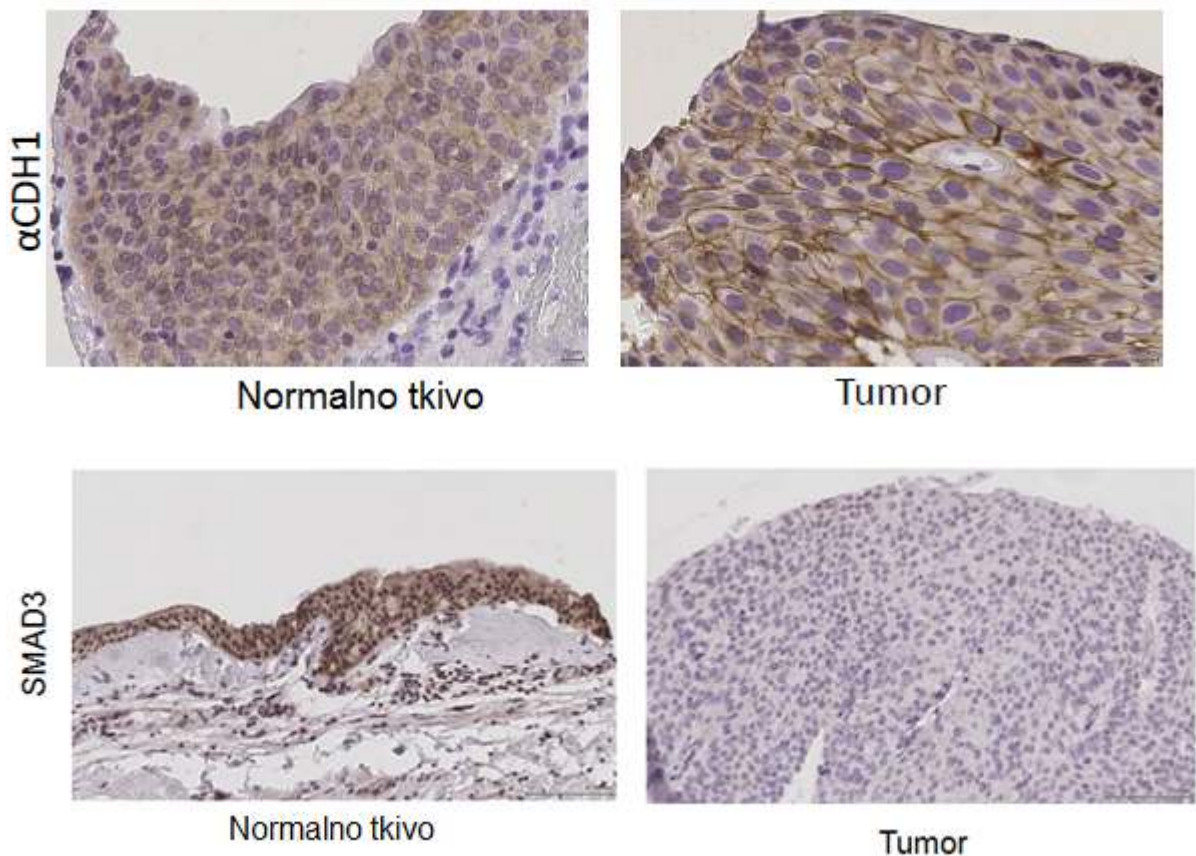
Slika 18. Ekspresija miR-200 obitelji u normalnom vs. tumorskom tkivu (gore), ekspresija *ZEB1*, *ZEB2* i *E-kadherina (CDH1)* u normalnom vs. tumorskom tkivu (dolje)



Slika 19. Snižena ekspresija mRNA *TGFBR21* i *TGFBR2* u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo



Slika 20. Regulacijska os TGF- β -miRNA-ZEB1/ZEB2-E-kadherin



Slika 21. Bojenje na CDH1 i SMAD3 u normalnom i tumorskom tkivu

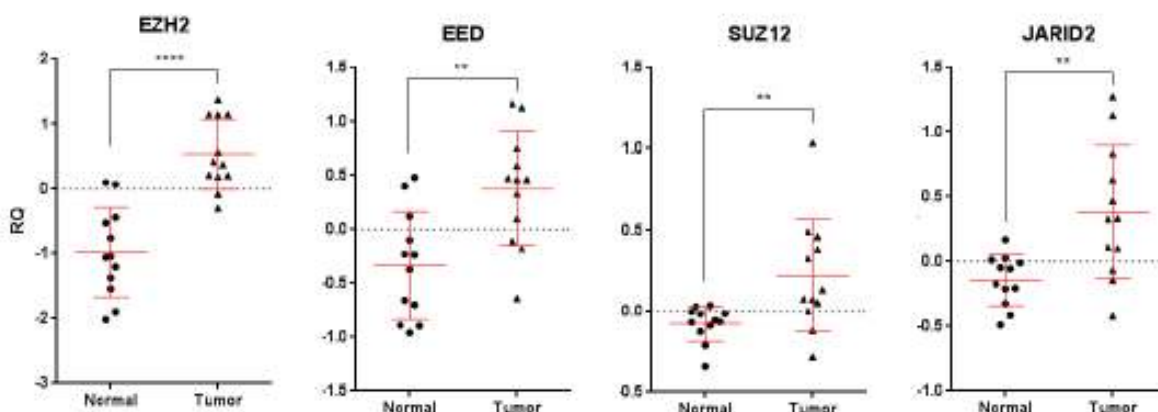
5.11.4. REMODELIRANJE KROMATINA, PRC2 (*Polycomb-Repressive Complex*

2)

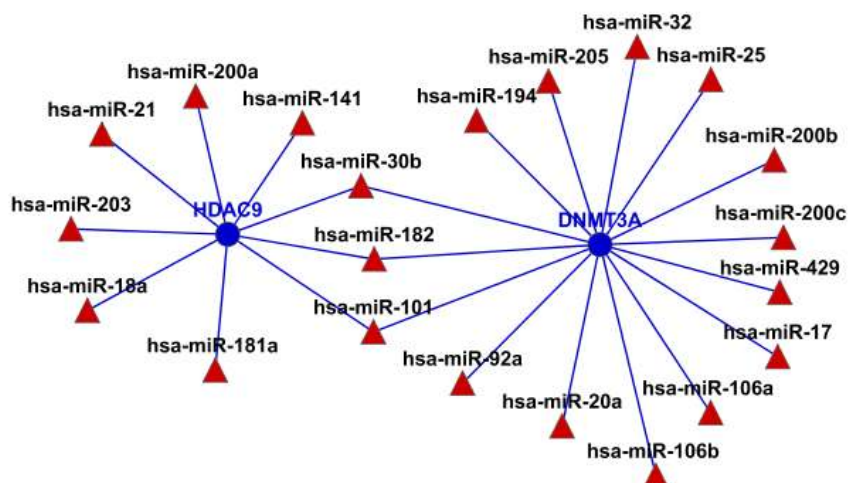
Značajno disregulirani programi genske ekspresije uočeni u UUC uključili su i kategorije kromatin, građa kromatina, vezanje kromatina, modifikacije kromatina, DNA i aktivnost proteina metiltransferaze. Uočen je obrazac UUC specifične povišene ekspresije svih ključnih komponenti PRC2 kompleksa: *EZH2*, *EED*, *SUZ12* i *JARID2*, sa zajedničkom ulogom u utišavanju kromatina uspostavljanjem oznake *histon 3 lizin 27 trimetilazom (H3K27me3)*. Povišena regulacija komponenti PRC2 kompleksa moguće je potpomognuta UUC specifičnim značajno sniženim

uzvodnim mikroRNA regulatorima ovih gena, uključujući *let-7c* za *EZH2*, miR-1 za *SUZ12*, miR-23b, miR-143, miR-145 i miR-150 za *JARID2*. Nadalje, mnogi geni s ulogom u održavanju strukture kromatina i remodeliranja kromatina su također bili povišeno eksprimirani, među kojima su bili: *SUV39H1*, *SUV39H2*, faktori građe kromatina *CHAF1A* i *CHAF1B*, DNA-vezajući *HMGAI*, deacetilaze histona *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC8*, *HDAC10*, H3K36me3-specifični označivači *WHSC1*, *WHSC1L1* i skupina lizin demetilaza *KDM1A*, *KDM4B*, *KDM4B*, *KDM3A*, *KDM4C*, *KDM5B* i H3K27me3-specifična *KDM6A*. *HDAC9* je bio značajno snižen u UUC. Također smo identificirali nekoliko dereguliranih čimbenika metilacije DNA, uključujući povišenu metil-CpG vezajuću domenu *MBD1*, sniženu DNA metiltransferazu *DNMT3A*, a ove gene smo povezali s obrnuto moduliranim uzvodnim mikroRNA. Snižena razina *DNMT3A* moguće je potpomognuta konvergentnim djelovanjem jako visoko eksprimiranih onkogenih mikroRNA uključujući one iz miR-17-92 i miR-200 obitelji. Imunohistokemijska analiza TMA potvrdila je UUC specifičnu povišenu ekspresiju *EZH2*, glavnog člana PRC2 kompleksa, dok je istodobno obogaćenje globalne oznake H3K27me3 bilo manje jasno. Moguće je da povišenje PRC2 dovodi do lokalne redistribucije oznake H3K27me3 u stanicama UUC zbog čega ovu oznaku nije lako imunohistokemijski detektirati i radi čega bi bila potrebna točna analiza lokacije. Kako bismo procijenili nizvodni učinak povišene razine PRC2 učinili smo ciljanu analizu 4213 poznatih PRC2 "meta" u embrionalnim matičnim stanicama dostupnih u GSEA Mig bazi podataka i uočili da se 551 gen od navedenih meta PRC2 kompleksa poklapa sa značajno sniženim genima identificiranim u UUC. Nadalje, 408 od 551 gena (74%) bili su ciljne molekule 45 mikroRNA značajno povišenih u UUC. Ovi podaci

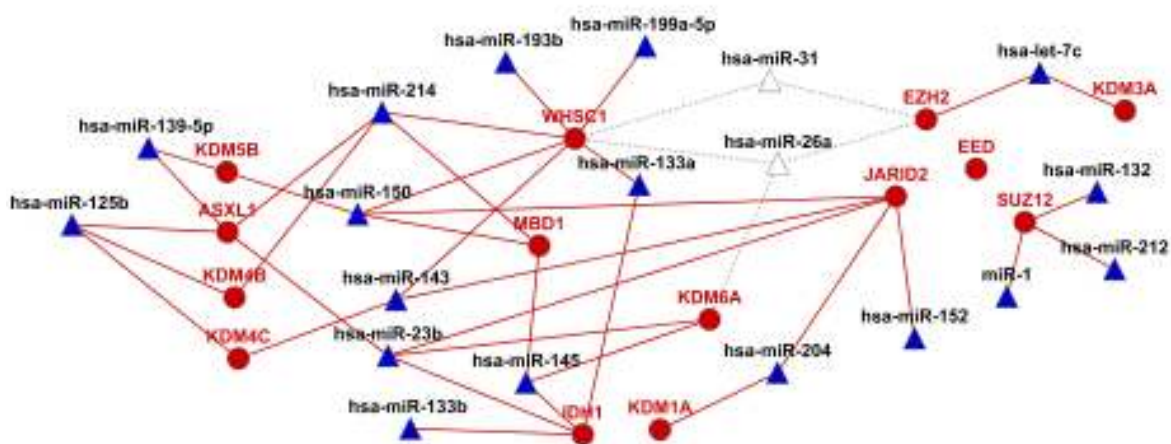
upućuju na koordinirani učinak PRC2-posredovane kromatinske i genske aktivnosti na utišavanje i inhibiciju genskih produkata sa širim ko-regulacijskim ekspresijskim programima djelovanjem mikroRNA.



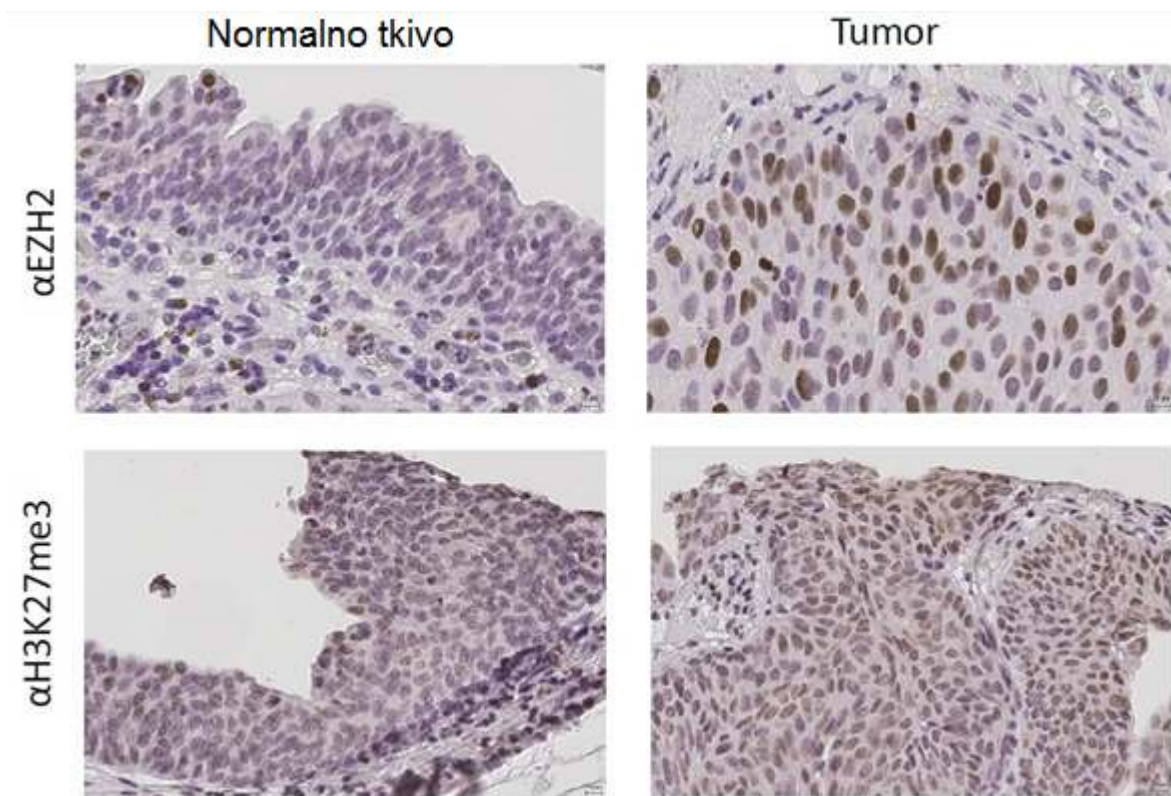
Slika 22. Ekspresija EZH2, EED, SUZ12 i JARID 2 gena u normalnom u odnosu na tumorsko tkivo



Slika 23. Regulacija HDAC9 i DNMT3A putem mikroRNA



Slika 24. Mreža mikroRNA i gena komponenti PRC2 kompleksa te dodatnih gena s ulogom u održavanju strukture kromatina i njegovom remodeliranju



Slika 25. Imunohistokemijsko bojenje na EZH2 i H3K27me3 u zdravom odnosno tumorskom tkivu

5.11.5. ONKOGENI, TUMOR SUPRESOR GENI

Brojni poznati tumorski geni uključeni u UUC karcinogenezu otkriveni su analizom ekspresijskog profiliranja tkiva tumora, među kojima je bilo mnoštvo onkogeni (35 povišeno i 54 sniženo reguliranih) i poznatih tumor supresorskih gena (17 povišeno, 3 sniženo regulirana). Ovi podaci prikazani su u tablici 16.

Tablica 16. Popis značajno dismoduliranih onkogeni i tumor supresor gena u UUC

Tip	mRNA modulacija (p<0.05, B.-H. FDR), 50% FC	Simbol gena	Ime gena
Onkogeni	Povišeni u UUC	ABI1	abl-interactor 1
		ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
		BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
		CASC5	cancer susceptibility candidate 5
		CBFB	core-binding factor, beta subunit
		CCND1	cyclin D1
		CHCHD7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7
		ELF4	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)
		ETV4	ets variant 4
		EZH2	enhancer of zeste homolog 2
		FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
		GMPS	guanine monophosphate synthetase
		HMGA1	hypothetical LOC100130009; high mobility group AT-hook 1
		HOXC13	homeobox C13
		HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
		IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
		KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
		MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog
		MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
		MSI2	musashi homolog 2
MTCP1	mature T-cell proliferation 1 neighbor; mature T-cell proliferation 1		
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog		

	MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)
	NACA	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit
	NCOA2	nuclear receptor coactivator 2
	NPM1	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
	PIM1	pim-1 oncogene
	PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1
	RNF213	ring finger protein 213
	STIL	SCL/TAL1 interrupting locus
	TCF3	transcription factor 3
	TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)
	TPM3	tropomyosin 3
	TRIM24	tripartite motif-containing 24
	WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
	Sniženi u UUC	AFF3
BCL2		B-cell CLL/lymphoma 2
CBFA2T3		core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2
CCND2		cyclin D2
CDH11		cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
COL1A1		collagen, type I, alpha 1
CREB3L2		cAMP responsive element binding protein 3-like 2
DNMT3A		DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
ELN		elastin
ERC1		ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
ERG		v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
FGFR1		fibroblast growth factor receptor 1
FNBP1		formin binding protein 1
FOXP1		forkhead box P1
GAS7		growth arrest-specific 7
GNAQ		guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide
GOPC		golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing
HIP1		huntingtin interacting protein 1
HLF		hepatic leukemia factor
HOXA11		homeobox A11
HOXD11		homeobox D11
IL6ST		interleukin 6 signal transducer
JAZF1		JAZF zinc finger 1
JUN		jun oncogene
LHFP		lipoma HMGIC fusion partner
LIFR		leukemia inhibitory factor receptor alpha
LMO2		LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)

	LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
	MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
	MAML2	mastermind-like 2
	MITF	microphthalmia-associated transcription factor
	MN1	meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
	MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene
	MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
	NFIB	nuclear factor I/B
	NOTCH2	Notch homolog 2
	NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
	OMD	osteomodulin
	PAX8	paired box 8
	PCM1	pericentriolar material 1
	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
	PER1	period homolog 1
	PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
	PRDM16	PR domain containing 16
	PRRX1	paired related homeobox 1
	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
	RUNX1T1	runt-related transcription factor 1
	SEPT6	septin 6
	SETBP1	SET binding protein 1
	SPOP	speckle-type POZ protein
	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
	ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16
ZNF521	zinc finger protein 521	
Tumor Supresori	ACVR1B	activin A receptor, type IB
	ASXL1	additional sex combs like 1
	BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
	BRCA1	breast cancer 1, early onset
	BRCA2	breast cancer 2, early onset
	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
	BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta
	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A
	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
	FANCG	Fanconi anemia, complementation group G

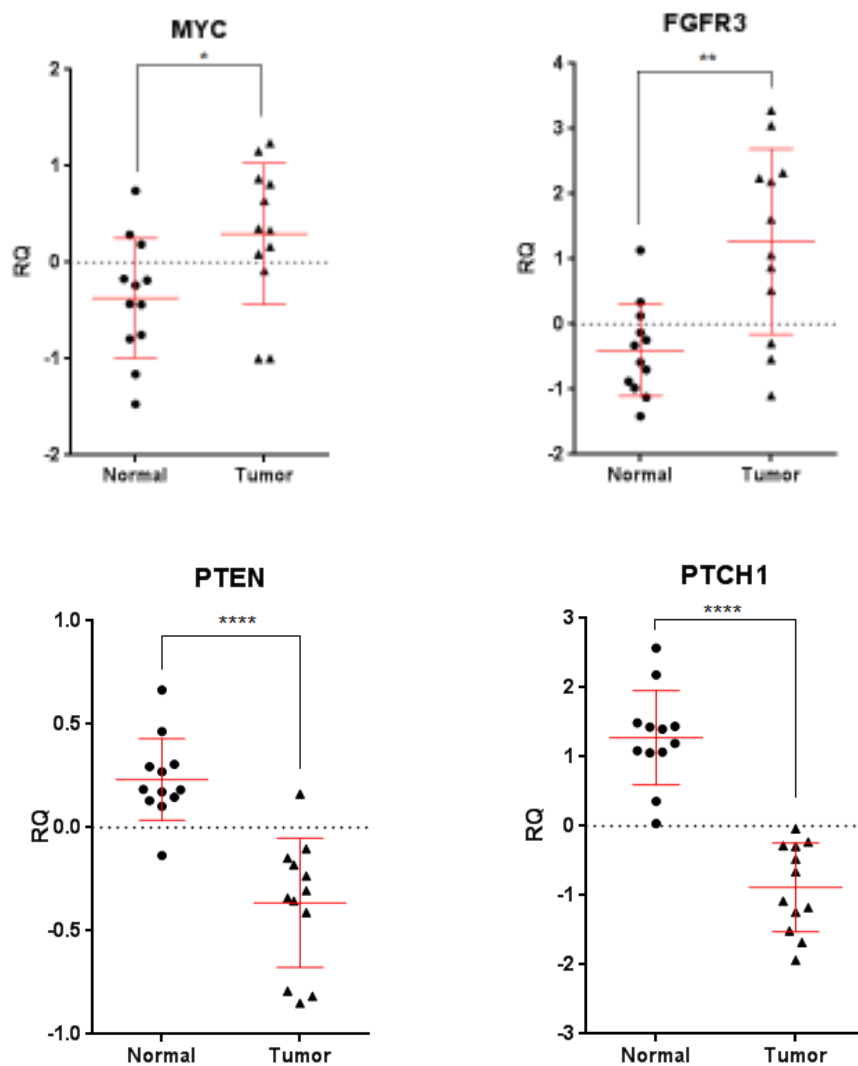
	KDM6A	lysine (K)-specific demethylase 6A
	NBN	nibrin
	NF1	neurofibromin 1
	RECQL4	RecQ protein-like 4
	SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
Sniženi u UUC	ATM	ataxia telangiectasia mutated
	PTCH1	patched homolog 1
	PTEN	phosphatase and tensin homolog

* AKAP9, AR, ARHGAP26, BCL11A, BCL9, CARS, CLTCL1, CSF1R, DDX10, ETV1, ETV5, ETV6, FCRL4, FGFR1OP, FLI1, FOXO4, GNAS, HOXC11, JAK1, KIAA1549, MLF1, NCKIPSD, NIN, NOTCH1, PAX7, PD4DIP, PP2R1A, RET, ROS1, SRGAP3, ZMYM2 nisu bili značajno modulirani onkogeni

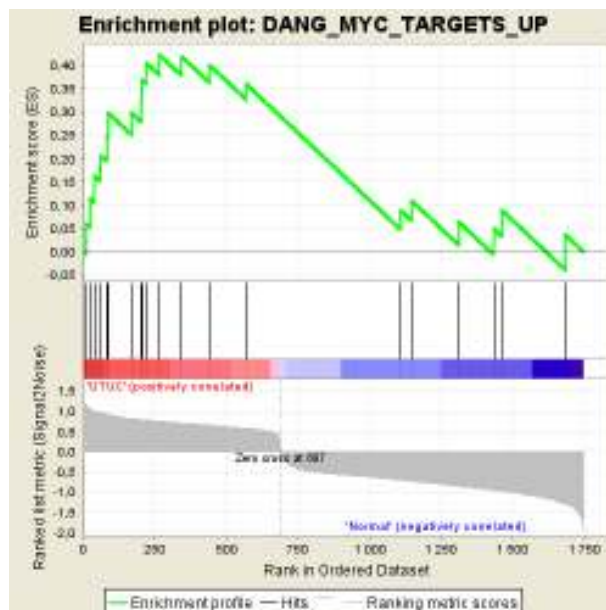
** APC, ATRX, ARID1A, BMPR1A, CDC73, CHEK2, CREBBP, EP300, ERCC5, FAS, FH, FUBP1, MLH1, MLL2, MSH2, RB1, STAG2, TP53 nisu bili značajno modilirani tumor supresori

Analizirali smo je li povišena razina specifičnih onkogeno (*MYC*, *FGF3*, *HKAS* i *KRAS*) i snižena razina tumor supresor gena (*PTEN*, *PTCH1*) u UUC uvjetovana koordiniranim djelovanjem mikroRNA. Slika 28. prikazuje korelacijsku mrežu koja uključuje brojne sniženo eksprimirane mikroRNA, regulatore onkogeno, uključujući tumor supresorske miRNA miR-23b, miR-143 i miR-145 i s druge strane jasnu inhibiciju *PTCH1* putem povišene razine onkogenih miRNA uključujući miR-21, miR-18a i miR-9 i inhibiciju *PTEN* gena putem onkogene miR-17-92 obitelji. I *PTEN* i *PTCH1* zajednički su inhibirani gotovo svim članicama miR-200 obitelji. Povišeni *MYC* u tom slučaju predstavlja centralni čvor u ovim procesima budući da funkcionira kao aktivator miR-17, miR-20 i miR-9 i inhibitor miR-23b, te represor *FGFR3* i *KRAS* i tumor supresorske let-7c. Imunohistokemijskom analizom uočen je trend niže razine *PTEN* proteina u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo. Sumirano, UUC karcinogeneza povezana s AA karakterizirana je značajnom deregulacijom

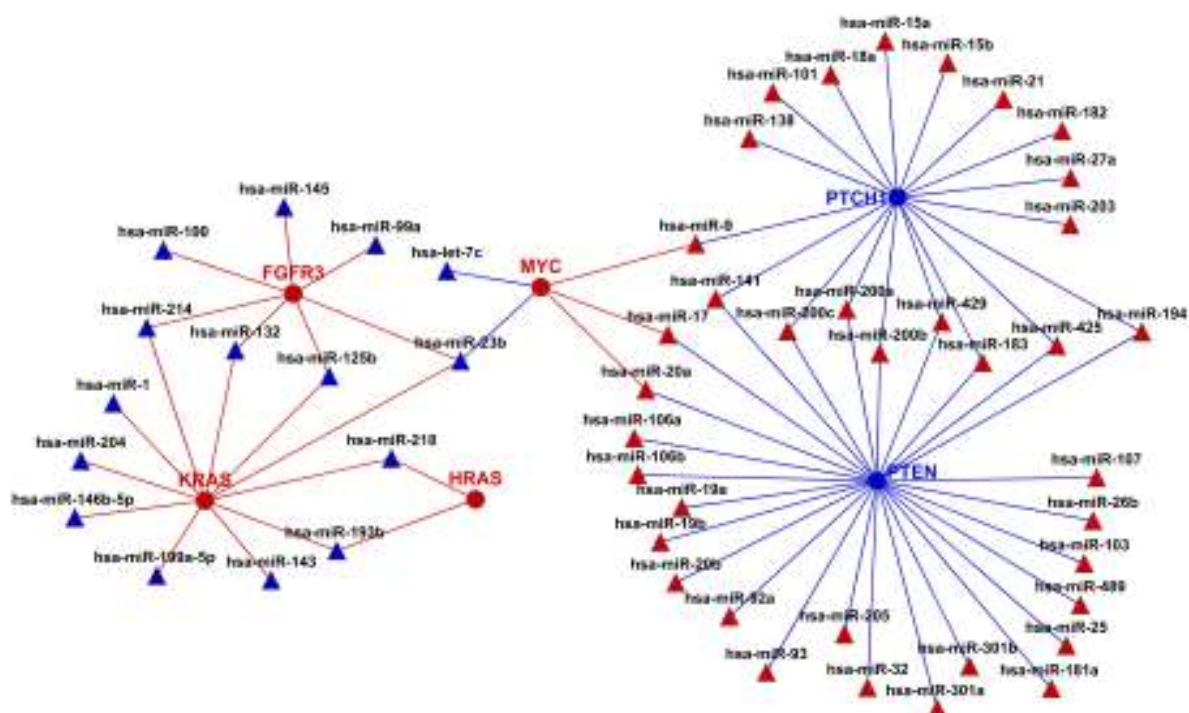
onkogeni i tumor supresorskih gena čija je aktivnost moguće modulirana koordiniranim djelovanjem mikroRNA.



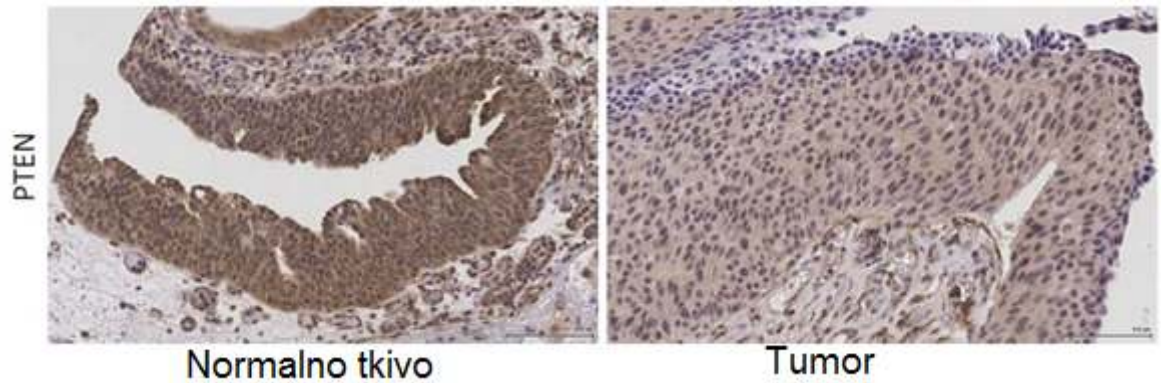
Slika 26. Ekspresija *MYC*, *FGFR3*, *PTEN* i *PTCH1* gena u normalnom tkivu odnosu na UUC



Slika 27. Rezultat GSEA za ciljne gene onkogene i transkripcijskog faktora MYC



Slika 28. Mreža sniženih mikroRNA regulatora onkogene *MYC*, *FGFR3*, *KRAS*, *HRAS* i povišenih onkogenih mikroRNA s ciljnim molekulama *PTCH1* i *PTEN*. *MYC* predstavlja centralni čvor ove mreže.



Slika 29. Imunohistokemijsko bojenje na PTEN u normalnom i tumorskom tkivu

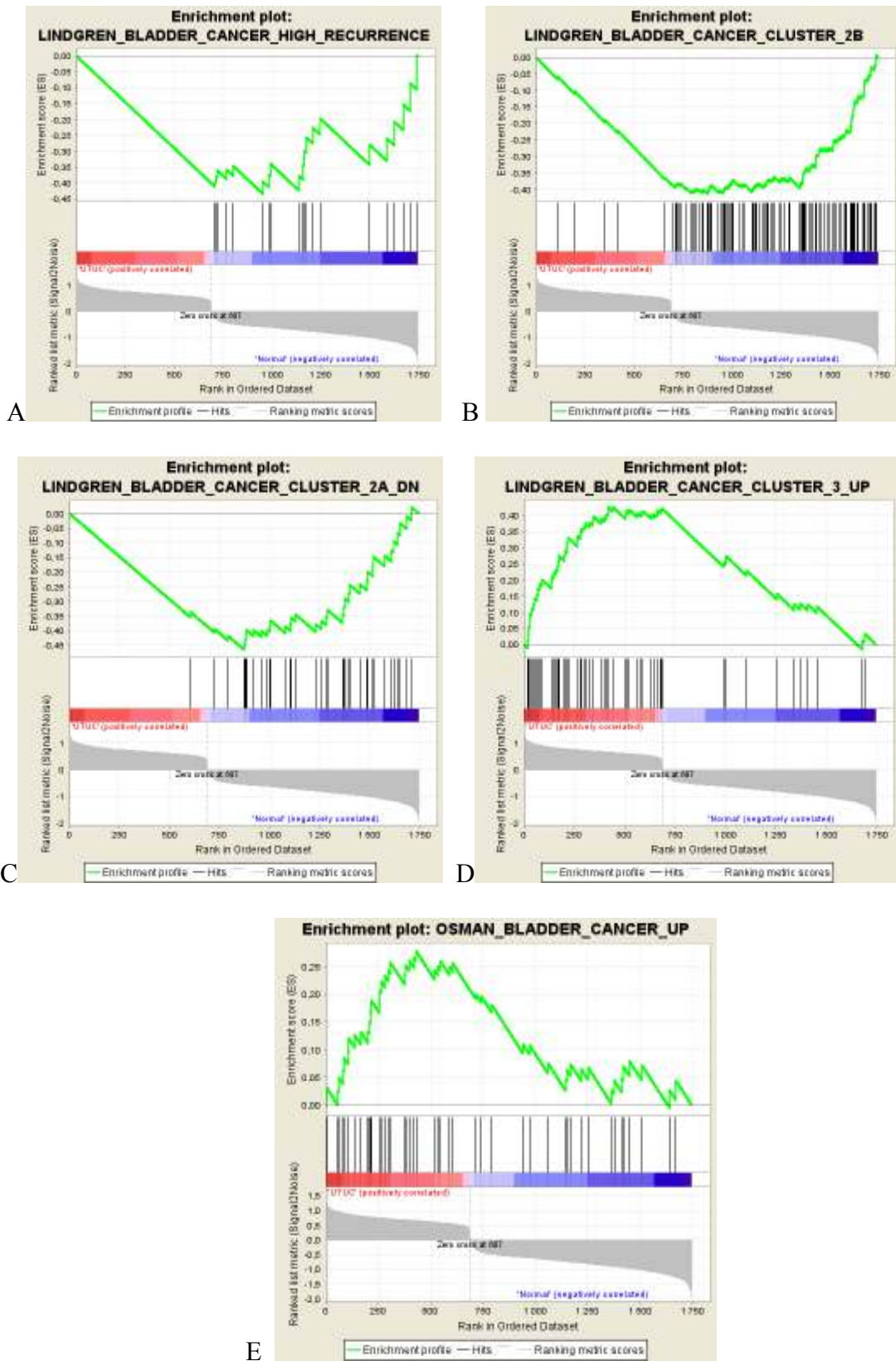
Gen *TP53*

TP53 poznati je tumor supresorski gen, mutiran i disreguliran u brojnim tumorima. Za UUC karakteristična je A-T transverzija koja je inicijalno bila otkrivena u genu *TP53*. Novija istraživanja ukazuju na globalnu prisutnost ove mutacije (72, 73). Mutacija A-T u genu *TP53* je u ovom istraživanju bila je prisutna kod 3 bolesnika. Također gen *TP53* u tumorima pokazuje tendenciju viših vrijednosti u tumoru, ali bez statističke značajnosti, jednako kao i protein p53 imunohistokemijskom analizom. Uzevši ove podatke u obzir i imajući u vidu bogate regulacijske programe prisutne u UUC, moglo bi se zaključiti da je p53 samo jedan od čimbenika u UUC karcinogenezi.

5.11.6. PROGRAMI VEZANI UZ UROTELNE KARCINOME

Geni povezani s putevima karcinogene u neoplazmi mokraćnog mjehura su također analizirani koristeći sučelja DAVID i GSEA. Kad je primijenjen program DAVID na set od 1862 dismodulirana gena (1159 sniženih i 703 povišeni) koji su ciljne molekule 45 značajno povišenih i 44 značajno sniženih mikroRNA koristeći srednje snažnu klasifikaciju, put karcinoma mokraćnog mjehura bio je jedan od puteva

obogaćenih u skupini povišenih UUC gena. Među zajednički moduliranim genima bili su HRAS, CDKN1A, E2F3, CCND1, FGFR3, KRAS, VEGFA i CDH1. Glavne snižene mikroRNA čiji su navedeni geni ciljne molekule uključivale su: let-7c (HRAS, KRAS, CCND1, CDKN1A), miR145 (HRAS), miR-143 (KRAS), miR-193b (CCND1, KRAS), miR-126 (VEGFA), miR-150 (VEGFA), miR-212 (KRAS), miR-152 (HRAS), miR99a (FGFR3), miR23b (CDH1, CCND1). Međutim, postrožavanjem klasifikacije izgubljena je značajnost za ovaj put. S druge strane GSEA analiza pokazala je zanimljive rezultate: geni povezani s visokom vjerojatnošću relapsa karcinoma mokraćnog mjehura bili su obogaćeni u tkivu normalnog urotela naših uzoraka, tj. sniženi u UUC (Slika 30 a). Set gena povezanih sa skupinom mokraćnog mjehura karakteriziranom gradusom 2, čestim relapsima i multiplim tumorima ponovno su bili sniženi u UUC (Slika 30 b). Nadalje, geni koji su bili sniženi u G2 karcinomima mokraćnog mjehura, povezani s rjeđim multiplim tumorima i relapsima su bili sniženi u UUC (Slika 30 c). UUC je bio obogaćen genima povezanim s G3 karcinomom mjehura s čestim relapsima i čestom multifokalnošću (Slika 30 d). Drugi set diferencijalno eksprimiranih gena dobivenih analizom mRNA iz krvi bolesnika s različitim stadijima/gradusima karcinoma mokraćnog mjehura pokazao je značajno obogaćenje ovim genima u skupini gena povišene ekspresije u našim tumorima (UUC) što je prikazano na slici 30e.



Slika 30. GSEA analiza za različite skupine karcinoma mokraćnog mjehura

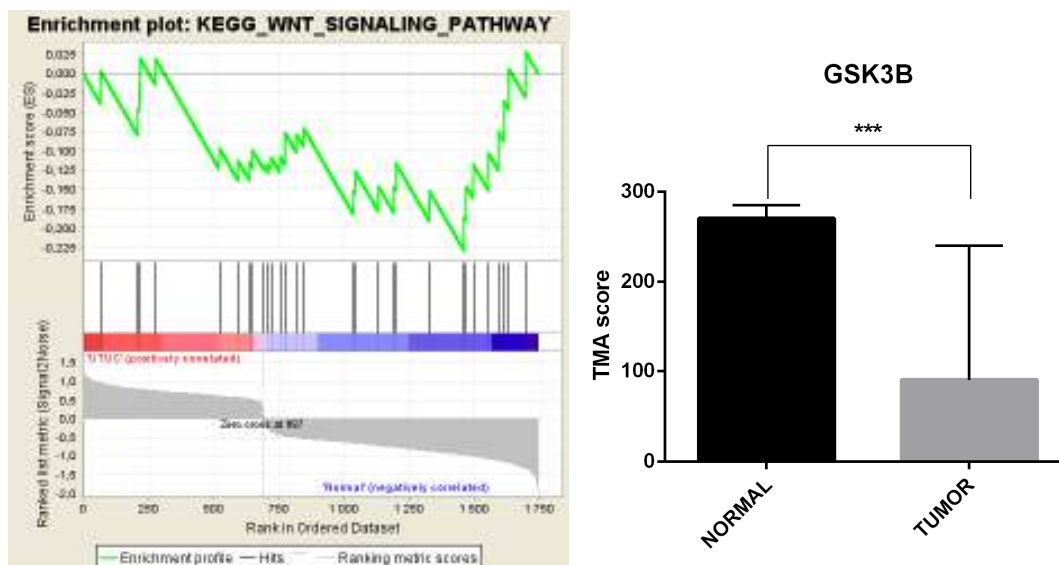
Konačno, analiza mikroRNA povezanih s karcinomom mokraćnog mjehura (prema Kegg putu) pokazala je da je miR-103, mikroRNA vezana uz papilarni Ta karcinom mokraćnog mjehura povišena u UUC. Nadalje, miR-99a, miR-100, miR-125, miR-145 i miR-143 koje su bile značajno snižene u UUC bile su također snižene u papilarnom Ta karcinomu mokraćnog mjehura. KRAS i FGFR3, geni dismodulirani u karcinomima mokraćnog mjehura bili su povišeni u uzorcima UUC. Mir-21 i miR-221, dvije mikroRNA za koje se zna da su često povišene u invazivnim karcinomima mokraćnog mjehura bile su također povišene u UUC. ATM je bio snižen, dok je gen MDM2 bio povišen u UUC.

5.11.7. RAZVOJNI PUTEVI: WNT, HEDGEHOG

WNT put je jedan od razvojnih puteva koji je često aktiviran u tumorima, dovodeći do progresije tumora promovirajući njegov rast, preživljenje tumorskih stanica i nastanak metastaza. Tri su WNT puta, od kojih je samo klasični (engl. *canonical*) povezan s karcinomima. Njegove glavne komponente uključuju Wnt liganda koji se veže za protein frizzled (FZD) i/ili proteine 5/6 vezane uz LDL receptor. Rezultat vezivanja liganda za receptor je prevencija fosforilacije β -katenina multiproteinskim kompleksom koji sačinjavaju APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK3B (*glycogen synthase kinase 3B*), CK1 (*casein kinase 1*) i grupa AXINa koji bi inače uzrokovali proteosomalnu degradaciju β -katenina. β -katenin se povezuje s transkripcijskim faktorom TCF/LEF (*cell factor/lymphocyte enhancer*) kako bi aktivirao ciljne gene. Wnt put je identificiran kao snižen u UUC. Značajno sniženi geni u UUC koji su dijelovi ovog puta uključivali su *WNT2b*, *WNT4*, *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD7*, *FZD10*, *AXIN* i *LEF*. Dodatno, *WIF1* (*WNT inhibitory factor 1*), *DKK2* (*dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*) i *SFRP*

(*secreted frizzled-related protein 1*) su također bili značajno sniženi u UUC. Među povišeno eksprimiranim genima u UUC bili su *GSK-3B*, *CSNK1E* (*casein kinase 1, epsilon*) i *CSNK2A1* (*casein kinase 2, alpha 1 polypeptide*). Razina β -katenina ostala je jednaka u tumorskom kao u normalnom tkivu.

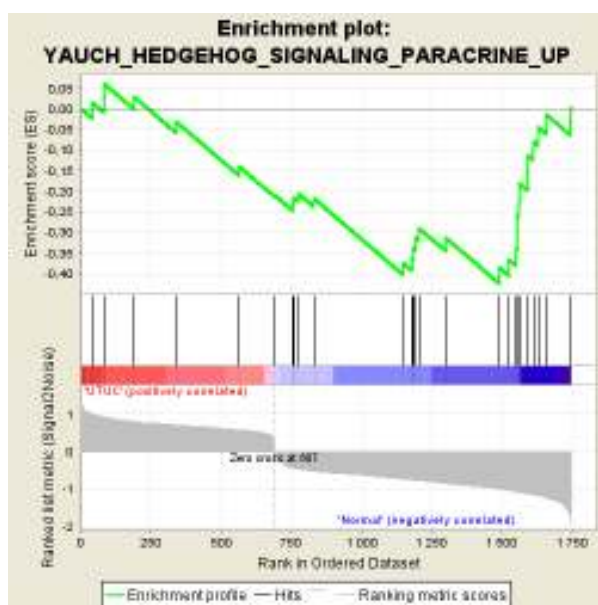
Identificirane su i značajno modulirane mikroRNA čije su ciljne molekule komponentne Wnt signalnog puta. Mir-25, miR-27a, miR-98, miR-101, miR-106b, miR-107, miR-135b i miR-194 bile su značajno povišene u UUC, a njihova ciljna molekula *FZD* gen snižen u UUC. MiR-9, miR-15b, miR-107, miR-301 and miR-642, povišene u UUC, za svoju ciljnu molekulu imali su snižene *WNT2b* and *WNT4*. *GSK3b* je ciljna molekula snižene miR-199a-5p. Dodatno *GSK3b* je ciljna molekula još jedne mikroRNA koja je bila povišena u UUC: miR-26b. Imunohistokemijskim bojenjem protein GSK3b bio je sniženo eksprimiran u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo, dok je kod gena bio obrnuti slučaj. Ovo je moguće rezultat translacijske represije (bez degradacije mRNA) posljedično djelovanju miR-26b. Snižena ekspresija Wnt puta u UUC također može doprinosti ne-metastatskom ponašanju ovih tumora.



Slika 31. GSEA analiza za signalni put Wnt (lijevo), ekspresija GSK3b proteina u normalnom i tumorskom tkivu (desno).

Hedgehog signalni put je još jedan razvojni put povezan s tumorima, dominantno uz rast tumora. Njegove glavne komponente su Hh proteini, koji služe kao ligandi za Ptch receptor (*patched receptor*) koji pak negativno reguliraju Smo protein (*smoothened protein*). Kad se Hh veže na Ptch dolazi do internalizacije Ptch u endosome čime prestaje represija posredovana s Ptch. Ovo omogućava Smo proteinu pomicanje iz unutarstaničnog dijela na površinu stanice rezultirajući u aktivaciji Smo proteina i prenošenju signala. Postoje dva homologna Ptch receptora, Ptch1 i Ptch2. Nizvodno od Smo proteina Hh signalni put aktivira ciljne gene preko Gli zincfinger obitelji transkripcijskih faktora (uključujući Gli1, Gli2, Gli3 i Gli4). Ptch1 je također ciljna molekula ovog puta, i tako formira negativni povratni mehanizam i održava put prikladno aktivnim u pojedinoj stanici. MiR-125b, 326, 324, 100, 361 i 136 su predložene kao inhibitori Hh puta. U UUC setu dismoduliranih gena *PTCH1* i *GLI2* su bili značajno sniženi u komparaciji s normalnim tkivom. Ova dva gena su klasični

prenositelji signala u Hh putu i posljedično tome dobro predstavljaju ovaj put, ukazujući da bi Hh signalni put mogao biti snižen u UUC. Dodatno, GSEA analiza identificirala je komponentne Hh puta među sniženo eksprimiranim UUC genima. MikroRNA koje su ciljale *PTCH1* bile su miR-101, miR-141, miR-15b, miR-183, miR-194, miR-203, miR-21, miR-27a, miR-429, miR-9 i miR-944. Značenje sniženo eksprimiranog Hh puta u UUC nije jasno, vjerojatno je riječ o homeostatskom putu koji postaje oštećen u tumoru.



Slika 32. GSEA analiza komponenti Hh signalnog puta

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju proveli smo studiju molekularnog profiliranja karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava na 13 bolesnika porijeklom iz endemskih krajeva Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Prema našim saznanjima ovo je prva humana studija profiliranja genske ekspresije u bolesnika s izloženosti AA i također prva studija profiliranja molekula mikroRNA na ovom tipu tumora.

Bolesnici koje smo uključili u istraživanje bili su starije životne dobi (medijan dobi 75) što je u skladu s podacima ranijih istraživanja.

Većina naših bolesnika bile su žene (10 žena: 3 muškarca). Iz literature je poznato da nema spolne razlike u javljanju UUC povezanih s AA (6). Broj osoba ženskog spola u našem istraživanju vjerojatno je slučajan zbog više mogućih razloga: bolesnici nisu randomizirani već su uključivani konsektivno, drugo moguće objašnjenje je da muškarci žive kraće od žena budući da češće umiru od kardiovaskularnih bolesti, a kako UUC zahvaćaju stariju populaciju ovo je moguće lažno pozitivan rezultat.

Neki od naših bolesnika imali su multifokalne tumore što je također u skladu s prethodnim saznanjima (6). Svi tumori analizirani u ovom istraživanju bili su papilarni, a varirali su u stadiju od Ta do T4 i gradusu G1-G3. UUC povezani s AA u bolesnika iz endemskih područja obično nisu agresivni i nižeg su gradusa, iako su opisani i tumori visokog gradusa (6). Tijekom 5-godišnjeg razdoblja praćenja 3 bolesnika je razvilo povrat bolesti što je u skladu s prethodnim podacima, naime poznato je za ovaj tip tumora da često rekurira, uglavnom u suprotni gornji dio urotrakta ili ponekad u mokraćni mjehur. Dvoje bolesnika razvilo je udaljene metastaze što je rijetko u UUC. Jedan od ovo dvoje bolesnika imao je i sekundarni tumor - adenokarcinom prostate. Uz ovog bolesnika još je jedan pacijent razvio sekundarni tumor, također adenokarcinom

prostate. Iako je karcinom prostate najčešći nekožni karcinom u muškaraca, sekundarni tumor u osobe koja je vjerojatno bila izložena AA bi bilo vrijedno analizirati i potražiti specifičnu mutaciju karakterističnu za AA: transverziju A:T budući da je nedavno pokazano da je AA uključena u karcinogenezu i drugih tipova tumora osim karcinoma prijelaznog epitela (73, 77).

Velika većina bolesnika (11 od 13) imala je određeni stupanj bubrežnog zatajenja i bili su u stadijima kronične bubrežne bolesti ≥ 3 . Histološki nalaz bubrega niti u jednog bolesnika nije otkrio znakove EN/AAN, a to je moguće iz više razloga: prvenstveno ovi bolesnici su stariji i imaju komorbiditete uključujući i arterijsku hipertenziju, nadalje opstrukcija uzrokovana tumorom također može dovesti do promijenjene histologije bubrega i pogoršanja funkcije, i na kraju UUC se može javiti potpuno neovisno o EN/AAN (65). Mokraćni alfa1-mikroglobulin je određen kod šestoro bolesnika od kojih je 3 imalo α -1MCR preko 15mg/g, što je jedan od dijagnostičkih kriterija za endemsku nefropatiju; ostali bolesnici su već bili u završnom stadiju bubrežnog zatajenja i anurični.

Većina bolesnika imala je određeni stupanj anemije, najčešće normocitnu anemiju posljedično kroničnoj bubrežnoj i malignoj bolesti.

Citologija urina bila je pozitivna kod svega 3 bolesnika. Citološka analiza urina u UUC je poznato manje osjetljiva nego za karcinome mokraćnog mjehura i varira od 20% za UUC gradusa 1, do 45% za G2 i 75% za UUC gradusa 3 (57). Ovo ukazuje na potrebu za pronalaženjem novog neinvazivnog biomarkera s boljom osjetljivošću i specifičnošću za UUC.

Dokaz izloženosti aristolohičnoj kiselini u ovom istraživanju temeljen je na 3 različita pristupa. Osim činjenice da su bolesnici bili porijeklom iz poznatih endemskih područja

(dvoje bolesnika iz šireg endemskog područja, ostali iz ranije definiranih endemskih sela), proveden je upitnik o mogućoj izloženosti biljci *Aristolochia clematitis*, određeni su AA-DNA adukti i analizirana potpisna mutacija (A-T transverzija) u genu *TP53*. Jedanaest bolesnika od ukupno 13 imalo je pozitivan barem jedan od ova tri kriterija. Upitnik je bio baziran na pretpostavci da je AA unošena preko kruha, tj. da se brašno onečišćeno sjemenkama *A.clematitis* koristilo za pekarske proizvode, prvenstveno kruh. Način unosa AA u EN bio je samo pretpostavka dulji vremenski period, do nedavno kada je iz brašna iz hrvatskog endemskog područja izolirana DNA *A. clematitis* (Jelaković i sur, neobjavljeni podaci). Svi uključeni bolesnici bavili su se poljoprivredom, imali vlastita polja i svi su osim jednog uzgajali žito. Svi su u prošlosti pekli domaći kruh. Deset bolesnika priznalo je da je viđalo biljku *A.clematitis* na svojim poljima ili su primijetili onečišćenje žita sjemenkama vučje stope.

AA-DNA adukti, markeri izloženosti AA, bili su pozitivni u korteksu 7 bolesnika. Za ostalih 5 razina adukata je bila ispod nivoa detekcije. Negativan nalaz u 5 bolesnika može se objasniti na nekoliko načina - moguće je da bolesnici zbilja nisu bili izloženi AA, druga mogućnost je da adukti ipak nisu prisutni tako dugo u bubrežnom korteksu, dok se kao treća opcija nameće mogućnost tehničke pogreške. Sumnjamo da je tehničko pitanje odgovorno za bar nekoliko bolesnika budući da je ³²P-postlabeling metoda manje osjetljiva od moćnije tekuće kromatografije/spektrometrije mase koja nije bila dostupna u vrijeme kada su naši uzorci analizirani (128).

Konačno, analiza mutacija gena *TP53* ukazala je na postojanje A-T transverzije u 3 bolesnika. Ova mutacija karakteristična je za AA i prema literaturi prisutna je u oko 70% slučajeva (14,129) što znači da ne mora nužno svaka izložena osoba s UUC imati mutaciju u genu *TP53*, nego druge komponente ovog puta također mogu biti mutirane.

Nadalje, danas se već zna da je potpisna mutacija prisutna širom genoma, a ne samo u ovom tumor supresor genu.

Dakle, u ovoj studiji svih 13 bolesnika je vrlo vjerojatno bilo izloženo AA, ali budući da ih 5 manjka ili pozitivan nalaz adukata ili potvrdu potpisnom mutacijom gena *TP53*, moglo bi se reći da ovdje djelujemo povrh etiologije ovih tumora i da dajemo uvid u molekularne procese generalizirane na UUC bilo koje etiologije. Ipak, pilot studijom koja je provedena na parnim uzorcima 3 bolesnika koji su imali pozitivne adukate i nalaz mutacije gena *TP 53* dobiveni su rezultati koji su kasnije ostali dosljedni i nakon dodavanja novih bolesnika, uključujući i one s divljim tipom gena *TP53* i bez detektiranih AA-DNA adukata. Ipak, ukoliko bi definitivno htjeli odrediti učinak AA na UUC trebalo bi učiniti dodatne analize koje bi uključivale: 1. tekuću kromatografiju/spektrometriju mase uzoraka DNA iz korteksa bolesnika kod kojih 32P-postlabeling metodom nisu detektirani adukti; 2. sekvenciranje cijelog transkriptoma/genoma ne bi li se detektirale A-T transverzije za koje se zna da su rasprostranjene širom genoma, a ne samo u *TP53*; 3. dodati kontrolnu neizloženu skupinu i komparirati rezultate neizloženih osoba s rezultatima ovog istraživanja. Ove dodatne analize nisu učinjene u sklopu ovog istraživanja zbog nedostupnosti metode i financijskih izazova, ali predstavljaju budući smjer u našem istraživanju.

Dva glavna cilja ovog istraživanja bila su identificirati obrazac genske ekspresije UUC u bolesnika iz endemskog područja i odrediti mehanizme posttranskripcijske regulacije genske ekspresije profiliranjem mikroRNA molekula; i na taj način odrediti karakteristike UUC u dobro definiranoj skupini bolesnika. Oba navedena cilja su ostvarena. Naime, proveli smo analizu genske ekspresije koristeći genske čipove (microarray - whole genome human Affymetrix GeneChips). Analizirani su mRNA

transkripti karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava svih 13 bolesnika, koristeći prilježne normalno tkivo kao kontrolni uzorak. Kao kontrolni uzorak nije korišten samo urotelni sloj, već cijeli zid uretera/pijelona, jer je bilo tehnički otežano izdvojiti samo sloj urotela, bez nanošenja štete tkivu. Ovo predstavlja jedno od tehničkih ograničenja ovog istraživanja. Međutim kasnijom analizom podataka kada su molekule rangirane na temelju tipa uzorka (normalno tkivo naspram tumorskog tkiva), uspjeli smo dobiti dobar uvid čime je obogaćen pojedini tip uzorka, a navedeni obrazac se pratio za sve podatke koji su ovdje prezentirani. U istraživanju nisu korišteni tehnički replikati nego biološki. Smatramo da je 13 parnih uzoraka prikladan broj uzoraka za ovo istraživanje, čemu u prilog ide podatak da su rezultati pilot studije učinjene na uzorcima 3 bolesnika ukazali na obrazac ekspresije gena i mikroRNA koji je ostao jednak nakon dodavanja novih uzoraka.

Analiza profiliranja genske ekspresije otkrila je UUC specifični potpis od 5438 značajno moduliranih transkripata, od kojih je 2021 bilo povišeno, a 3417 sniženo eksprimirano u UUC. Očekivali smo ovako veliki broj različito eksprimiranih gena, budući da je poznato da metode velike propusne moći poput analize na genskim čipovima rezultiraju ovako velikom količinom podataka. To je razlog zbog čega su razni bioinformatički pristupi i metode neophodni u razumijevanju ovakve vrste podataka. U ovom istraživanju primijenjena je analiza genske ontologije (GO) s ciljem globalne biološke interpretacije genske ekspresije u UUC. GO je sustav klasifikacije gena i genskih produkata u pojmove grupirane u 3 velike hijerarhijske skupine: molekularna funkcija, engl. "molecular function" (opisuje molekularu aktivnost gena), biološki proces, engl. "biological process" (opisuje biološki proces u kojem gen sudjeluje) i stanična komponenta, engl. "cellular component" (odnosi se na informaciju

za koji dio stanice ili ekstracelularnog prostora je vezana funkcija pojedinog gena) (130). Analiza genske ontologije je statistički pristup koji omogućava određivanje obogaćenja strukturnih i funkcionalnih pojmova među skupinama različito eksprimiranih gena s ciljem otkrivanja statistički značajne aktivnosti pojedine skupine gena u istraživanim uzorcima.

Globalna analiza svih podataka dobivenih analizom na genskim čipovima otkrila je kategorije značajno obogaćene u tumorima koje su uključivale napredovanje mitoze staničnog ciklusa, DNA replikaciju, odgovor na podražaj oštećenjem DNA, popravak DNA, aktivnost helikaze; kategorije povezane sa strukturom kromatina i metaboličkim procesima DNA: kromatin, DNA ovisna aktivnost ATP-aze, aktivnost metiltransferaze, vezivanje kromatina; zatim procese genske regulacije uključujući inicijaciju transkripcije promotorom RNA polimeraze II i aktivnost faktora translacije vezača nukleinskih kiselina (od engl. *translation factor activity nucleic acid binding*). Nadalje, identificirane su biološke kategorije sinteze i degradacije (engl. *turnover*) RNA i proteina uključujući obradu RNA, izrezivanja RNA, spliceosome, kataboličke procese proteina, kompleks ubikvitin ligaze. Imajući u vidu da se tumorske stanice neprestano dijele i umnažaju jasno je zbog čega su ove kategorije obogaćene u tumorskom tkivu. S druge strane kategorije snižene ekspresije u tumorskom tkivu uključile su signalne puteve WNT/ β -katenin, Hedgehog, vezanje FGFR liganda i aktivaciju i signalizaciju pomoću FGFR mutanata, signalizaciju pomoću Rho GTP-aza, kaskadu fosfatidilinozitol 3 kinaze (PIK3), kaskadu posredovanu fosfolipazom C, kalcijски signalni put, kategorije stvaranja kolagena, funkcije glatkih mišića i miogeneze. Posljednje kategorije odražavaju epitelijalni fenotip tumora, manje vjerojatno predstavljaju primjesu glatkomišićnog tkiva u kontrolnu skupinu.

Sljedeći korak u razumijevanju podataka uključio je ponavljanje prethodne analize, ali isključivo na skupini od 5438 značajno moduliranih gena. Analiza 2021 povišeno reguliranih transkripata otkrila je uključenost onkogenih i tumor supresorskih puteva uključujući aktivnost *MYC* onkogene, odgovor na oštećenje DNA temeljen na *ATM*, *TP53*, *CHEK2* i *RBI* potpisu, aktivnost *BRCA1* i *BRCA2* i kategoriju karcinoma mokraćnog mjehura. Biološki sadržaj baziran na 3417 sniženo moduliranim transkriptima uključivao je ciljne molekule proteina p63, ciljne gene utišavajućeg polikombinacijskog kompleksa *PRC2* označenog histon 3 lizin 27 trimetilazom, sniženje komponenti stanica-matriks i fokalne adhezije, kompleks s integrinom te sniženje čimbenika epitelijalno-mezenhimalne tranzicije.

Potom je uslijedilo profiliranje mikroRNA koristeći RT-qPCR uređaj. Profiliranje je učinjeno na 754 ljudske mikroRNA koje su bile poznate u vrijeme kad su eksperimenti provedeni. Danas je broj poznatih ljudskih mikroRNA narastao na više od 2500 zrelih miRNA sekvenci (94). MikroRNA profiliranje identificiralo je 138 UUC specifičnih dismoduliranih mikroRNA: 74 su bile značajno povišene, a 64 snižene u tumorskom tkivu. Ukupno, UUC su karakterizirani tumor specifičnom modulacijom koja uključuje otprilike 10% ukupne mRNA i 19% svih molekula mikroRNA.

Završni eksperimentalni dio studije bila je validacija podataka genske ekspresije imunohistokemijskim bojenjem. Ideja cijelog istraživanja je da su geni na posttranskripcijskoj razini regulirani djelovanjem mikroRNA, što znači da povišeno eksprimirane mikroRNA imaju za ciljne molekule mRNA transkripte. Spajanjem mikroRNA s mRNA po principu komplementarnosti dolazi do raspada mRNA, posljedično čemu se analizom genske ekspresije detektira niska razina ekspresije navedene mRNA, a kako nema daljnje translacije u proteine, na proteinskoj razini

također se detektira niska razina ekspresije. Imunohistokemijski ovi proteini ostaju neobojeni ili se boje slabije nego zdravi urotel. Suprotno, niske razine mikroRNA rezultiraju povišenom ekspresijom njihovih ciljnih gena, što znači da dolazi do povišenja ekspresije na mRNA razini i posljedično povišenoj razini proteina kodiranog navedenom mRNA što se imunohistokemijski vizualizira pojačanim obojenjem. Imunohistokemijsko bojenje željeli smo učiniti za više različitih proteina, koristeći više različitih protutijela, i vizualizirati ih što bolje, a pritom učiniti što manju štetu originalnim parafinskim kockama kako bi se mogle koristiti za buduća istraživanja. S tom idejom odlučili smo konstruirati tkivni *microarray* s po 3 cilindra po uzorku tkiva. Smatra se da je analiza 3 cilindra jednog uzorka tkiva jednakovrijedna analizi cijelog reza (114).

Dvije dodatne analize koje bi se mogle nastaviti na ovo istraživanje su in situ hibridizacija mikroRNA čime bi se validirala njihova ekspresija i odredila stanična lokalizacija. Druga analiza bilo bi proteomska analiza, tj profiliranje setova proteina različito eksprimiranih u tumoru.

Za napomenuti je da razvoj svakog tumora obuhvaća brojne poremećene procese/promjene na više različitih razina, osim same regulacije putem mikroRNA, poput primjerice dobivanja ili gubitka cijelog kromosoma, mutacije pojedinačnih nukleotida, utišavanja gena poremećenom metilacijom. Sve ove promjene utječu na rast tumora i definiraju njegova ostala obilježja.

Također je bitno spomenuti da mikroRNA funkcioniraju na dva načina, dovodeći do istog rezultata - mikroRNA mogu uzrokovati raspad komplementarne mRNA molekule što rezultira sniženom ekspresijom proteina kodiranog navedenom mRNA; dok je drugi način djelovanja mikroRNA represija translacije, pri čemu ekspresija mRNA ostaje na

ranijoj razini, ali je reducirana razina kodirajućeg gena. Ovo istraživanje fokusirano je na skupine mikroRNA koje su različito eksprimirane u tumoru u odnosu na zdravo tkivo i dovode do snižene razine mRNA (raspad mRNA) ili pak njihove povišene razine, drugim riječima proučavali smo inverzno korelirane setove mikroRNA:mRNA i pokušali objasniti njihov utjecaj na fenotip UUC.

Među različito eksprimiranim mikroRNA u UUC najviše rangirane su bile poznate tumorske mikroRNA poput miR-17-92 onkogenog skupine, anti-metastatske miR-200 obitelji, dok su od tumor supresorskih mikroRNA najznačajnije modulirane bile let-7c, miR-143/145 skupina i miR-23b. Skupina miR-17-92 sadržavala je miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92a, miR-25, miR-93, miR-106b, miR-182, miR-183, miR-20b, miR-106a, miR-21. Obitelj miR-200 bila je predstavljena s miR-200b, miR-200a, miR-429 (kromosom 1) i molekulama s kromosoma 12: miR-200c, miR-141. Iz literature je poznato da obitelj miR-17 dovodi do proliferacije stanica; miR-17-92 skupina s kromosoma 13 ima snažnu angiogenetsku aktivnost u tumoru, a moguće ju je aktivirati preko onkogeno Myc čime se pojačava rast tumorskih krvnih žila (131).

MiR-106b-25 skupina (miR-25, miR-93, miR-106b) ima ulogu u EMT uključenoj u fibrozu bubrega, točnije ove mikroRNA inhibiraju EMT. TGF β 2, regulator TGF- β signalizacije direktna je meta ovih mikroRNA (132). TGF β 2 je u našoj skupini dismoduliranih UUC gena bio snižen, i nije bilo EMT.

MiR-21 je poznata kao prometastatska miRNA, a njezina je ekspresija povišena u mnogim solidnim tumorima uključujući glioblastom, karcinom dojke, kolona, prostate i želuca. U navedenim tumorima uočeno je da miR-21 stimulira invaziju stanica i metastaze. MiR-21 ima antiapoptotske, proproliferativne i kemoprotekcijske učinke i povezana je s agresivnošću tumora. Njezina ciljna molekula je tropomiozin 1 (veže se

za aktin, stabilizira mikrofilamente, a kad je sniženo ekspimiran promovira transformaciju stanica i tumorske metastaze). Programirana stanična smrt 4 (PCDD4) i NFIB su također ciljni geni miR-21, ali oni također mogu i inhibirati miR-21. Ova mikroRNA regulirana je i od više drugih tumorskih gena povezanih s metastazama: TGF- β , EGF, BMP2, BMP4 koji potiču ekspresiju miR-21 posttranskripcijski. BMP6 inhibira ekspresiju miR-21 u karcinomu dojke represijom ZEB1 i AP-1. Drugi ciljni geni miR-21 uključuju PTEN, maspin, MARCKS, RECK, TIMP3 and SPRY2 (131). U našem setu UUC dismoduliranih gena sniženo ekspimirani su bili: TPM1, NFIB, PTEN, RECK and SPRY1.

MiR-182 je još jedna molekula povezna s metastazama, prvi put uočena u melanomu, a ciljni geni su joj Mitf (microphthalmia-associated transcription factor) i FOXO3 (forkhead box O3) (131). MITF se nalazi među sniženo reguliranim genima u našem setu.

MiR-183 je antimetastatska mikroRNA. Identificirana je kao negativan regulator metastaza karcinoma pluća. Jedan od ciljnih gena ove miRNA je Ezrin, čiji produkt ima ulogu u kontroli aktina citoskeletona, staničnih adhezija i pokretljivosti (131). U našem setu podataka sniženo ekspimirane bili su ciljni geni ove miRNA: ZEB2 i TCH1.

Članovi obitelji miR-200 poznati su po svojoj ulozi u posredovanju učinka TGF- β i ostalih regulatora EMT i u normalnim i malignim stanicama: vežu se direktno na mRNA koja kodira za Zeb1 i Zeb2, promovirajući njihovu degradaciju i blokirajući translaciju ovih proteina. TGF- β snižava ekspresiju miR-200 obitelji dovodeći do akumulacije Zeb-1 i Zeb-2, posljedične supresije E-kadherina i povećane pokretljivosti i invazivnosti stanica. Zeb1 i Zeb-2 također mogu suprimirati miR-200 obitelj (133).

ZEB1 i ZEB2, TGFBR2, HDAC4, PTEN, GLI2, PTCH1 bili su sniženo eksprimirani u našim uzorcima.

MiR-23 prema literaturi smanjuje migratornu aktivnost u hepatocelularnom karcinomu djelujući na urokinazni-tip plazminogen aktivator i c-MYC. Urokinazni-tip plazminogen aktivator kodira serinsku proteazu koja ima ulogu u degradaciji ekstracelularnog matriksa, čime olakšava tumorsku migraciju i proliferaciju (131). MYC je bio povišeno eksprimiran u našim UUC uzorcima.

MiR-143 transkripcijski regulira čimbenike bitne za staničnu invaziju poput MMP9 i VEGF. Regulirana je od strane NF- κ B kako bi uzrokovala represiju genske ekspresije FNDC3B (fibronectin type III domain containing 3B). KRAS, gen povezan s karcinomom mokraćnog mjehura koji ima više vezajućih mjesta za miR-143, bio je povišeno eksprimiran u UUC.

MiR-145 je antimetastatska miRNA čiji su ciljni geni c-myc i mucin1. Sniženo je regulirana u brojnim tumorima uključujući karcinom mokraćnog mjehura. Inibira stanični rast, invaziju i metastaze. (134).

Skupina 143/145 direkto suprimira protoonkogen plazminogen aktivator inhibitor-1 (PAI-1), enzim koji inhibira apoptozu *in vitro* i promovira angiogenezu i staničnu proliferaciju. U karcinomima mokraćnog mjehura ekspresija miR143/145 skupine obrnuto je vezana uz ekspresiju PAI-1 kroz spektar tumora od superficijalnih do invazivnih karcinoma mokraćnog mjehura. U podacima dobivenim na našim uzorcima miR-145 bila je jedna od najniže rangiranih sniženo eksprimiranih mikroRNA sa 77 genskih poveznica.

Let-7 obitelj obično inhibira i tumorogenezu i nastanak metastaza. Ciljni geni let-7 su RAS, MYC, HMGA-2, tj geni komponente RAS-MEK signalnog puta koji može

doprinijeti nastanku EMT. Dodatni put vezan uz nastanak metastaza reguliran s let-7 uključuje inhibitorni protein Raf kinaze (*Raf kinase inhibitory protein*) koji inhibira mitogenu aktivnost signalne kaskade protein kinaze i može smanjiti razinu transkripcije LIN28 putem Myc-a. Myc i Lin-28, oboje su mete let-7, i oboje mogu dovesti do represije let-7 formirajući autoregulatornu povratnu petlju (131). U našim uzorcima KRAS i MYC bili su povišeno eksprimirani.

Na temelju svih ovih podataka može se zaključiti da u karcinomima prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava vezanim uz izloženost AA ove nekodirajuće RNA imaju značajnu ulogu u promociji rasta tumor, dok su s druge strane dijelom odgovorne za ograničenu metastatsku aktivnost tumorskih stanica.

Kada se učini komparacija značajno dismoduliranih mikroRNA u našim uzorcima s rezultatima istraživanja Izquerida i suradnika (ekspresijsko profiliranje progredirajućih i neprogredirajućih UUC) uočava se da su sastavnice miR-200 obitelji i miR-17 obitelji povišeno eksprimirane u našim uzorcima, ali i u uzorcima neprogredirajućih UUC u navedenom istraživanju (98). U komparaciji sa studijom Zaravinsa i sur. koji su učinili profiliranje genske ekspresije UUC u komparaciji s bubrežnim korteksom nije nađeno korelacije s našim rezultatima (99). MiR-21, nekodirajuća RNA koja je bila povišeno eksprimirana u našem setu podataka bila je dominantno povišena u bubrežnom tkivu štakora koji su dobivali karcinogene doze AA (112, 113). Kada se promatraju mikroRNA uključene u dva puta nastanka karcinoma mokraćnog mjehura, može se uočiti da je 7 mikroRNA iz našeg seta podataka dismodulirano u istom smjeru kao i mikroRNA u putu FGFR3/RAS kinaze, a riječ je o: miR-99a, 100, 125, 145, 30a, 143 (snižene), mir-103 (povišena). Drugi put uključen u tumorogenezu mokraćnog mjehura i rezultira nastankom invazivnog karcinoma karakteriziran je između ostalog i

dismodulacijom brojnih mikroRNA, od kojih su u našem setu podataka u jednakom smjeru bile značajno promijenjene miR-30a, 125, 143 (snižene) i miR-21, miR-221 (povišene) (102). Iako su UUC povezani s AA/EN povijesno poznati kao neagresivni tumori i tumori nižeg gradusa i stadija, naši podaci nisu bili uniformni, već više mješavina tumora različitih gradusa i stadija. Teško je izvlačiti zaključke iz komparacije s podacima profiliranja mikroRNA u karcinoma mjehura i pokušati smjestiti UUC povezan s AA u jedan od dva "kalupa" poznata za karcinom mokraćnog mjehura, budući da naši rezultati pokazuju da su UUC povezani s AA obogaćeni dismoduliranim mikroRNA iz oba navedena puta tumorogeneze u mokraćnog mjehura. Dodatno, i p53 signalni put i regulacija prenošenja signala RAS proteina bili su među obogaćenim putevima u skupini povišeno reguliranih gena u naših UUC uzoraka. U skladu s ovim podacima jesu rezultati istraživanja provedenog od strane Gottarda i suradnika koji su učinili profiliranje mikroRNA karcinoma mokraćnog mjehura, i to kombinirajući u istoj skupini neinvazivne i invazivne tumore i usporedili ih s mikroRNA profilom normalne mukoze mokraćnog mjehura. Dobili su disregulaciju miR-17-5p, miR-26b, miR-101-1, miR-185, miR-203, miR-205 i miR-221, istih mikroRNA koje su bile deregulirane u naših UUC uzoraka (104). S druge strane Zaravinos i sur. nisu uspjeli naći razliku u mikroRNA ekspresiji između različitih tipova karcinoma mokraćnog mjehura, točnije neinvazivnog papilarnog tumora niskog stupnja i invazivnih tumora visokog gradusa. Potpis mikroRNA za karcinom mokraćnog mjehura koji su dobili uključio je sniženu ekspresiju miRs 10b, 19a, 125, 145, 221, 296-5p i 378 od kojih su miR-10b, 126 i 145 bile značajno snižene i u našoj studiji (110).

U potencijalnom nastavku ove studije moglo bi se uključiti još bolesnika, odnosno uzoraka UUC različitih stadija i gradusa.

Integracija rezultata dobivenih mRNA i mikroRNA profiliranjem koristeći alat TargetScan urodila je setom obrnuto koreliranih mikroRNA povezanih sa svojim nizvodnim ciljnim mRNA, točnije 45 povišeno eksprimiranih miRNA povezano je s 1159 sniženo izraženih mRNA i obratno: 44 sniženo eksprimirane miRNA povezane su s 703 povišeno izražena gena. Učinjena je i dodatna analiza koristeći program miRconnX koji je identificirao 25 povišeno i 14 sniženo eksprimiranih miRNA kao najviše rangirane dismodulirane mikroRNA. Obje od ovih grupa bile su obogaćene poznatim tumorskim mikroRNA (Slike 11 i 12). Daljnjom analizom inverzno koreliranih setova 45 i 44 dismoduliranih mikroRNA i njihovih nizvodnih meta koristeći program DAVID dobili smo visoko specifični uvid u pojedine procese uključene u biologiju UUC. Identificirane su iste kategorije kao i prilikom analize svih značajno dismoduliranih gena, a kategorije koje su se najviše izdvajale među setovima povišeno eksprimiranih gena i sniženo eksprimiranih mikroRNA uključivale su faze staničnog ciklusa i mitozu, a s druge strane procesi povezani sa sniženo eksprimiranim genima i njihovim povišeno moduliranim mikroRNA uključili su programe ekstracelularnog matriksa, stanične pokretljivosti i migracije, angiogeneze, diferencijacije u mezenhimalne stanice. Neke od ovih kategorija detaljno su analizirane, uključujući represiju EMT koja je jedna od karakteristika ovih UUC uzoraka. EMT je proces koji ima ulogu u invazivnosti i nastanku metastaza karcinoma; a postoji i u normalnim stanicama gdje mu je uloga u razvoju i zarastanju rana. Okarakteriziran je gubitkom površinskog E-kadherina, rezultirajući gubitkom homotipnih adhezija, gubitkom polarnosti baza-apeks i molekula ključnih u održanju čvrstih veza (engl. *tight junctions*) te povišenom ekspresijom vimentina, fibronektina i proteina S100. Na molekularnoj razini osim gubitka E-kadherina EMT je karakterizirana povišenom

ekspresijom nekolicine transkripcijskih represora E-kadherina: Zeb-1, Zeb-2, Twist, Snail, Slug. Različiti uzvodni signali povećavaju ekspresiju ovih represora E-kadherina na mRNA razini uključujući TGF- β /obitelj BMP: u normalnim epitelnim stanicama TGF- β paralelno potiče EMT snižavajući regulaciju E-kadherina i povisujući regulaciju Zeb-1, Zeb-1 i Snail te inhibira napredovanje staničnog ciklusa aktivirajući p16/Rb kontrolnu točku. Povišena ekspresija TGF- β puta je česta karakteristika progresije solidnih tumora. Mnogi upalni citokini (i njihova transkripcijska ciljna molekula NF κ B), kao i razvojni signalni putevi poput Sonic hedgehog, Notch i Wnt puta su također važni u regulaciji EMT. Članice miR-200 obitelji posreduju u učinku TGF- β i ostalih regulatora EMT i u normalnim i malignim epitelnim stanicama putem direktnog vezanja na mRNA koja kodira Zeb-1 i Zeb-2, promovirajući njihovu degradaciju i blokirajući translaciju. TGF- β regulira i snižava razinu miR-200 obitelji dovodeći do akumulacije Zeb-1 i Zeb-2, supresije ekspresije E-kadherina i izražene pokretljivosti i invazivnosti stanica. E-kadherin je također reguliran i od strane drugih mikroRNA uključujući miR-101 putem EZH2 i miR-9 (133). Naši podaci identificirali su u UUC snižen EMT, povišenu razinu antimetastatskih mikroRNA iz obitelji miR-200 kao i sniženu ekspresiju njihovih ciljnih gena ZEB1 i ZEB2, dok je razina E-kadherina ostala povišena u UUC. Razina ekspresije E-kadherina validirana je na razini proteina i potvrdila podatke dobivene molekularnim profiliranjem. Dodatno, TGF- β put je bio snižen u UUC, moguće posljedično uložiti miR-106b. Wnt i Hedgehog, dva razvojna puta koji imaju ulogu u razvoju EMT također su bili sniženi. Sumirano, ovi rezultati bi mogli objasniti nemetastatsko ponašanje UUC i perzistiranje epitelijalnog fenotipa stanica. Međutim, ove stanice rastu, proliferiraju i jednom kad tumorska masa postane dovoljno velika tumor može postati lokalno invazivan kao što se dogodilo u 11

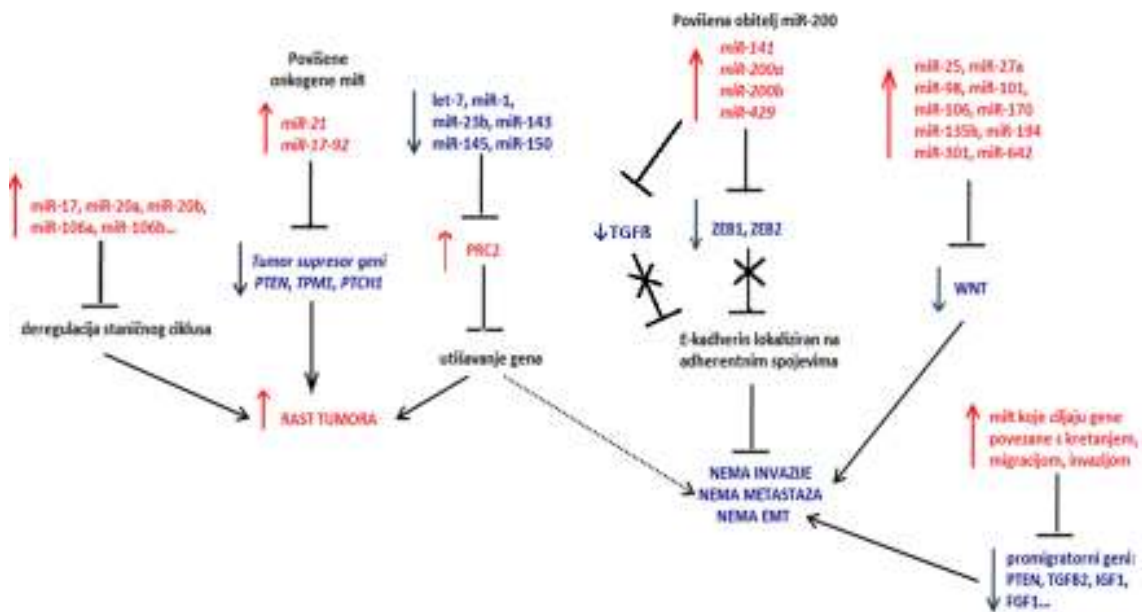
bolesnika u našem istraživanju. Dokaz za rast tumora i njegovu proliferaciju na molekularnoj razini jest identifikacija markera proliferacije Ki67 i na razini gena i proteina, kao i PCNA, također na obje razine. Također, kako je ranije spomenuto, sniženje TGF- β puta rezultira u napredovanju staničnog ciklusa budući nema njegove inhibicije od strane ovog signalnog puta, dovodeći do rasta tumora, ali budući da nema EMT ove stanice ostaju epitelne.

Brojni onkogeni i tumor supresor geni dismodulirani su u UUC. Onkogeni MYC, FGFR3, HRAS i KRAS te tumor supresori PTEN i PTCH1 u UUC modulirani su utjecajem sljedećih mikroRNA: miR-23b, miR-143, miR-145 (tumor supresorske) i miR-21, miR-18a, miR-9, miR-17-92 skupina (onkogene mikroRNA). MYC je predložen kao veza između ove dvije mRNA-miRNA onkogen-tumor supresorske mreže budući da djeluje kao aktivator miR-17, 20, 9 i inhibitor miR-23b i let-7c.

Osim supresije onkogenim mikroRNA neki tumor supresorski geni su moguće potisnuti i djelovanjem komponenti PRC2 (EZH2, EED, SUZ12, JARID2) koji dovode do utišavanja kromatina postavljanjem oznake H3K27me. Komponente PRC2 predstavljaju ciljne molekule mikroRNA koje su u UUC snižene: : let-7c, miR-1, miR-23b, 143, 145, 150. Osim PRC2, u UUC su identificirani brojni drugi povišeno eksprimirani geni s ulogom u održavanju strukture kromatina i njegovom remodeliranju, među kojima su bile brojne deacetilaze histona. Dodatno, identificirano je više efektor metilacije DNA koji su bili sniženo eksprimirani, a uključivali su DNA metiltransferazu DNMT3A, ciljnu molekulu miR-17-92 i miR-200 obitelji.

Zaključno, tumorogeneza karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava uključuje procese posredovane djelovanjem mikroRNA, točnije rast tumora posljedično aktivaciji onkogeni i represiji tumor supresor gena, potom utišavanje

kromatina i represiju prometastatskih programa i time održava ograničenu metastatsku sposobnost ovog tipa tumora.



Slika 33. Shematski prikaz utjecaja dismoduliranih miRNA i mRNA na karakteristike tumora

Ovo istraživanje dalo je specifični potpis različito eksprimiranih gena i mikroRNA u UUC povezanim s AA, te definiralo specifične programe vezane uz ovaj tip tumora. Predstavlja novu, kompleksnu, integriranu studiju. Koliko je do sada poznato ovo je prvo istraživanje ovog tipa dosad. Ipak, treba uzeti u obzir da je ovo deskriptivna studija, bazirana na predikcijama i inverznim korelacijama. Nadalje, promatrajući molekularne programe koji su ovdje identificirani ne može se sa sigurnošću zaključiti o etiologiji ili početnom okidaču koji je doveo do nastanka tumora. DNA/RNA sekvenciranje moglo bi dati širu i jasniju sliku. Detektiranje mutacija u dereguliranim genima bila bi važna i dodala bi još jedan nivo složenosti. Također, potencijalni dodatak

ovom istraživanju bila bi proteomska analiza. Međutim, i analiza mutacija i proteomika izvan su dosega ovog istraživanja. Dodatno potencijalno ograničenje ove studije je heterogenost skupine po stadiju i gradusu tumora. S druge strane najveća vrijednost ovog istraživanja je potencijal razvoja neinvazivnog biomarkera. Naime mikroRNA se otpuštaju u tjelesne tekućine poput krvi i urina, i kao takve ih je moguće detektirati. Ukoliko se pokaže da je dobre osjetljivosti i specifičnosti, ovakav neinvazivni biomarker bi mogao pomoći u dijagnosticiranju novih bolesnika s UUC i praćenju bolesnika kako bi se detektirao mogući povrat bolesti.

U zaključku, ovdje prikazani rezultati unatoč nekim ranije spomenutim ograničenjima pružaju vrijedne nove informacije koje potencijalno mogu uroditi razvojem važnog biomarkera.

7. ZAKLJUČCI

Koristeći analizu genske ekspresije i profiliranje mikroRNA na uzorcima karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (UUC) povezanih s izloženošću aristolohičnoj kiselini identificirali smo različito eksprimirane gene i mikroRNA u tumorskom u odnosu na zdravo priležeće tkivo. Diferencijalno eksprimirane mikroRNA potencijalno bi mogle biti korisne za konstrukciju neinvazivnog biomarkera za dijagnostiku ovog tipa tumora i sekundarni probir.

1. Identificirane su 5438 (2021 povišene, 3417 snižene) UUC specifične statistički značajno dismodulirane mRNA.
2. Identificirane su 138 (74 povišene, 64 snižene) UUC specifične značajno deregulirane mikroRNA.
3. Najviše rangirane različito eksprimirane mikroRNA uključuju poznate tumorske mikroRNA poput miR-200 obitelji, miR-17-92 obitelji, let-7c, miR-143/145 skupine i miR-23b.
4. Integracijom mRNA i mikroRNA podataka identificirani su inverzno korelirani setovi značajno dismoduliranih miRNA:mRNA koji uključuju 45 povišene miRNA i ciljne 1159 snižene mRNA te 44 snižene mikroRNA i ciljna 703 povišena gena.
5. Glavne dismodulirane kategorije povišene u tumorima uključile su: stanični ciklus, aktivnost onkogeno MYC, odgovor na oštećenje DNA, karcinom mokraćnog mjehura; dok su glavne snižene kategorije u tumorima uključivale ciljne gene PRC2 kompleksa označene s H3K27me3, redukciju komponenti stanica-matriks i fokalne adhezije, kompleks s integrinom i sniženu modulaciju čimbenika epitelijalno-mezenhimalne tranzicije, što je u skladu s manifestacijom i kliničkim tijekom ovog tipa tumora.

6. Podaci dobiveni molekularnih profiliranjem validirani su imunohistokemijskim bojenjem : proteini Ki67, H3K27me3, EZH2, SMAD3, ciklin D1, E-kadherin, PCNA, PTEN pokazali su ekspresiju u istom smjeru kao i njihove mRNA.
7. Dobiveni rezultati ukazuju da tumorigeneza UUC povezana s AA uključuje procese posredovane djelovanjem mikroRNA i posljedične regulacije njihovih ciljnih mRNA molekula rezultirajući tumorskim rastom i proliferacijom odnosno ograničenom invazivnošću i metastatskom sposobnošću ovog tipa tumora što je u skladu s kliničkim tijekom i manifestacijom ove bolesti.
8. Povišeno eksprimirane mikroRNA koje se otpuštaju u urin predstavljaju potencijal za razvoj biomarkera.

8. SAŽETAK

UVOD: Karcinomi prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (UUC) rijetki su u općoj populaciji, ali se javljaju u gotovo 50% bolesnika s endemskom nefropatijom (EN)/nefropatijom aristolohične kiseline (AAN). Aristolohična kiselina (AA) je potvrđena kao etiološki čimbenik za razvoj EN/AAN i UUC. Cilj ovog istraživanja jest odrediti obrasce genske ekspresije i mehanizme posttranskripcijske regulacije genske ekspresije uključene u karcinogenezu uzrokovanu s AA.

MATERIJAL I METODE: Analizirani su parni uzorci tumora i priležećeg normalnog tkiva od 13 bolesnika porijeklom iz hrvatskih i bosanskih endemskih područja. Profiliranje miRNA učinjeno je pomoću RT-qPCR uređaja, dok je analiza genske ekspresije učinjena na genskim čipovima. Imunohistokemijsko bojenje je učinjeno na tkivnim *microarrayima*. Integrirana analiza podataka učinjena je koristeći više bioinformatičkih programa.

REZULTATI: Identificirani su potpisi od 138 miRNA (74 povišene, 64 snižene) i 5438 (2021 povišene, 3417 snižene) značajno modulirane mRNA. Integrirajući mRNA i miRNA podatke, detektirano je 1159 inverzno koreliranih mRNA, ciljnih molekula od 45 povišenih miRNA te 703 inverzno korelirane mRNA, ciljne molekule od 44 snižene miRNA. Među najviše rangiranim dismoduliranim miRNA istaknule su se miR-200 obitelj, miR-17-92 skupina, let-7, miR-143/45 skupina i miR-23b. Opsežna biološka analiza integriranih mRNA i miRNA podataka identificirala je sljedeće značajne kategorije: stanični ciklus, odgovor na DNA oštećenje, popravak DNA, karcinom mokraćnog mjehura, deregulacija onkogeni, razvojni signalni putevi, remodeliranje strukture kromatina. Podaci dobiveni molekularnim profiliranjem potvrđeni su imunohistokemijski.

ZAKLJUČCI: Tumorigeneza UUC uključuje procese posredovane djelovanjem miRNA: rast tumora posljedično aktivaciji onkogeni i represiji tumor supresor gena, odnosno utišavanje kromatina i represiju prometastatskih programa uz posljedičnu ograničenu metastatsku sposobnost ovog tipa tumora, što je u skladu s fenotipom ovih tumora.

9. SUMMARY

Molecular profiling of the upper urinary tract transitional cell cancers associated with aristolochic acid nephropathy

Sandra Karanović, 2015.

INTRODUCTION: Upper urinary tract urothelial cancers (UUC) are rare in general population but occur in almost 50% of patients with endemic nephropathy (EN)/aristolochic acid nephropathy (AAN). Aristolochic acid (AA) was proven as the etiological factor both for EN/AAN and UUC. The goal of this study was to establish patterns of gene expression and posttranscriptional gene regulation mechanisms involved in AA induced carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS: Paired samples of tumors and adjacent normal urothelial tissues of 13 patients from Croatian and Bosnian endemic regions were analyzed. MiRNA profiling was performed by RT-qPCR, while mRNA expression profiling was done using microarray technology. Immunohistochemistry was performed on tissue microarrays. Integrative analysis of data was done using number of bioinformatical programs.

RESULTS: A signature of 138 miRNAs (74 up, 64 down) and 5438 (2021 up, 3417 down) significantly modulated mRNAs were identified. Integrating miRNA and mRNA data, 1159 predicted, inversely correlated targets of the 45 upregulated miRNAs and 703 predicted, inversely correlated targets of the 44 downregulated miRNAs were identified. Top ranked differentially expressed miRNA included miR-200 family, miR-17-92 cluster, let-7, miR-143/145 cluster, and miR-23b. Comprehensive biological interpretation and mining of the integrated miRNA:mRNA data set identified pathways of cell cycle, DNA damage response and DNA repair, bladder cancer, deregulated

oncogenic and developmental signaling pathways and remodeling of the chromatin structure. Molecular profiling data were validated by means of immunohistochemistry.

CONCLUSIONS: UUC tumorigenesis appears to involve primarily miRNA-mediated process of oncogenic activation of tumor growth and repression of tumor suppressor genes, and chromatin silencing and repression of pro-metastasis programs rendering the non-metastatic nature of these carcinomas, what is in line with phenotype of this specific type of tumor.

10. POPIS LITERATURE

1. Đukanović L, Radovanović Z: Balkan endemic nephropathy. U: De Broe ME, Porter GA, Bennett WM, Verpooten GA, ur. Clinical Nephrotoxins, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2003 , str.587 –601.
2. Pichler O, Bobinac E, Miljuš B, Sindik A. Growing occurrence of kidney injuries in the district of Slavonski Brod. Liječ Vjesn 1959;81:295-306.
3. WHO: The "Endemic Nephropathy" of South-Eastern Europe, Bull World Health Organ 1965;32:441-448.
4. Grollman AP, Jelaković B. Role of Environmental Toxins in Endemic (Balkan) Nephropathy. J Am Soc Nephrol 2007;18: 2817-2823.
5. Miletić-Medved M. Prevalence of endemic nephropathy and urothelial cancers in Croatia. Coll Antropol 2006; 30 Suppl 1:43.
6. Čeović S, Miletić Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. Endemic nephropathy in Croatia, Zagreb: Academia Croatica scientiarum medicarum; 1996, str. 7-23.
7. Imamović G, Trnančević S, Mesić E, Stipančić Ž. Endemic (Balkan) nephropathy in Bosnia and Herzegovina: current status. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:41.
8. Bukvić D, Marić I, Arsenović A, Janković S, Djukanović L. Prevalence of Balkan endemic nephropathy has not changed since 1971 in the Kolubara region in Serbia. Kidney Blood Press Res 2007; 30 Suppl2:117-123.
9. Cvitković A, Vuković Lela I, Edwards K i sur. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades. Kidney Blood Press Res 2011;35:147-152.
10. Ivić M: The problem of etiology of endemic nephropathy. Liječ Vjes 1969;91: 1278 –1281.
11. Dumić A: Horse poisoning by "wolf's foot" (Aristolochia clematitis L.) Belgrade, Serbia, Vojno-tehnički glasnik,1954 , pp 3 –35.
12. Hranjec T, Kovač A, Kos J i sur: Endemic nephropathy: The case for chronic poisoning by Aristolochia.Croat Med J 2005; 46 : 116 –125.

13. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M i sur: Aristolochic acid and the etiology of (Balkan) endemic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104 : 12129 – 12134.
14. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I i sur. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney International* 2012;81:559-567.
15. Nikolić J. Uzrok endemske nefropatije i tumora gornjeg epitela, 1.izd.Beograd:Srpsko lekarsko društvo; 2012, str.169-176.
16. Schmeiser HH, Kucab JE, Arlt VM i sur. Evidence of exposure to aristolochic acid in patients with urothelial cancer from a Balkan endemic nephropathy region of Romania. *Environ Mol Mutagen.* 2012;53:636-641.
17. De Broe ME. Balkan endemic nephropathy. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Accessed on March 5, 2015.),
18. Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z i sur. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy *Nephrol Dial Transplant.* 2014; 29: 2020-2027 .
19. Vukelić M, Šoštrić B, Belicza M. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Fd Chem Toxic* 1992; 30: 193–200.
20. Ferluga D, Hvala A, Vizjak A i sur. Renal function, protein excretion, and pathology of Balkan endemic nephropathy. III. Light and electron microscopic studies. *Kidney Int* 1991; 40Suppl 34: 57–67.
21. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C i sur. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341: 387–391.
22. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P i sur. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994; 343: 174.
23. Nortier JL, Muniz Martinez MC, Schmeiser HH i sur. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000; 342: 1686–1692.
24. Debelle, FD, Vanherweghem, JL, Nortier, JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int.* 2008; 74: 158–169.

25. Cosyns JP, Dehoux JP, Guiot Y i sur. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney Int* 2001; 59: 2164–2173.
26. Debelle FD, Nortier JL, de Prez EG i sur. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 431–436.
27. Vanherweghem JL, Debelle FD, Muniz-Martinez MC i sur. Aristolochic acid nephropathy after Chinese herbal remedies. U: De Broe ME, Porter GA, Bennett WM, Verpooten GA, ur. *Clinical Nephrotoxins*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2003, str. 579–586.
28. Krumme B, Endmeir R, Vanhaelen M i sur. Reversible Fanconi syndrome after ingestion of a Chinese herbal ‘remedy’ containing aristolochic acid. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 400–402.
29. Yang L, Li X, Wang H. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 445–456.
30. Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houte K i sur. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 172–180.
31. Debelle FD, Nortier JL, Husson CP i sur. The renin-angiotensin system blockade does not prevent renal interstitial fibrosis induced by aristolochic acids. *Kidney Int.* 2004;66:1815-1825.
32. Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD i sur. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2008;73:595-607.
33. Zhou L, Fu P, Huang XR i sur. Activation of p53 promotes renal injury in acute aristolochic acid nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:31-41.
34. Vanherweghem JL, Abramowicz D, Tielemans C i sur. Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese herbs nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1996;27:209-215.
35. Lemy A, Wissing KM, Rorive S i sur. Late onset of bladder urothelial carcinoma after renal transplantation for end-stage aristolochic acid

- nephropathy: a case series with 15-year follow-up. *Am J Kidney Dis* 2008;51: 471–477.
36. Nortier JL, Schmeiser HH, Muniz Martinez MC i sur. Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 426–428.
 37. Roupret M, Zigeuner R, Palou J i sur. European guidelines for the diagnosis and management of upper urinary tract urothelial cell carcinomas: 2011 update. *Eur Urol* 2011;59:584–594.
 38. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–29.
 39. Cosentino M, Palou J, Gaya JM i sur. Upper urinary tract urothelial cell carcinoma: location as a predictive factor for concomitant bladder carcinoma. *World J Urol* 2013;31:141–145.
 40. Xylinas E, Rink M, Margulis V i sur. Multifocal carcinoma in situ of the upper tract is associated with high risk of bladder cancer recurrence. *Eur Urol* 2012;61:1069–1070.
 41. Li W-M, Shen J-T, Li C-C i sur. Oncologic outcomes following three different approaches to the distal ureter and bladder cuff in nephroureterectomy for primary upper urinary tract urothelial carcinoma. *Eur Urol* 2010;57:963–969.
 42. Rabbani F, Perrotti M, Russo P, Herr HW: Upper-tract tumors after the initial diagnosis of bladder cancer: Argument for long-term surveillance. *J Clin Oncol* 2001; 19:94-100.
 43. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R i sur. EAU guidelines on nonmuscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011update. *Eur Urol* 2011;59:997–1008.
 44. Shariat SF, Favaretto RL, Gupta A i sur. Gender differences in radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol* 2011;29:481–486.
 45. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wings PA: Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7-33.

46. Roupret M, Yates DR, Compe'rat E, Cussenot O. Upper urinary tract urothelial cell carcinomas and other urological malignancies involved in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) tumor spectrum. *Eur Urol* 2008;54:1226–1236.
47. Colin P, Koenig P, Ouzzane A i sur. Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int* 2009;104:1436–1440.
48. Roupret M, Drouin SJ, Cancel-Tassin G i sur. Genetic variability in 8q24 confers susceptibility to urothelial carcinoma of the upper urinary tract and is linked with patterns of disease aggressiveness at diagnosis. *J Urol* 2012;187:424–8.
49. Ouzzane A, Ghoneim TP, Udo K i sur. Small cell carcinoma of the upper urinary tract (UUT-SCC): report of a rare entity and systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2011;37:366–372.
50. Perez-Montiel D, Wakely PE, Hes O i sur. High-grade urothelial carcinoma of the renal pelvis: clinicopathologic study of 108 cases with emphasis on unusual morphologic variants. *Mod Pathol* 2006;19:494–503.
51. Roscigno M, Cozzarini C, Bertini R i sur. Prognostic value of lymph node dissection in patients with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Eur Urol* 2008; 53:794-802.
52. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C, ur.. TNM classification of malignant tumours. Urological tumours, renal pelvis and ureter. 7.izd. New York, NY: Wiley-Blackwell; 2009. str. 258–61.
53. Sauter G, Algaba F, Amin M i sur. Tumors of the urinary system. U: World Health Organisation classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004. str. 110–123.
54. Williams RD: Renal, perirenal, and ureteral neoplasms. U: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW, ur. *Adult and Pediatric Urology*. St. Louis: Mosby–Year Book; 1991.
55. Elalouf V, Klap J, Delongchamps NB i sur Prognostic factors of upper tract urothelial carcinoma. *Prog Urol*. 2013; 23:1382-1388.

56. Raabe NK, Fossa SD, Bjerkehagen B: Carcinoma of the renal pelvis. *Scand J Urol Nephrol* 1992; 26:357-361.
57. Konety BR, Getzenberg RH: Urine based markers of urologic malignancy. *J Urol* 2001; 165:600-611.
58. Jinzaki M, Matsumoto K, Kikuchi E i sur. Comparison of CT urography and excretory urography in the detection and localization of urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *AJR Am J Roentgenol* 2011;196:1102–1109.
59. Takahashi N, Glockner JF, Hartman RPi sur. Gadolinium enhanced magnetic resonance urography for upper urinary tract malignancy. *J Urol* 2010;183:1330–1365.
60. Roupret M, Babjuk M, Comperat E i sur. European Guidelines on Upper Tract Urothelial Carcinomas:2013 Update. *Eur Urol.* 2013; 63: 1059 – 1071.
61. Margulis V, Shariat SF, Matin SF i sur. Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer* 2009;115:1224–1233.
62. Vassilakopoulou M, de la Motte Rouge T, Colin P i sur. Outcomes after adjuvant chemotherapy in the treatment of high-risk urothelial carcinoma of the upper urinary tract (UUT-UC): results from a large multicenter collaborative study. *Cancer* 2011;117:5500–5508.
63. Czito B, Zietman A, Kaufman D i sur. Adjuvant radiotherapy with and without concurrent chemotherapy for locally advanced transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *J Urol* 2004; 172:1271–1275.
64. Miletić-Medved M, Domijan AM, Peraica M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117:604-609.
65. Karanović S, Lela IV, Jelaković B i sur. Variation in presentation and presence of DNA adducts and p53 mutations in patients with endemic nephropathy--an environmental form of the aristolochic acid nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* 2013. 37:1-8
66. Bašić-Jukić N, Hršak-Puljić I, Kes P i sur. Renal Transplantation in Patients With Balkan Endemic Nephropathy. *Transplant Proc* 2007; 39: 1432 - 1435.

67. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2012; 100: 1–401.
68. Dickman KG, Sweet DH, Bonala R, Ray T, Wu A. Physiological and molecular characterization of aristolochic acid transport by the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338:588-597.
69. Stiborová M, Frei E, Arlt VM i sur. Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutat Res.* 2008;658:55-67.
70. Lord GM, Hollstein M, Arlt VM i sur. DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: e11–e17.
71. Moryia M, Slade N, Brdar B i sur, TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *Int J Cancer.* 2011;129:1532-1536.
72. Hoang ML, Chen C-H, Sidorenko VS i sur. Mutational Signature of Aristolochic Acid Exposure as Revealed by Whole-Exome Sequencing. *Science translational medicine.* 2013;5:197ra102.
73. Poon SL, Pang ST, McPherson JR i sur. Genome-Wide Mutational Signatures of Aristolochic Acid and Its Application as a Screening Tool. *Sci Transl Med* 2013;5:197ra101.
74. Huang J, Deng Q, Wang Q i sur. Exome sequencing of hepatitis B virus–associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44:1117-1121.
75. Kan Z, Zheng H, Liu X i sur. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res.* 2013; 23: 1422-1433.
76. Zou S, Li J, Zhou H i sur. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun.* 2014;5:5696.
77. Jelaković B, Castells X, Tomić K i sur. Renal cell carcinomas of chronic kidney disease patients harbor the mutational signature of carcinogenic aristolochic acid. *Int J Cancer,* 2015;136:2967-2972.
78. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P i sur. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucl. Acids Res.* 2014; 43: D805-811.

79. Pozdzik AA, Salmon IJ, DeBelle FD i sur. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2007; 73:595- 607.
80. Zhou L, Fu P, Huang XR, Liu F i sur. Activation of p53 promotes renal injury in acute aristolochic acid nephropathy. *Am Soc Nephrol.* 2010;21:31-41.
81. Tefferi A, Bolander ME, Ansell SM i sur. Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc.* 2002;77:927-940.
82. Zhang ZF, Pang ST, Kasper KA i sur. FXYD3: A promising biomarker for urothelial carcinoma. *Biomarker Insights* 2011;6:17-26.
83. Zhang ZF, Furge KA, Yang XJ i sur. Comparative gene expression profiling analysis of urothelial carcinoma of the renal pelvis and bladder. *BMC Medical Genomic* 2010;3:e58.
84. Qian CN, Furge KA, Knol J i sur. Activation of the PI3K/AKT Pathway Induces Urothelial Carcinoma of the Renal Pelvis: Identification in Human Tumors and Confirmation in Animal Models. *Cancer Res.* 2009;69:8256-8264.
85. Wu S, Chen J, Dong P i sur. Global gene expression profiling identifies ALDH2, CCNE1 and SMAD3 as potential prognostic markers in upper tract urothelial carcinoma. *BMC Cancer.*2014;14:836-845.
86. Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S i sur. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res.* 2010;70:3463-3472.
87. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano J i sur. Defining Molecular Profiles of Poor Outcome in Patients With Invasive Bladder Cancer Using Oligonucleotide Microarrays. *J Clin Oncol.* 2006;24:778-789.
88. Riestler M, Taylor JM, Feifer A i sur. Combination of a novel gene expression signature with a clinical nomogram improves the prediction of survival in high-risk bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:1323-1333.
89. Chen T, Guo L, Zhang L i sur. Gene expression profiles distinguish the carcinogenic effects of aristolochic acid in target (kidney) and non-target (liver) tissue. *BMC Bioinformatics.*2006;7Suppl 2:S20.

90. Arlt V, Zuo J, Trenz K i sur. Gene expression changes induced by the human carcinogen aristolochic acid I in renal and hepatic tissue of mice. *Int J Cancer*. 2011;128:21-32.
91. Li Z, Qin T, Wang K i sur. Integrated microRNA, mRNA, and protein expression profiling reveals microRNA regulatory network in rat kidney treated with a carcinogenic dose of aristolochic acid. *BMC Genomics* 2015; 16:365-380.
92. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116: 281–297.
93. Ruvkin, G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001;294: 797–799.
94. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39:D152–D157.
95. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6: 259-269.
96. Jeffrey SS. Cancer biomarker profiling with microRNAs. *Nat Biotechnol* 2008;26: 400-401.
97. Jenkins RH, Davies LC, Taylor PR i sur. miR-192 induces G2/M growth arrest in aristolochic acid nephropathy. *Am J Pathol* 2014; 184: 996-1009.
98. Izquierdo L, Ingelmo-Torres M, Mallofré C i sur. Prognostic value of microRNA expression pattern in upper tract urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2014;113:813-821.
99. Zaravinos A, Lambrou GI, Mourmouras N i sur. New miRNA Profiles Accurately Distinguish Renal Cell Carcinomas and Upper Tract Urothelial Carcinomas from the Normal Kidney. *PLoS ONE* 2014;9: e91646.
100. Yoshino H, Seki N, Itesako T i sur. Aberrant expression of microRNAs in bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2013;10:396-404.
101. Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. 2006;27:361-373.
102. Zabolotneva AA, Zhavoronkov A, Garazha AV i sur. Characteristic patterns of microRNA expression in human bladder cancer. *Front Genet*. 2013;3:310-314.

103. Catto JW, Miah S, Owen HC i sur. Distinct microRNA alterations characterize high and low grade bladder cancer. *Cancer Res* 2009;69:8472-8481.
104. Gottardo F, Liu CG, Ferracin M i sur. MicroRNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007;25:387-392
105. Baffa R, Fassan M, Volinia S i sur. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol* 2009; 219:214-221.
106. Veerla S, Lindgren D, Kvist A i sur. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer* 2009; 124: 2236-2242.
107. Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Kenney PA i sur. A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urol Oncol* 2011;29:794-801.
108. Han Y, Chen J, Zhao X i sur. MicroRNA Expression Signatures of Bladder Cancer Revealed by Deep Sequencing. *PLos One* 2011; 6:e18286.
109. Lee H, Jun SY, Lee YS i sur. Expression of miRNAs and ZEB1 and ZEB2 correlates with histopathological grade in papillary urothelial tumors of the urinary bladder. *Virchows Arch* 2014;464:213-220.
110. Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou GI i sur. Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer. *J Urol* 2012;188:615-623.
111. Yamada Y, Enokida H, Kojima S i sur. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011;102:522-529.
112. Meng F, Li Z, Yan J i sur. Tissue-specific microRNA responses in rats treated with mutagenic and carcinogenic doses of aristolochic acid. *Mutagenesis* 2014;29:357-365.
113. Li Z, Qin T, Wang K i sur. Integrated microRNA, mRNA, and protein expression profiling reveals microRNA regulatory network in rat kidney

- treated with a carcinogenic dose of aristolochic acid. *BMC Genomics* 2015; 16:365-380.
114. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: Opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001; 81: 1331–1338.
 115. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; 80: 1943–1949.
 116. Saxena R, Badve S. Chapter 7: Tissue Microarray —Construction and Quality Assurance, U: Kumar G.L. and Rudbeck L., *IHC Staining Methods*, Fif th Edition, Dako; 2009: str. 47-50.
 117. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB i sur. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med* 1999;130:461-470.
 118. National Kidney Foundation K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-S266.
 119. Pitera R, Pitera JE, Mufti GJ i sur. Modification of standard proteinase K/phenol method for extraction of DNA from small tumor biopsies. *Pathol Res Pract* 1993;189:882-887.
 120. GO Consortium. The gene ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D322-D326.
 121. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acid Res* 2002; 28:27-30.
 122. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc* 2009;4:44-57.
 123. Huang DW, Sherman BT,, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tool: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009;37:3-13.
 124. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK i sur. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15545-15550.

125. Parsons M, Grabsch H. How to make tissue microarrays. *Diagn Histopathol* 2009; 15:142-150.
126. Huang GT, Athanassiou C, Benos PV. mirConnX: condition-specific mRNA-microRNA network integrator. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: W416–W423.
127. Wang W, Goswami S, Lapidus K i sur. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* 2004;64:8585–8589.
128. Yun BH, Rosenquist TA, Sidorenko V i sur. Biomonitoring of Aristolactam-DNA Adducts in Human Tissues using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Ion-Trap Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1119–1131.
129. Moriya M, Slade N, Brdar B i sur. TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *Int J Cancer* 2011;129:1532-1536.
130. Ashburner M, Ball CA, Blake JA i sur. Gene ontology: tool for the unification of biology *Nat Genet* 2000; 25:25-29.
131. Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene* 2010; 29:937-948.
132. Tang Q, Zhong H, Xie F i sur. Expression of miR-106b-25 induced by by salvanolic acid B inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in HK-2 cells. *Eur J Pharmacol* 2014;741:97-103.
133. McConkey DJ, Choi W, Marquis L i sur. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28:335-344.
134. Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med* 2011; 89:445-457.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 09. 10. 1983. godine u Splitu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature u splitskoj gimnaziji „Marko Marulić“ 2002. godine, upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje sam i diplomirala 2008. godine.

Obvezni pripravnički staž obavila sam u Kliničkom bolničkom centru Zagreb 2009. godine i potom položila državni ispit.

Od studenog 2009. godine radim kao znanstveni novak – asistent Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na istraživačkom projektu prof. dr. sc. Bojana Jelakovića, gdje sam iste godine upisala znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“. U 12. mjesecu 2011. godine započela sam specijalizaciju iz nefrologije.

Tijekom 2011. godine boravila sam u Centru za genomsku tehnologiju na Langone medicinskom centru Sveučilišta u New Yorku, gdje sam se educirala i bavila istraživačkim radom iz područja genomike tumora pod vodstvom dr. sc. Jirija Zavadila, što sam nastavila 2013. u Lyonu u Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC).

Dobitnica sam potpore fonda Jedinstvo uz pomoć znanja 2011. te nagrade Europskog društva za hipertenziju „Jiri Widimsky, sr.“ za najboljeg mladog znanstvenika 2012. godine.

Autor sam ili koautor ukupno 15 znanstvenih i stručnih radova od kojih je 13 publicirano u časopisima citiranim u Current Contentsu te jednog poglavlja u knjizi.

Članica sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskog društva za hipertenziju, Hrvatskog društva za istraživanje raka i Društva za razvitak nefrologije "Prof.dr.Milovan Radonić".

12. PRILOZI

12.1. POPIS NAZIVA GENA I PROTEINA SPOMENUTIH U TEKSTU

SIMBOL	NAZIV/OPIS
ABI1	abl-interactor 1
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
ACTB	Actin, Beta
ACVR1B	activin A receptor, type IB
AEBP1	AE Binding Protein 1
AFF3	AF4/FMR2 family, member 3
AKR1	Aldo-Keto Reductase Family 1
ALDH2	Aldehyde Dehydrogenase 2 Family (Mitochondrial)
ANK3	Ankyrin 3, Node Of Ranvier (Ankyrin G)
AP1	activator protein 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APOBEC3B	Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-Like 3B
ASXL1	additional sex combs like 1
ATDC	ataxia-telangiectasia group D complementing gene
ATF3	Activating Transcription Factor 3
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATXN10	Ataxin 10
AXIN	AXIN
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP6	Bone Morphogenetic Protein 6
BMP7	Bone Morphogenetic Protein 7
BRCA1	breast cancer 1, early onset
BRCA2	breast cancer 2, early onset
Brg1	ATP-dependent helicase SMARCA4
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta
CASC5	cancer susceptibility candidate 5
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2
CBFB	core-binding factor, beta subunit

CCL5	Chemokine (C-C Motif) Ligand 5
CCND1	cyclin D1
CCND2	cyclin D2
CCNE1	Cyclin E1
CD54	Cluster of Differentiation 54, also known as: Intercellular Adhesion Molecule 1
CDC25A	Cell Division Cycle 25A
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (P21, Cip1)
CHAF1A	Chromatin Assembly Factor 1, Subunit A (P150)
CHAF1B	Chromatin Assembly Factor 1, Subunit B (P60)
CHCHD7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
CK1	Casein kinase 1
CLINT1	Clathrin Interactor 1
c-Myc	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
COL11A1	Collagen, Type XI, Alpha 1
COL16A1	Collagen, Type XVI, Alpha 1
COL1A1	collagen, type I, alpha 1
COL1A2	Collagen, Type I, Alpha 2
COL3A1	Collagen, Type III, Alpha 1
COL5A2	Collagen, Type V, Alpha 2
COL6A3	Collagen, Type VI, Alpha 3
CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2
CSNK1E	Casein Kinase 1, Epsilon
CSNK2A1	Casein Kinase 2, Alpha 1 Polypeptide
DGCR2	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 2
DKK2	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 2
DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
E2F3	E2F Transcription Factor 3
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGF	Epidermal Growth Factor
ELF4	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)
ELN	elastin
ENAH	Enabled Homolog
ENDOD1	Endonuclease Domain Containing 1
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
ERRFI1	ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1

ETV4	ets variant 4
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FADD	Fas (TNFRSF6)-Associated Via Death Domain
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FBN1	Fibrillin 1
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
FLNA	Filamin A, Alpha
FN1	Fibronectin 1
FNBP1	formin binding protein 1
FNDC3B	Fibronectin Type III Domain Containing 3B
FOXO3	Forkhead Box O3
FOXP1	forkhead box P1
FSCN1	Fascin Actin-Bundling Protein 1
FXYD3	FXYD Domain Containing Ion Transport Regulator 3
FZD	Frizzled Class Receptor
FZD1	Frizzled Class Receptor 10
FZD10	Frizzled Class Receptor 10
FZD2	Frizzled Class Receptor 2
FZD4	Frizzled Class Receptor 4
FZD7	Frizzled Class Receptor 7
GAS1	Growth Arrest-Specific 1
GAS7	growth arrest-specific 7
GLI1	GLI Family Zinc Finger 1
GLI2	GLI Family Zinc Finger 2
GLI3	GLI Family Zinc Finger 3
GLI4	GLI Family Zinc Finger 4
GMPS	guanine monphosphate synthetase
GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide
GOPC	golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing
GSK3B	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
H3K27me3	<i>histon 3 lizin 27 trimetilaza</i>
HCLS1	Hematopoietic Cell-Specific Lyn Substrate 1
HDAC1	Histone Deacetylase 1
HDAC10	Histone Deacetylase 10
HDAC2	Histone Deacetylase 2
HDAC4	Histone Deacetylase 4

HDAC8	Histone Deacetylase 8
Hh	Hedgehog
HIP1	huntingtin interacting protein 1
HLF	hepatic leukemia factor
HMGA1	hypothetical LOC100130009; high mobility group AT-hook 1
HMGA-2	High Mobility Group AT-Hook 2
HOXA11	homeobox A11
HOXC13	homeobox C13
HOXD11	homeobox D11
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
IL6ST	interleukin 6 signal transducer
INHBA	Inhibin, Beta A
JARID2	Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2
JAZF1	JAZF zinc finger 1
JUN	jun oncogene
JUNB	Jun B Proto-Oncogene
KDM1A	Lysine (K)-Specific Demethylase 1A
KDM3A	Lysine (K)-Specific Demethylase 3A
KDM4B	Lysine (K)-Specific Demethylase 4B
KDM4C	Lysine (K)-Specific Demethylase 4C
KDM5B	Lysine (K)-Specific Demethylase 5B
KDM6A	lysine (K)-specific demethylase 6A
Ki67	Marker Of Proliferation Ki-67
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRT7	Keratin 7, Type II
LASP1	LIM And SH3 Protein 1
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding Factor
LHFP	lipoma HMGIC fusion partner
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor alpha
Lin-28	LIN28
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
LMO7	LIM Domain 7
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
LUM	Lumican
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAML2	mastermind-like 2
MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MAP3K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1, E3 Ubiquitin Protein Ligase
MAPK7	Mitogen-Activated Protein Kinase 7

MARCKS	Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase C Substrate
maspin	mammary serine protease inhibitor
MAT-8	Methionine Adenosyltransferase VIII
MBD1	Methyl-CpG Binding Domain Protein 1
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
MN1	meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene
MSH2	MutS Homolog 2
MSI2	musashi homolog 2
MT1L	Metallothionein 1L (Gene/Pseudogene)
MTCP1	mature T-cell proliferation 1 neighbor; mature T-cell proliferation 1
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)
MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
NACA	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit
NBN	nibrin
NCOA2	nuclear receptor coactivator 2
NF1	neurofibromin 1
NFIB	nuclear factor I/B
NBM	nibrin
NNMT	Nicotinamide N-Methyltransferase
NOTCH2	Notch homolog 2
NPM1	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
NQO1	NAD(P)H/quinine oxidoreductase
NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
NXF1	Nuclear RNA Export Factor 1
OMD	osteomodulin
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
PAI	plasminogen activator inhibitor
PAX8	paired box 8
PDCD4	Programmed Cell Death 4 (Neoplastic Transformation Inhibitor)
PCM1	pericentriolar material 1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGFC	Platelet Derived Growth Factor C
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide

PEA15	Phosphoprotein Enriched In Astrocytes 15
PER1	period homolog 1
PERP	PERP, TP53 Apoptosis Effector
PFN1	Profilin 1
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PIM1	pim-1 oncogene
PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1
POSTN	Periostin, Osteoblast Specific Factor
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A (Cyclophilin A)
PPP1R12A	Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 12A
PPP3CA	Protein Phosphatase 3, Catalytic Subunit, Alpha Isozyme
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PRDM16	PR domain containing 16
PRDX1	Peroxiredoxin 1
PRMT1	Protein Arginine Methyltransferase 1
PRRX1	paired related homeobox 1
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
PTCH1	patched homolog 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAB31	RAB31, Member RAS Oncogene Family
Raf	Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene
RB1	Retinoblastoma 1
RECK	Reversion-Inducing-Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs
RECQL4	RecQ protein-like 4
RNF213	ring finger protein 213
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1
S100A4	S100 Calcium Binding Protein A4
S100P	S100 Calcium Binding Protein P
SEPT6	septin 6
SERPINE1	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1), Member 1
SETBP1	SET binding protein 1
SFRP	Secreted Frizzled-Related Protein
SLC1A5	Solute Carrier Family 1 (Neutral Amino Acid Transporter), Member 5
SMAD3	SMAD Family Member 3
SMAD6	SMAD Family Member 6
SMAD9	SMAD Family Member 9
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin,

	subfamily a, member 4
Smo	Smoothed, Frizzled Class Receptor
Slug	Snail2 (Snail Family Zinc Finger Protein 2)
Snail	Snail Family Zinc Finger Protein 1
SPOP	speckle-type POZ protein
SPRY2	Sprouty Homolog 2
SRSF9	Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 9
STIL	SCL/TAL1 interrupting locus
SUV39H1	Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1
SUV39H2	Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 2
SUZ12	Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
TAGLN2	Transgelin 2
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
TCF/LEF	T cell factor/lymphocyte enhancer
TCF3	transcription factor 3
TET3	tet methylcytosine dioxygenase 3
TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)
TGFB2	transforming growth factor, beta 2
TGFB3	transforming growth factor, beta 3
TGFBI	transforming growth factor, beta-induced
TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
TGFBR1	transforming growth factor β receptor II
TGFBR2	transforming growth factor β receptor II
TGF- β	transforming growth factor β
TIMP3	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
TNC	Tenascin C
TNFAIP6	Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 6
TP53	Tumor Protein P53
TP63	Tumor Protein P63
TPM1	tropomyosin 1
TPM3	tropomyosin 3
TRIM24	tripartite motif-containing 24
TRIM29	tripartite motif containing 29
TSG101	tumor susceptibility 101
TSPAN5	tetraspanin 5
Twist	twist family bHLH transcription factor
VEGF	vascular endothelial growth factor precursor
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
WIF1	WNT inhibitory factor 1

WNT2b	wingless-type MMTV integration site family, member 2B
WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 4
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16
Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1
Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2
ZNF521	zinc finger protein 521

12.2. UPITNIK KORIŠTEN U ISTRAŽIVANJU

Razgovor vodio/la: _____

Datum razgovora: / dan / mjesec godina / Početak

I. OSNOVNI PODACI O ISPITANIKU I KUĆANSTVU

A01. Ime i prezime : _____
(Ime) (Prezime) (Djevojačko prezime)

A01.1 Spol: muško žensko

A01.2 Datum rođenja: dan mjesec godina

A01.3 Visina: cm 1.4 Težina: kg

A02. Trenutna adresa:

Ulica _____ mjesto/selo _____ država _____

A02.1 Koliko dugo već živite na ovoj adresi? godina

A02.2 Jeste li tu rođeni? Da (preskoči sve do A03) Ne

A02.2.1 Ako NE, gdje ste rođeni?

Ulica _____ mjesto/selo _____ država _____

A02.2.2 Gdje ste živjeli prije doseljenja na sadašnju adresu ?

mjesto/selo _____ država _____

A.2.2.2.1 Koliko ste imali godina kad ste se preselili na sadašnju adresu ? Godina.

A02.2.3 Koji je bio razlog Vašem doseljenju ? _____

A03. Nacionalna pripadnost:

Hrvat Musliman Bosanac
 Srbin Ukrajinac Nešto drugo _____

A03.1 Jesu li se vaši preci doselili iz druge države?

da ne (preskoči na A04)

A03.1.1 Ako da, odakle su preci s očeve strane?

Bosna i Hercegovina Ukrajina Srbija i Crna Gora Negdje drugdje _____

A03.1.2 Ako da, odakle su preci sa majčine strane?

Bosna i Hercegovina Ukrajina Srbija i Crna Gora Negdje drugdje _____

A04. Koja je Vaša razina edukacije? Koliko godina ste išli u školu?
godina

--	--

A05. Pitanja o obiteljskoj strukturi : o živućima i pokojnima

A05.1 Koliko braće imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.2 Koliko sestara imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.3 Koliko djece imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.4 Je li Vaša majka živa? da ne

A05.5 Je li Vaš otac živ? da ne

A05.6 Je li Vaš djed po majčinoj strani živ? da ne

A05.7 Je li Vaša baka po majčinoj strani živa? da ne

A05.8 Je li Vaš djed po očevoj strani živ? da ne

A05.9 Je li Vaša baka po očevoj strani živa? da ne

A05.10 Koliko stričeva imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.11 Koliko strina imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.12 Koliko ujaka imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.13 Koliko ujni imate (živih i umrlih)?

--	--

 (broj)

A05.14 Koliko članova rodbine živi u istom selu kao i Vi?

--	--

 (broj)

A.06 Koji članovi vaše obitelji žive s vama u vašem kućanstvu?

A06.1 žena muž

A06.2 djeca: kćeri sinovi zetovi
 snahe unuke unuci

A06.3 Tko živi s Vama od članova obitelji s kojima ste u krvnom srodstvu?

<input type="checkbox"/> otac	<input type="checkbox"/> majka	<input type="checkbox"/> djed
<input type="checkbox"/> baka	<input type="checkbox"/> brat	<input type="checkbox"/> sestra
<input type="checkbox"/> bratova žena	<input type="checkbox"/> bratova kćerka	<input type="checkbox"/> bratov sin
<input type="checkbox"/> sestrin suprug	<input type="checkbox"/> sestrina kćerka	<input type="checkbox"/> sestrin sin
<input type="checkbox"/> ostali _____		

A06.4 Tko živi s Vama od članova obitelji Vašeg supruga / supruge ?

- | | | |
|---|--|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> otac | <input type="checkbox"/> majka | <input type="checkbox"/> djed |
| <input type="checkbox"/> baka | <input type="checkbox"/> brat | <input type="checkbox"/> sestra |
| <input type="checkbox"/> bratova žena | <input type="checkbox"/> bratova kćerka | <input type="checkbox"/> bratov sin |
| <input type="checkbox"/> sestrin suprug | <input type="checkbox"/> sestrina kćerka | <input type="checkbox"/> sestrin sin |
| <input type="checkbox"/> ostali _____ | | |

II. OSNOVNI PODACI O PIJENJU ČAJEVA:

A07. Jeste li ikada koristili trave ili pili biljne čajeve kada ste bili bolesni?

- Uvijek Ponekad Nikad

A07.1 Ako da, koje čajeve?

- | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Kopriva | <input type="checkbox"/> Bazga | <input type="checkbox"/> Šipak |
| <input type="checkbox"/> Lipa | <input type="checkbox"/> Kunica | <input type="checkbox"/> Kuginje |
| <input type="checkbox"/> Kamilica | <input type="checkbox"/> Vučja Stopa | <input type="checkbox"/> Metvica |
| <input type="checkbox"/> Badem | <input type="checkbox"/> Glog | <input type="checkbox"/> Druge _____ |

A07.2 Jeste li Vi brali trave?

- uvijek ponekad nikad

A07.3 Jeste li ih ikad kupili od travara ili u prodavaonici?

- uvijek ponekad nikad

III. OSNOVNI PODACI O PUŠENJU, ALKOHOLU I DRUGIM NAVIKAMA:

A.08 Jeste li popušili više od 10 kutija cigareta u svom životu? Da Ne (preskoči do A09)

A08.1 Koliko godina redovito pušite / ste pušili? (godina)

A08.2 Koliko cigareta dnevno pušite / ste pušili? cigareta/dnevno

A.08.3 Pušite li?

A08.3.1 Ako da, koliko cigareta dnevno? cigareta/dnevno

A08.3.2 Ako ne, kada ste prestali? Godine

A08.4 Puši li još netko iz Vaše obitelji? da ne

A09. Jeste li popili više od 10 čaša alkoholnih pića u Vašem životu? Da Ne (preskoči do A10)

A09.1 Koliko godina redovito konzumirate / ste konzumirali alkohol? (godina)
(ako je prestao)

A09.2 Koliko prosječno popijete / ste pili tjedno?
(ako je prestao)

čaša piva tjedno

čaša rakije tjedno

čaša vina tjedno

čaša drugih alkoholnih pića u tjedno

A09.3. Ako ste prestali, koje godine kada ste prestali?

--	--	--	--

Godine

A10. Jeste li ikada uzeli lijek protiv bolova?

da ne

A10.1 Koliko godina redovito uzimate / ste uzimali lijekove protiv bolova?
(godina)

--	--

A10.2 Koliko često ih uzimate?

rjetko, manje od jedne pilule mjesečno ponekad, ali manje od jedne pilule tjedno
 1-5 pilule tjedno 1 pilula dnevno 2-3 pilule dnevno više od 3 pilule dnevno

A10.3 Ako ste prestali, kada ste prestali? prije godina

PODACI O MOGUĆOJ IZLOŽENOSTI TOKSINIMA prije 20-30 godina

B01. Jeste li koristili u vašem domaćinstvu otrove protiv štakora/miševa, insekata i sl. prije 20-30 godina?

da ne (Preskoči do B02)

B02. Jeste li imali polja prije 20-30 godina? da ne (preskoči do B08)

B02.1 Gdje su Vaša polja bila smještena?

mjesto/selo (opisati lokaciju)

B02.2 Je li im mjenjana lokacija ? da ne

B02.3 Je li to bilo nakon komesacije da ne

B 02.4 Ako je lokacija mijenjana, koje godine ?

B02.5 Gdje su premještena?

mjesto/selo (opisati lokaciju)

B02.6 Koja je bila veličina Vaših polja? _____ jutara ili _____ hektara

B02.7 Koji korovi su rasli na vašim poljima prije 20-30 godina? (izaberite sve koji su rasli)

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ambrozija | <input type="checkbox"/> Divlji sirak | <input type="checkbox"/> Kostan |
| <input type="checkbox"/> Ljulj | <input type="checkbox"/> Sirak | <input type="checkbox"/> Slak |
| <input type="checkbox"/> Sapinjač | <input type="checkbox"/> Vučja stopa | <input type="checkbox"/> Pirika |
| <input type="checkbox"/> Preslica | <input type="checkbox"/> Mak | <input type="checkbox"/> Repica |
| <input type="checkbox"/> Zubra | <input type="checkbox"/> Osat | <input type="checkbox"/> Cinkrot |
| <input type="checkbox"/> Metvica | <input type="checkbox"/> drugi _____ | |

B02.7.1 Koji korov je rastao u najvećim količinama na vašem polju? (izaberite samo jednog)

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ambrozija | <input type="checkbox"/> Divlji sirak | <input type="checkbox"/> Kostan |
| <input type="checkbox"/> Ljulj | <input type="checkbox"/> Sirak | <input type="checkbox"/> Slak |
| <input type="checkbox"/> Sapinjac | <input type="checkbox"/> Vučja stopa | <input type="checkbox"/> Pirika |
| <input type="checkbox"/> Preslica | <input type="checkbox"/> Mak | <input type="checkbox"/> Repica |
| <input type="checkbox"/> Zubra | <input type="checkbox"/> Osat | <input type="checkbox"/> Cinkrot |
| <input type="checkbox"/> Metlica | <input type="checkbox"/> Drugi _____ | |

OPASKA: Molimo stanite i ispitanicima pokažite fotografije!

PRIJE 20-30 GODINA

B03. Ambrozija

biljka	B03.1 Jeste li ju vidali obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
	B03.2 Jeste li ju vidali obično na vašim livadama?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
sjemenke	B03.3 Jeste li vidali njene sjemenke među sjemenjkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad

B04. Vučja Stopa

biljka	B04.1 Jeste li ju vidali obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
	B4.2 Jeste li ju vidali obično na vašim livadama?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
sjemenke	B43. Jeste li vidali njene sjemenke među sjemenjkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad

B05 Pirika

biljka	B05.1 Jeste li ju vidali obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
	B05.2 Jeste li ju vidali obično na vašim livadama?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad

sjemenke	B05.3 Jeste li vidali njene sjemenke među sjemenjkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad

B06 Kostan

biljka	B06.1 Jeste li ju vidali obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad
sjemenke	B06.2 Jeste li ju vidali obično na vašim livadama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad
sjemenke	B06.3 Jeste li vidali njene sjemenke među sjemenjkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad

B07.1 Jeste li sijali žito na vašim poljima **prije 20-30 godina?** da ne

B07.1.1 Ako da, jeste li sijali žito svake godine? da ne

B07.1.2 Ako ne, kada ste sijali žito?

- svake 2 godine svake 3 godine svakih 5 godina
 nikad drugo _____

B07.1.3 Ako ste sijali i želi žito za što ste ga koristili? (iaberite sve za što ste ga koristili)

- Brašno i druge stvari za potrošnju u kućanstvu Za sadnju
 Za hranjenje domaćih životinja Drugo _____

B07.1.4 Ako ste sijali žito, jeste li ga obrađivali kombajnom prije 20-30 godina? da ne

B07.1.5 Koliko ste prosječno žita sijali godišnje?

- <100 kg 100-299 kg 300-499 kg >500 kg

B07.1.6 Jeste li prodavali žito? da ne

B07.1.7 Kome ste ga prodavali ili s kim ste trgovali?

- mlinaru mjenjali žito za brašno susjedima drugo

B07.2 Ako ste imali polja, jesu li ikada bila plavljena? da ne
(preskoči na B0)

B07.2.1 Ako jesu, koliko puta godišnje?

- više od 2 puta godišnje dva puta godišnje Jednom godišnje
 jednom na dvije godine manje od jednom na dvije godine drugo _____

B07.3 Ako ste imali polja, u kakvom stanju je zemlja obično bila?

- močvarasta pogodna za obradu drugo _____

B07.4 Ako ste imali polja, jeste li upotrebljavali pesticide na vašim poljima?

- da ne

B07.5 Ako ste imali polja, jeste li upotrebljavali herbicide na vašim poljima?

da ne

B08. Jeste li imali livade? da ne (preskoči do B05)

B08.1 Gdje su vaše livade bile smještene?

Mjesto/selo (opisati lokaciju)

B08.2 Ako ste imali životinje, jesu li se pasle na vašim livadama? da ne

B09. B09.1 Jeste li imali male bašte? da ne

B09.2 Jeste li imali šume? da ne

B9.3 Jeste li imali vinograd? da ne

B10. Jeste li **prije 20-30 godina** nakon vršidbe odvajali stabiljke korova od žita? da

ne

B10.1 Ako DA, je li ipak ostajalo nešto stabiljki korova u žitu?

uvijek ponekad nikad

B11. Jeste li ikad prali žito?

uvijek ponekad nikad

B12. Jeste li nakon vršidbe, odvajali sjemenke korova od žita?

da ne

B12.1 Ako ne, jeste li ikad viđali sjemenke korova između žita?

uvijek ponekad nikad

(preskoči do B13)

B12.2 Ako ste odvajali sjemenke, kako često ste ih odvajali?

uvijek ponekad nikad

B12.3 Poslije odvajanja, jeste li viđali sjemenke korova između žita?

uvijek ponekad nikad

B12.4 Što ste učinili sa sjemenkama korova poslije odvajanja?

Hrana za stoku/perad Bacanje u smeće Bacanje u gnoj

ostalo _____

B13. Koliko dugo nakon žetve su žito, kukuruz ili drugi usjevi ostajali na polju?

Nisam ih ostavljao vani danima tjednima

Više od mjesec dana

B14. Jeste li skladištili žito i ostale usjeve?

Uvijek Ponekad Nikad (preskoči na B15)

B14.1 Gdje ste čuvali usjeve?

Tavan Ambar Drugo _____

B14.2 Kakvi su bili prostori u kojima ste ih čuvali?

Vlažni Suhi Ostalo _____

B14.3 Koliko dugo nakon žetve su usjevi ostajali na tavanu ili u ambaru itd.?

- manje od jednog mjeseca 1 – 6 mjeseci
 6 mjeseci – 1 godine više od jedne godine Nikad

B15. Jeste li ikada primjetili plijesan ili druge nečistoće na pohranjenom žitu/drugim usjevima?

- Uvijek Ponekad Nikad
(Preskoči do B16)

B15.1 Ako ste primjetili plijesan, što ste uradili?

- Hrana za svinje Hrana za stoku Hrana za druge životinje
 Bacanje u gnoj Bacanje u smeće Ništa

B16. Jeste li pekli kruh prije 20-30 godina?

- Nikad manje od 25% 25% - 50%
 50% - 75% više od 75% ostalo _____

B16.1 Ako ste pekli kruh, koliko puta tjedno ste pekli?

puta tjedno

B16.1.1 Koliko kruhova ste ispekli odjednom?

štruca

B16.1.2 Koliko je bila prosječna težina svake štruce?

, kg / štrucu
(na jednu decimalu)

B16.2 Ako ste pekli kruh, odakle ste dobivali brašno?

- Mlinar Kupili Od našeg žita
 Ostalo _____

B16.3 Ako ste ga vozili u mlin, jeste li dobivali brašno od vašeg žita?

- Uvijek Ponekad Nikad Ne znam

B16.4 Ako ste vozili žito mlinaru, jeste li Vi ili netko iz obitelji nadgledao meljavu ?

- Uvijek Ponekad Nikad

B17 Jeste li ikada kupovali kruh (radije nego ispekli sami) ?

- Uvijek Ponekad Nikad

B17.1 Ako jeste, gdje se ga kupovali?

- u prodavaonici u selu u prodavaonici u gradu od susjeda drugo

B18 Koliko štruca kruha tjedno je vaša obitelj obično pojela?
tjedno

, štruca

(na jednu decimalu)

B18.1 Je li Vaša obitelj jela više ili manje kruha tjednom prije 20-30 godina?

- Manje nego sada Više nego sada Približno jednako

B19 Koliko štruca ste vi sami pojeli u jednom tjednu?

, štruca tjedno
(na jednu decimalu)

B19.1 Jeste li Vi sami pojeli više ili manje štruca prije 20-30 godina?

- Manje nego sada Više nego sada Približno jednako

B20. Jeste li pekli kolače / torte od vašeg žita?
 Često Ponekad Nikad

B20.1.1 Koliko puta tjednom ste pekli kolače / torte od vašeg žita? puta/tjedno

B20.1.2 Kolika je bila prosječna težina kolača / komada torte?
grama/ po komadu

B21. Jeste li radili kaše od vašeg žita?
 Često Ponekad Nikad

B22. Od kuda se vaše kućanstvo **prije 20-30 godina** snabdijevalo s pitkom vodom?

- samo naš bunar samo arteški bunar samo vodovodni sistem
 samo kupljena voda naš i arteški bunar naš bunar i vodovodni sistem
 arteški bunar i vodovodni sistem vodovodni sistem i kupljena voda
 ostalo _____

B23. Jeste li pili mlijeko (ili jeste li ga jeli sa žgancima) prije 20-30 ? da ne (Preskoči na B24)

B23.1 Ako da, koliko ste ga u čašama pili dnevno? čaša

B23.1.1 Gdje ste obično nabavljali mlijeko?

- Većinom od vlastitih krava Većinom iz dućana Većinom od susjeda
 Od vlastitih krava i iz dućana Vlastito i od susjeda Od susjeda i iz dućana
 Vlastite krave, dućan, susjed Ostalo _____

B.23.2. Koliko puta tjedno ste koristili mliječne prooizvode (jogurt, sir, maslac, margarin, kajmak, vrhnje)?

- 1-3 puta tjedno 2-4puta/tjedno
 jednom tjedno manje od jednom tjedno

B24. Koliko puta tjedno ste jeli meso (govedinu, svinjetinu, piletinu, teletinu, ribu, janjetinu, zečevnu, kunić)?

- 1-3 puta tjedno 2-4puta/tjedno
 jednom tjedno manje od jednom tjedno

B25. Koliko puta tjedno ste jeli voće i povrće (brokule, kupus, kiseli kupus, naranče, grah, kukuruz...)?

- 1-3 puta tjedno 2-4puta/tjedno
 jednom tjedno manje od jednom tjedno

PODACI O SADAŠNJOJ MOGUĆOJ IZLOŽENOSTI TOKSINIMA

C01. Jeste li koristili u vašem domaćinstvu otrove protiv štakora/miševa, insekata i sl. u zadnjih 5 godina?

- da ne

C02. Imate li sada polja?

- da ne, a nikad nisam ni imao (preskoči do C08)
 nemam sada ali imao/la sam prije _____ godina

C02.1 Gdje su vaša polja smještena?

mjesto/selo _____

C02.2 Jesu li smještena na istoj lokaciji kao i pred 20 godina?

da ne

C02.3 Ako nisu, gdje su smještena?

u istom selu u drugom selu (navesti kojem) _____

C02.4 Jesu li vaša polja jednake površine kao i pred 20 godina?

da ne, manja su ne, veća su

C02.5 Koji korovi rastu na vašim poljima sad? (izaberite sve koji rastu)

<input type="checkbox"/> Ambrozija	<input type="checkbox"/> Divlji sirak	<input type="checkbox"/> Kostan
<input type="checkbox"/> Ljulj	<input type="checkbox"/> Sirak	<input type="checkbox"/> Slak
<input type="checkbox"/> Sapinjač	<input type="checkbox"/> Vučja stopa	<input type="checkbox"/> Pirika
<input type="checkbox"/> Preslica	<input type="checkbox"/> Mak	<input type="checkbox"/> Repica
<input type="checkbox"/> Zubra	<input type="checkbox"/> Osat	<input type="checkbox"/> Cinkrot
<input type="checkbox"/> Metlica	<input type="checkbox"/> drugi _____	

C02.5.1 Koji korov raste u najvećim količinama na vašem polju? (izaberite samo jednog)

<input type="checkbox"/> Ambrozija	<input type="checkbox"/> Divlji sirak	<input type="checkbox"/> Kostan
<input type="checkbox"/> Ljulj	<input type="checkbox"/> Sirak	<input type="checkbox"/> Slak
<input type="checkbox"/> Sapinjac	<input type="checkbox"/> Vučja stopa	<input type="checkbox"/> Pirika
<input type="checkbox"/> Preslica	<input type="checkbox"/> Mak	<input type="checkbox"/> Repica
<input type="checkbox"/> Zubra	<input type="checkbox"/> Osat	<input type="checkbox"/> Cinkrot
<input type="checkbox"/> Metlica	<input type="checkbox"/> Drugi _____	

Opaska! Ovdje pokazati fotografije biljka. DANAS

C03 Ambrozija

biljka	C03..1 Vidate li ju obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
	C03.2 Vidate li ju obično na vašim livadama?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
sjemenke	C03.3 Vidate li njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad

C04 Vučja Stopa

biljka	C04.1 Vidate li ju obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
	C04.2 Vidate li ju obično vidate na vašim livadama?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad
sjemenke	C04.3 Vidate njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/> uvijek	<input type="checkbox"/> ponekad	<input type="checkbox"/> nikad

C05 Pirika

biljka	C05.1 Vidate li ju obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad
sjemenke	C05.2 Vidate li ju na vašim livadama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad
sjemenke	C05.3 Vidate li njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad

C06 Kostan

biljka	C06.1 Vidate li ju obično na vašim poljima?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad
sjemenke	B06.2 Vidate li ju obično na vašim livadama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad
sjemenke	B06.3 Vidate li njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za brašno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		uvijek	ponekad	nikad

C07. Sijete li žito i **danas**?
 da ne

 C07.1 Sijete li druge usijeve osim žita (npr. kukuruz, ječam...)? da ne

 C07.1.2 Ako da, sijete li žito svake godine? da ne

C07.1.3 Ako ne, kad sijete žito?

 svake 2 godine svake 3 godine svakih 5 godina
 nikad drugo _____

C07.1.4 Ako sijete i ženjete žito za što ga koristite?

 Brašno i druge stvari za potrošnju u kućanstvu Za sadnju
 Za hranjenje domaćih životinja Drugo

 C07.1.5 Ako sijete žito, obrađujete li ga kombajnom? da ne

C07.1.6 Koliko prosječno sijete žita godišnje?

 <100 kg 100-299 kg 300-499 kg >500 kg

 C07.1.7 Prodajete li žito? da ne

C07.1.8 Kome ga prodajete ili s kim trgujete?

 mlinaru mjenjali žito za brašno susjedima drugo

 C07.3 Ako imate polja, jesu li plavljena? da ne

C07.3.1 Ako jesu, koliko puta godišnje?

 više od 2 puta godišnje dva puta godišnje Jednom godišnje
 jednom na dvije godine manje od jednom na dvije godine drugo _____

C07.4 Ako imate polja, u kakvom je stanju zemlja?
 močvarasta pogodna za obradu drugo _____

C07.5 Ako imate polja, upotrebljavate li pesticide?
 da ne

C07.6 Ako imate polja, upotrebljavate li herbicide na vašim poljima?
 da ne

C08. Imate li livade? da ne (ako ne preskoči do C09)

C08.1 Gdje su vaše livade smještene?

Mjesto/selo (opisati lokaciju)

C08.2 Jesu li smještene na istoj lokaciji kao i pred 20 godina?
 da ne

C08.3 Ako nisu, gdje su smještene?
 u istom selu u drugom selu (navesti kojem)

C08.4 Jesu li vaše livade jednake površine kao i pred 20 godina?
 da ne, manje su ne, veće su

C08.5 Uzgajate li išta na livadama?
 ne da, pšenicu(žito) da, druge usijeve
 da, povrće da, drugo

C08.6 Ako imate životinje, pasu li na vašim livadama? da ne

C09.1 Imate li male bašte? da ne

C09.2 Imate li male šume? da ne

C09.3 Imate li vinograd? da ne

C10. Odvajate li nakon vršidbe stabiljke korova od žita?
 da ne

C10.1 Ako DA, ostaje li nešto stabiljki korova u žitu?
 uvijek ponekad nikad

C11. Perete li žito?
 uvijek ponekad nikad

C12. Odvajate li sjemenke korova od žita nakon vršidbe?
 da ne

C12.1 Ako ne, vidate li sjemenke korova između žita?
 uvijek ponekad nikad

C12.2 Ako odvajate sjemenke, kako često ih odvajate?
 uvijek ponekad

- C12.3 Poslije odvajanja, vidate li **danas** sjemenke korova između žita?
 uvijek ponekad nikad
- C012.4 Što učinite sa sjemenkama korova poslije odvajanja?
 Hrana za stoku/perad Bacanje u smeće Bacanje u gnoj
 ostalo _____
- C13. Koliko dugo nakon žetve žito, kukuruz ili drugi usjevi ostaju na polju?
 nikad danima tjednima
 više od mjesec dana
- C14. Skladištite li žito i ostale usjeve ?
 Uvijek Ponekad Nikad (preskoči na C11)
- C14.1 Gdje čuvate usjeve?
 Tavan Ambar Ostalo _____
- C14.2 Kakvi su prostori u kojima čuvate usjeve?
 Vlažni Suhi Ostalo _____
- C14.3 Koliko dugo nakon žetve ostaju usjevi na tavanu ili u ambaru?
 manje od jednog mjeseca 1 – 6 mjeseci 6 mjeseci – 1 godine
 više od jedne godine Nikad
- C15. Primjećujete li plijesan ili druge nečistoće na pohranjenom žitu/drugim usjevima?
 Uvijek ponekad nikad (Preskoči do C12)
- C15.1 Ako sada primjetite pljesan na usjevima, što uradite?
 Hrana za svinje Hrana za stoku Hrana za druge životinje
 Bacanje u gnoj Bacanje u smeće Ništa
- C16. Pečete li kruh?
 Nikad manje od 25% 25% - 50%
 50% - 75% više od 75% ostalo _____
- C16.1 Ako pečete, koliko puta tjedno? puta tjedno
- C16.1.1 Koliko štruca ispečete odjednom? štruca
- C16.1.2 Koliko je prosječna težina svake štruce? kg / štrucu
 (na jednu decimalu)
- C16.2 Ako pečete kruh, odakle dobivate brašno?
 Mlinar Kupili Od našeg žita Ostalo _____
- C16.3 Ako ga vozite u mlin, dobivate li brašno od vašeg žita?
 Uvijek Ponekad Nikad Ne znam
- C16.4 Ako vozite žito mlinaru, je li Vi ili netko iz obitelji natgleda ?
 Uvijek Ponekad Nikad
- C17 Kupujete li kruh ? Uvijek Ponekad Nikad

C17.1 Ako da, gdje ga kupujete ?

- u prodavaonici u selu u prodavaonici u gradu od susjeda
 drugo

C18 Koliko štruca kruha tjedno je obično pojede Vaša obitelj?
tjedno

, štruca

(na jednu decimalu)

C19 Koliko štruca ste Vi sami pojedete u jednom tjednu?

, štruca tjedno
(na jednu decimalu)

C20. Pečeteli kolače / torte od vašeg žita?

- Često Ponekad Nikad

C 20.1. Koliko puta tjednom pečete kolače / torte od vašeg žita? puta/tjedno

C20.2 Kolika je prosječna težina u gramima kolača / komada torte?
po komadu

grama/

C 21. Radite li kaše od vašeg žita?

- Često Ponekad Nikad

C 22. Od kuda se vaše kućanstvo **danas** snabdijeva s pitkom vodom ?

- Samo naš bunar samo arteški bunar samo vodovodni sistem
 samo kupljena voda naš i arteški bunar naš bunar i vodovodni sistem
 naš bunar i kupljena voda arteški bunar i vodovodni sistem arteški bunar i
kupljena voda vodovodni sistem i kupljena voda ostalo _____

C23. Pijete li mlijeko i/ili ga jedete li ga sa žgancima? da ne (Preskoči do C 24)

C23.1 Ako da, koliko dnevno popijete čaša mlijeka? čaša na dan

C23.2 Od kuda obično dobivate mlijeko?

- Većinom od vlastitih krava Većinom iz dućana Većinom od susjeda
 Od vlastitih krava i iz dućana Vlastito i od susjeda Od susjeda i iz dućana
 Vlastite krave, dućan, susjed Ostalo _____

C.23.3. Koliko puta tjedno koristite mliječne prooizvode (jogurt, sir, maslac, margarin,
kajmak, vrhnje)?

- 1-3 puta tjedno 2-4puta/tjedno
 jednom tjedno manje od jednom tjedno

C24. Koliko puta tjedno jedete meso (govedinu, svinjetinu, piletinu, teletinu, ribu, janjetinu,
zečevnu, kunić)?

- 1-3 puta tjedno 2-4puta/tjedno
 jednom tjedno manje od jednom tjedno

C25. Koliko puta tjedno jedete voće i povrće (brokule, kupus, kiseli kupus, naranče, grah,
kukuruz...)?

- 1-3 puta tjedno 2-4puta/tjedno
 jednom tjedno manje od jednom tjedno

D01. Što je izvor vaših primanja?

- zemljoradnja radnik učitelj/ica
 medicinska sestra penzija domaćica (suprugov prihod)
 roditelji država privatnik
 ostalo _____

D01.1 Koliko su vaša mjesečna primanja (KUNA mjesečno)?

- < 1500 1500 – 3000 3000 – 5000 > 5000

D01.2. Je li kod Vas postavljena dijagnoza ?

- hipertenzije (visoki tlak) šećerne bolesti policistične bolesti bubrega
 glomerulonefritisa

D02. Jeste li ikad čuli za nefropatiju/nefritis?

- da ne

D02.1 Ako da, od koga ste čuli za nefropatiju/nefritis?

- doktora / medicinske sestre znanstvenika, stručnjaka rodbine
 TV / radio/ novine škola drugih ljudi iz selu/mjestu
 ostalo _____

D02.2 Što mislite, što je uzrok nefritisa ?

- hipertenzija (visoki tlak) tuberkuloza prehlada
 šećerna bolest upala nasljeđe
 lijekovi uzimani tijekom djetinstva vučja stopa voda
 zaraza od svinja prehrana drugo _____

D03. Je li Vam ikada do sada postavljena dijagnoza bubrežne bolesti (nefritisa/nefropatije)?

- da ne (preskoči do D04)

D03.1 Ako da, kada?

--	--

mjesec

--	--	--	--

godina

D04. Poznajete li ljude koji imaju nefropatiju/nefritis?

- da ne

D05. Je li kod nekog od članova vaše obitelji ikada postavljena dijagnoza nefritisa?

- da ne (preskoči do D06) ne znam (preskoči do D06)

D05.1 Ako da, kog koga?

- žene muža kćeri sinova zetova snaha
 unuka brata sestre bake djeda punca
 tetka punice ujka ujne strica strine

D06. Jeste li imali nekih drugih problema s bubrežima ili mokraćnim sustavom?

- da ne (preskoči do D07)

D06.1 Ako da, koji problem?

- bubrežni kamenci smetnje s mokrenjem Lupus
 tuberkuloza bubrega tumor/rak upala bubrega
 bubrežna cista dijabetička nefropatija glomerulonefritis
 upale mokraćnih puteva policistični bubrezi vezikoureteralni refluks
 Ostalo _____

D07. Je li netko od članova vaše obitelji imao drugih problema osim nefritisa s bubrežima ili mokraćnim sustavom?

da

ne (Preskoči na D08)

D07.1.1 Ako da, koji problem?

Supružnici:

D07.1.2 Koji problem:

- | | | |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> bubrežni kamenci | <input type="checkbox"/> smetnje s mokrenjem | <input type="checkbox"/> Lupus |
| <input type="checkbox"/> tuberkuloza bubrega | <input type="checkbox"/> Tumor/rak | <input type="checkbox"/> upala bubrega |
| <input type="checkbox"/> bubrežna cista | <input type="checkbox"/> Dijabetička nefropatija | <input type="checkbox"/> glomerulonefritis |
| <input type="checkbox"/> upale mokraćnih puteva | <input type="checkbox"/> policistični bubrezi | |
| <input type="checkbox"/> vezikoureteralni refluks | <input type="checkbox"/> Ostalo _____ | |

D07.2.1. Djeca:

- kćeri sinovi zetovi snahe unuke unuci
 ostali _____

D07.2.2. Koji problem:

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> bubrežni kamenci | <input type="checkbox"/> smetnje s mokrenjem | <input type="checkbox"/> Lupus |
| <input type="checkbox"/> tuberkuloza bubrega | <input type="checkbox"/> Tumor/rak | <input type="checkbox"/> upala bubrega |
| <input type="checkbox"/> bubrežna cista | <input type="checkbox"/> Dijabetička nefropatija | <input type="checkbox"/> glomerulonefritis |
| <input type="checkbox"/> upale mokraćnih puteva | <input type="checkbox"/> policistični bubrezi | <input type="checkbox"/> vezikoureteralni refluks |
| <input type="checkbox"/> Ostalo _____ | | |

D07.3.1. Ostala rodbina

- brat sestra baka djed punac tetak
 teta punica ujak ujna stric strina

D07.3.3 Ako da, koji problem?

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> bubrežni kamenci | <input type="checkbox"/> smetnje s mokrenjem | <input type="checkbox"/> Lupus |
| <input type="checkbox"/> tuberkuloza bubrega | <input type="checkbox"/> Tumor/rak | <input type="checkbox"/> upala bubrega |
| <input type="checkbox"/> bubrežna cista | <input type="checkbox"/> Dijabetička nefropatija | <input type="checkbox"/> glomerulonefritis |
| <input type="checkbox"/> upale mokraćnih puteva | <input type="checkbox"/> policistični bubrezi | <input type="checkbox"/> vezikoureteralni refluks |
| <input type="checkbox"/> Ostalo _____ | | |

D08. Je li Vama ikada postavljena dijagnoza raka?

da

ne (preskoči do D09)

D08.1 Ako da, koji tip?

- | | | |
|------------------------------------|--|--|
| <input type="checkbox"/> prostate | <input type="checkbox"/> debelog crijeva | <input type="checkbox"/> dojke |
| <input type="checkbox"/> pluća | <input type="checkbox"/> bubrega | <input type="checkbox"/> mokraćnog mjehura |
| <input type="checkbox"/> kosti | <input type="checkbox"/> uretera | <input type="checkbox"/> jajnika |
| <input type="checkbox"/> leukemija | <input type="checkbox"/> želuca | <input type="checkbox"/> maternice |
| <input type="checkbox"/> kože | <input type="checkbox"/> vrata, grkljana | <input type="checkbox"/> drugo _____ |

D08.2 Ako da, kada?

mjesec

/

godina

D08.2.1 Jeste li zbog toga liječeni?

da

ne

D08.2.2 Ako da, kada?

godine

D08.2.3. Jeste li operirani?

da

ne

D08.2.4. Ako da, koje godine? godine

D08.2.5. Gdje ste operirani? Mjesto _____

D09. Je li kod kojeg od Vaših članova obitelji postavljena diagnoza raka (karcinoma)?

da ne (preskoči do kraja)

D09.1 supružnici: Žena muž

D09.1.1. Ako da, koji tip?

prostate debelog crijeva dojke
 pluća bubrega mokraćnog mjehura
 kosti uretera jajnika
 leukemija želuca maternice
 kože vrata,grkljana drugo_____

D09.2 Djeca:

kćeri sinovi zetovi snahe unuke unuci
 ostali _____

D09.2.1. Ako da, koji tip?

prostate debelog crijeva dojke
 pluća bubrega mokraćnog mjehura
 kosti uretera jajnika
 leukemija želuca maternice
 kože vrata,grkljana drugo_____

D09.2.2. Ostala rodbina:

brat sestra baka djed punac
 tetak teta punica ujak ujna stric strina

D09.2.2.1. Ako da, koji tip?

prostate debelog crijeva dojke
 pluća bubrega mokraćnog mjehura
 kosti uretera jajnika
 leukemija želuca maternice
 kože vrata,grkljana drugo_____

Kraj razgovora: sati

Ocjena suradljivosti bolesnika:

Vrlo suradljiv suradljiv nije suradljiv

12.3. TABLICE S PRIKAZOM KARAKTERISTIKA BOLESNIKA

Tablica 12.3A. Karakteristike bolesnika

Bolesnik	Spol	Dob	Domicilna regija	Lokalizacija tumora	Gradus tumora (Klasifikacija iz 1998)	Gradus tumora (Klasifikacija iz 2004)	Stadij tumora	NM	Pracjenje	Preživljenje
B_AAN_03	M	68	EN Bosna	P,U	G3	VG	pT3	N2Mx	2009. ca prostate, 2010. meta jetre i ič u abdomenu	preminuo u 12/2010
B_AAN_04	Ž	74	blizina EN Hrvatska	U	G3	VG	pT2	NxMx	Ca urotheliale papilare invasivum ureteris G1pT1	preminuo
B_AAN_06	Ž	78	EN Bosna	P,U,M,M	G3	VG	pT4	NxMx	Ca urotheliale papilare ureteris dex. G2pTa LG HD od prije operacije	preminuo netom nakon operacije zbog postop komplikacija
B_AAN_07	Ž	73	EN Hrvatska	P	G3	VG	pT2	NxMx	HD od 11/2013	živ
B_AAN_13	Ž	71	EN Bosna	P	G3	VG	pT3	NxMx	HD	preminuo u 7/2010
B_AAN_15	Ž	85	EN Bosna	P,U	G3	VG	pT3	NxMx	/	preminuo 3 mjeseca nakon operacije-srčani arest
B_AAN_18	Ž	76	EN Hrvatska	P	G2	VG	pT1	NxMx	/	preminuo
B_AAN_20	Ž	80	EN Bosna	U	G2	VG	pT1	NxMx	2010. carcinoma urotheliale papilare ureteris dex. G1 pTa	preminuo uslijed inkarceracije i ileusa
B_AAN_21	Ž	83	blizina EN Bosna	U	G2	VG	pT2	NxMx	/	preminuo od posljedica operacije
B_AAN_22	M	59	blizina EN Hrvatska	P	G1	NG	pTa	NxMx	/	živ
B_AAN_25	M	75	EN Bosna	P,U	G2	VG	pT3	NxMx	2012. ca prostate	živ
B_AAN_26	Ž	80	EN Hrvatska	U	G1	VG	pTa	NxMx	/	živ
B_AAN_27	Ž	75	blizina EN Bosna	P,U	G3	VG	pT3	NxMx	meta kostiju i mozga	preminuo u 2011.

Legenda: EN=endemska nefropatija, M=muško, M.M= M=mokraćni mjehur, P=pijeloni, U=ureter, Ž=žensko, VG=visoki gradus (od engl. high grade), NG=niski gradus

Tablica 12.3B. Karakteristike bolesnika

Bolesnik	AL-l-dA-DNA adukti	TP53 status	Hgb	MCV	Kreatinin (umol/L)	eGFR MDRD	Stadij KBB	α 1MCR	Korištenje biljnih pripravaka u medicinske svrhe	Pušenje - vrijednost kutija godina	Korištenje analgetika	Arterijska hipertenzija	Šećerna bolest
B_AAN_03	0,72	139-1/A>T	106	59,8	135	48	3	9,7	povremeno	40	ne	ne	ne
B_AAN_04	1,9	DT	103	85,5	170	27	4	/	povremeno	0	da	da	ne
B_AAN_06	IRD	DT	126	91,0	352	12	5	/	povremeno	0	ne	ne	ne
B_AAN_07	2,86	DT	123	91,0	228	19	4	77,4	povremeno	0	da	da	da
B_AAN_13	0,27	DT	113	79,5	230	19	4	/	povremeno	0	da	da	ne
B_AAN_15	0,29	Int 4/A>T	120	91,1	101	48	3	/	nikad	0	ne	ne	da
B_AAN_18	0,56	Int 3/A>T	96	86,9	188	24	4	81,8	nikad	0	da	da	ne
B_AAN_20	1,2	DT	100	91,0	474	8	5	/	povremeno	0	da	da	ne
B_AAN_21	IRD	DT	126	87,2	122	39	3	/	povremeno	0	da	da	da
B_AAN_22	IRD	DT	115	88,9	85	85	2	7,7	povremeno	57	ne	ne	ne
B_AAN_25	IRD	DT	74	79,3	186	33	3	90,6	povremeno	5	ne	ne	ne
B_AAN_26	nije učinjeno	DT	92	83,3	118	41	3	10,7	uvijek	0	da	da	ne
B_AAN_27	IRD	DT	120	89,1	73	72	2	/	povremeno	0	da	da	da

Legenda: IRD=ispod razine detekcije, DT=divlji tip, Hgb-hemoglobin (g/l), MCV-prosjezni volumen eritrocita (l/l), α 1MCR-omjer alfa1mikroglobulina i kreatinina (mg/g)

Tablica 12.3C. Karakteristike bolesnika

Bolesnik	Uočavanje A. clematitisa na poljima u prošlosti	Uočavanje sjemenki A. clematitisa među žitom u prošlosti	Uzgojanje žita u prošlosti	Pečenje kruha u prošlosti	Kupovina kruha u prošlosti	Konzumacija kruha (broj štruca tjedno)	Vidanje A. clematitisa na poljima sada	Vidanje sjemenki A. clematitisa među žitom sada	Pečenje kruha sada	Kupovina kruha sada
B_AAN_03	povremeno	povremeno	da	uvijek	nikad	2	uvijek	ne znam	ne	da
B_AAN_04	povremeno	uvijek	da	uvijek	nikad	4,5	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_06	uvijek	uvijek	da	uvijek	nikad	1	uvijek	nikad	ne	da
B_AAN_07	uvijek	povremeno	da	uvijek	nikad	1,25	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_13	povremeno	povremeno	da	uvijek	nikad	1,5	uvijek	povremeno	povremeno	da
B_AAN_15	nikad	nikad	da	uvijek	nikad	6	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_18	uvijek	povremeno	da	uvijek	nikad	3,5	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_20	povremeno	povremeno	da	uvijek	nikad	0,5	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_21	nikad	nikad	da	uvijek	nikad	7	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_22	povremeno	nikad	da	uvijek	nikad	3,5	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_25	nikad	nikad	da	uvijek	nikad	2,5	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_26	povremeno	nikad	ne	uvijek	nikad	1	nikad	nikad	ne	da
B_AAN_27	uvijek	povremeno	da	uvijek	nikad	1,5	uvijek	povremeno	povremeno	da