

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana S. Despotović

**Uloga mikroRNK uključenih u regulaciju TGF $\beta$  signalnog puta u metastatskom kolorektalnom karcinomu - funkcionalna analiza i odgovor na terapiju**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jovana S. Despotović

**The role of microRNAs involved in regulation  
of TGF $\beta$  signaling pathway in metastatic  
colorectal cancer - functional analysis and  
response to therapy**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

## **MENTORI:**

**dr Aleksandra Nikolić**, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Katarina Zeljić**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

**dr Dragica Radojković**, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sandra Dragičević**, naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Marija Savić Veselinović**, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je najvećim delom urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Aleksandre Nikolić, dok je drugi deo urađen u grupi prof. dr. Regine Schneider-Stock *Experimental Tumorpathology, Institute of Pathology, University Hospital of Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg*, u Erlangenu u Nemačkoj.

## ZAHVALNICA

Zahvaljujem se...

**dr Aleksandri Nikolić**, mom mentoru, koja me je nesebično prihvatila kao svog studenta. Alex, hvala ti na ukazanom poverenju, podršci, prenesenom znanju, velikom strpljenju i odgovorima na sva moja pitanja (znam da ih je bilo mnogo). Hvala ti na bezbrojnim satima diskusije i mozganja u kancelariji koja su mi izuzetno značila tokom ovih godina. Hvala ti što si svoje kontakte i saradnje nesebično podelila sa mnom. Hvala ti na svim karijernim savetima, i motivaciji da dalje napredujem u nauci i da se razvijam. Hvala ti na podsticajima za širenje naučnih vidika, i što si mi ukazala na značaj i sve blagodeti „naučnog turizma”. Bilo je zadovoljstvo sazrevati pod tvojim mentorstvom.

**dr Katarini Zeljić**, mom fakultetskom mentoru, na prenesenom znanju tokom osnovnih studija, i svim korisnim savetima i sugestijama koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.

Članovima komisije **dr Dragici Radojković**, **dr Sandri Dragičević** i **dr Mariji Savić Veselinović** na konstruktivnim savetima i sugestijama koji su unapredili ovu doktorsku disertaciju. Dado, hvala Vam što ste me nesebično primili na Vaš projekat, kao i na svim korisnim savetima i podršci tokom proteklih nekoliko godina. Sandri, hvala ti što si svoje znanje i veštine nesebično delila sa mnom, i što si uvek bila tu da pomogneš kad zatreba. Hvala ti za sva mozganja i prava pitanja koja su me naterala na razmišljanje. Srećna sam što sam na ovom putu pored sebe imala osobu poput tebe.

Svim članovima Laboratorije za molekularnu biologiju na kolegijalnosti, pomoći i dobroj radnoj atmosferi. Posebno se zahvaljujem Taši, Saški, Sneki i Miri. Tašo, hvala ti na pomoći i podršci od mog prvog dana u laboratoriji. Hvala ti što si bila tu i slušala o svim usponima i padovima na ovom putu, a posebno sam srećna i zahvalna na zajedničkim ručkovima u seminarskoj, zen momentima u venjaku i Baloro/Milky palačinkama. Saška, hvala ti što si svoje znanje o uzgoju i radu sa ribicama podelila sa mnom, i što si uvek bila tu kao konsultant, uz Sneki. Miro, sve što znam o kloniranju znam zahvaljujući tebi. Zahvaljujem se i kolegici Dani koja je podelila sa mnom svoje vektore za kloniranje.

dr Aleksandru Bogdanović i dr Danijelu Galun na sjajnoj saradnji i brizi o ispitanicima. Aleksandre, hvala ti što si svoje kliničko znanje podelio sa mnom, i što si perfektno vodio i uređivao bazu informacija o ispitanicima. Hvala ti na svim savetima, sugestijama i diskusijama koje smo vodili oko obrađivanja i prikazivanja kliničkih rezultata, i sređivanju dokumentacije za Etički odbor. Dr Galun, hvala Vam na svom zalaganju i inicijativi oko uzimanja bioloških uzoraka na ispravan način, na podršci i korisnim savetima tokom pisanja kliničkog rada, i velikoj pomoći oko dobijanja dozvole Etičkog odbora. Iskreno se radujem budućim zajedničkim projektima, i nadam da će sve buduće saradnje sa lekarima biti ovako lake i produktivne kao sa vama. Zahvaljujem se i ispitanicima koji su pristali da učestvuju u ovoj studiji.

Akademiku Zoranu Krivokapić veliko hvala na podršci tokom izrade ovog rada i na tome što je sa mnom nesebično podelio alikvot bevacizumaba. Jovani Rosić hvala na druženju i što je nekoliko puta pomogla oko dopremanja uzoraka ispitanika do laboratorije.

Prof. dr Regine Schneider-Stock koja me je nesebično primila u svoju istraživačku grupu u Erlangenu u Nemačkoj i omogućila da odradim funkcionalne eksperimente u ćelijskoj kulturi, ali i na modelu embriona pileta. Regine, hvala Vam na pruženoj prilici i svim korisnim savetima i diskusijama koje smo vodili tokom mog boravka. Zahvaljujem se i ostalim kolegama iz grupe, a pre svega Ani Monteiro koja je upoznala kako laboratorija funkcioniše i uvek bila uz mene. Ana, hvala ti na prenetom znanju i iskustvu, svim tehničkim savetima, planiranjima eksperimenata i podršci. Kolegama Chuanpit, Philipp,

Kerstin i Stephan se zahvaljujem na razmeni iskustava i prijatnoj atmosferi za rad. Zahvaljujem se i COST akciji TRANSCOLONCAN (CA17118) koja je finansirala moj put i boravak u Nemačkoj.

dr Jeleni Urošević i Prof. dr Roger Gomis sa IRB instituta u Barseloni, u Španiji. Jelena, hvala ti što si svoje vreme, iskustvo i znanje nesebično podelila sa mnom. Dr Gomis, hvala Vam što ste me srdačno primili i omogućili da provedem nekoliko nedelja u Vašoj istraživačkoj grupi. Iako rezultati koji su dobijeni u Barseloni nisu prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, smatram je vreme koje sam provela u Vašoj grupi bilo izuzetno značajno za moj dalji naučni razvoj, i da sam dosta naučila od Vas i ostalih kolega. Zbog toga se posebno zahvaljujem članovima grupe Esther, Marc, Sara, Alicia, Cristina, Fer, Anna i Juanmi. Zahvaljujem se i Evropskoj asocijaciji za istraživanje raka (eng. *European Association for Cancer Research*) koja je finansirala moj put i boravak u Španiji.

Koleginici i prijateljici Anđeli, koja je bila uz mene od prvog fakultetskog dana, i sa kojom sam delila sve uspehe i slatke probleme PhD života. Mojim prijateljicama Tići, Mici i Joxici što su me uvek bodrile i veselile svojim pričama petkom uveče.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj porodici koja me je podržavala u nameri da postanem doktor bioloških nauka. Zahvaljujem se mami Božani, tati Siniši i bratu Stefanu na pruženoj ljubavi, razumevanju, strpljenju i veri. Bez vas ovo ne bi bilo moguće. Hvala i mojim bakama Slobi i Radi i dekama Boći i Dragu, a posebno baka Slobi koja je pokazala najviše interesovanja i razumevanja.

Gorane, ljubavi, hvala ti za sve što si učinio za mene. Hvala ti na neiscrpnj ljubavi. Hvala ti što si uvek gledao krupniju sliku i razmišljao o mojoj budućnosti i karijeri. Hvala ti na svom odricanju i razumevanju. Tvoje prisustvo je sve učinilo lakšim.

# Uloga mikroRNK uključenih u regulaciju TGFβ signalnog puta u metastatskom kolorektalnom karcinomu - funkcionalna analiza i odgovor na terapiju

## Sažetak

Polovina pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (CRC) će tokom progresije bolesti razviti metastaze (mCRC) koje odlikuje lošija prognoza i veća stopa mortaliteta. TGFβ signalni put i mikroRNK (miRNK) molekuli imaju ključne uloge u procesu patogeneze i metastaziranja CRC, kao i rezistenciji na hemioterapiju. Svrha ovog istraživanja je bilo ispitivanje uloge miRNK koje učestvuju u regulaciji TGFβ signalnog puta u odgovoru na terapiju za lečenje mCRC, zatim njihovog prediktivnog i prognostičkog potencijala kod pacijenata sa metastazama CRC u jetri (CRLM) u okviru prospektivne kliničke studije, i njihove funkcionalne uloge u procesima relevantnim za karcinogenezu i progresiju CRC. Istraživanje je obuhvatilo *in silico* pretragu miRNK koje regulišu 10 članova kanonskog TGFβ signalnog puta, pri čemu je identifikovano više od 300 jedinstvenih miRNK, iz čega sledi da je mreža interakcija miRNK i TGFβ signalnog puta veoma kompleksna. Pokazano je da pojedinačni i kombinovani standardni hemioterapeutici za lečenje mCRC utiču na ekspresiju odabranih miRNK hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p i hsa-miR-93-5p koje regulišu najveći broj članova kanonskog TGFβ signalnog puta, i aktiviraju TGFβ signalni put *in vitro*. Prospektivna klinička studija je pokazala da povišena ekspresija hsa-miR-93-5p u serumu ima potencijalni translatorski potencijal kao neinvazivni prognostički biomarker za pojavu ranog recidiva bolesti kod ispitanika sa CRLM. Funkcionalnom karakterizacijom je pokazano da hsa-miR-93-5p utiče na proces angiogeneze stimulacijom formiranja tuba *in vitro*, ali da ne utiče na vijabilnost, ćelijski ciklus, rezistenciju na 5-FU, anoikis i migraciju *in vitro*, kao ni na rast tumora *in vivo*. Buduće studije sa većim brojem pacijenata su potrebne kako bi se validirali prikazani rezultati.

**Ključne reči:** TGFβ signalni put, mikroRNK, hsa-miR-93-5p, metastatski kolorektalni karcinom, metastaze kolorektalnog karcinoma u jetri, hemioterapija, prediktivni biomarker, prognostički biomarker

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika

# The role of microRNAs involved in regulation of TGF $\beta$ signaling pathway in metastatic colorectal cancer - functional analysis and response to therapy

## Abstract

Approximately half of colorectal cancer (CRC) patients will develop metastases (mCRC) during the disease progression, which are characterized by worse prognosis and higher mortality rates. TGF $\beta$  signaling pathway and microRNAs (miRNAs) have key roles in pathogenesis and metastasis of CRC, as well as in chemotherapy resistance. The aim of this research was to analyze the role of miRNAs involved in regulation of TGF $\beta$  signaling in response to therapy, their predictive and prognostic potential in patients with CRC liver metastasis (CRLM) in a prospective clinical study, and their functional role in processes related to CRC carcinogenesis and progression. The study included *in silico* analysis of miRNAs which regulate 10 members of the canonical TGF $\beta$  signaling pathway, and more than 300 unique miRNAs were identified, suggesting that the miRNAs and TGF $\beta$  signaling pathway network is very complex. It was showed that single and combined standard chemotherapeutics used for the treatment of mCRC affect the expression of selected miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p, and hsa-miR-93-5p which regulate most members of the canonical TGF $\beta$  signaling pathway, and activate the TGF $\beta$  signaling pathway *in vitro*. A prospective clinical study showed that elevated serum hsa-miR-93-5p levels has a translational potential as a noninvasive prognostic biomarker for early disease recurrence in subjects with CRLM. Functional characterization has shown that hsa-miR-93-5p affects the process of angiogenesis by stimulating *in vitro* tube formation, however, it does not affect viability, cell cycle, 5-FU resistance, anoikis and migration *in vitro*, as well as tumor growth *in vivo*. Further large-scale studies are needed to validate the presented results.

**Key words:** TGF $\beta$  signaling pathway, microRNA, hsa-miR-93-5p, metastatic colorectal cancer, colorectal cancer liver metastasis, chemotherapy, predictive biomarker, prognostic biomarker

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular genetics



## Lista skraćenica:

<b>5-FU</b>	5-fluorouracil
<b>Abs</b>	apsorbanca (eng. <i>absorbance</i> )
<b>ACF</b>	fokusi izmenjenih kripti (eng. <i>aberrant crypt foci</i> )
<b>AGO</b>	Argonaut
<b>Akt</b>	protein kinaza B
<b>ALK</b>	kinaze slične receptoru za aktivin (eng. <i>activin receptor-like kinases</i> )
<b>BMP</b>	koštani morfogenetski protein (eng. <i>bone morphogenetic protein</i> )
<b>bp</b>	bazni par
<b>CA 19-9</b>	karbohidratni antigen 19-9 (eng. <i>carbohydrate antigen</i> )
<b>CAM</b>	horioalantoisna membrana (eng. <i>chorioallantoic membrane</i> )
<b>CEA</b>	karcinoembrijski antigen (eng. <i>carcinoembryonic antigen</i> )
<b>CIN</b>	hromozomska nestabilnost (eng. <i>chromosomal instability</i> )
<b>CMS4</b>	konsenzusni molekularni podtip 4 (eng. <i>Consensus Molecular Subtype 4</i> )
<b>CRC</b>	kolorektalni karcinom (eng. <i>colorectal cancer</i> )
<b>CRLM</b>	metastaza u jetri poreklom od kolorektalnog karcinoma (eng. <i>colorectal cancer liver metastasis</i> )
<b>CTGF</b>	faktor rasta vezivnog tkiva (eng. <i>connective tissue growth factor</i> )
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	dvostruko-destilovana H <sub>2</sub> O
<b>DEPC</b>	dietilpirokarbonat (eng. <i>diethylpyrocarbonate</i> )
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilovana H <sub>2</sub> O
<b>DMEM</b>	eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	dimetil-sulfoksid
<b>ECOG</b>	eng. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<b>EDTA</b>	eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGFR</b>	receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMT</b>	epitelno-mezenhimalna tranzicija
<b>FBS</b>	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FIRI</b>	5-fluorouracil+irinotekan
<b>FITC</b>	fluorescein izotiocijanat
<b>FOLFIRI</b>	5-fluorouracil+irinotekan+leukovorin
<b>FOLFOX</b>	5-fluorouracil+oksaliplatin+leukovorin
<b>FOX</b>	5-fluorouracil+oksaliplatin
<b>FR</b>	promena u rezistenciji (eng. <i>fold resistance</i> )
<b>G</b>	eng. <i>gap</i>
<b>GDF</b>	faktor rasta i diferencijacije (eng. <i>growth and differentiation factor</i> )
<b>h</b>	čas (eng. <i>hour</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	polovina maksimalne inhibitorne koncentracije (eng. <i>half-maximal inhibitory concentration</i> )
<b>iRNK</b>	informaciona RNK
<b>I-SMAD</b>	inhibitorni SMAD proteini
<b>L</b>	invazija u limfne sudove

<b>MAPK</b>	mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>mCRC</b>	metastatski kolorektalni karcinom (eng. <i>metastatic colorectal cancer</i> )
<b>miRISC</b>	kompleks za utišavanje posredovan miRNK (eng. <i>miRNA-induced silencing complex</i> )
<b>miRNK</b>	mikroRNK
<b>MIS</b>	Muellerian-ova inhibirajuća supstanca (eng. <i>Muellerian inhibiting substance</i> )
<b>MMP</b>	matriksne metaloproteinaze
<b>MSI</b>	mikrosatelitska nestabilnost (eng. <i>microsatellite instability</i> )
<b>MTT</b>	eng. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
<b>n</b>	broj ispitanika
<b>N</b>	čvor (eng. <i>node</i> )
<b>NCBI</b>	eng. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nt</b>	Nukleotid
<b>P</b>	fosforilacija (eng. <i>phosphorilation</i> )
<b>PBS</b>	rastvor fosfatnog pufera (eng. <i>phosphate buffer saline</i> )
<b>PI</b>	propidijum jodid (eng. <i>propidium iodide</i> )
<b>PI3K</b>	fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
<b>PN</b>	invazija u perineuralni prostor
<b>PolyHEMA</b>	eng. <i>poly(2-hydroxyethyl methacrylate)</i>
<b>pre-miRNK</b>	prekursorska mikroRNK
<b>pri-miRNK</b>	primarna mikroRNK
<b>qRT-PCR</b>	kvantitativna reverzno-transkripciona reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>R</b>	Resekcija
<b>Ran-GTP</b>	nuklearni protein srodan Ras proteinu - guanozin-trifosfataza (eng. <i>Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphatase</i> )
<b>RECIST</b>	eng. <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
<b>ROC</b>	eng. <i>receiver operating characteristic</i>
<b>rpm</b>	broj rotacija u minutu (eng. <i>rotations per minute</i> )
<b>RPMI</b>	eng. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>R-SMAD</b>	receptorski SMAD proteini
<b>S</b>	Sinteza
<b>SAD</b>	Sjedinjene Američke Države
<b>SD</b>	standardna devijacija
<b>T</b>	Tumor
<b>TF</b>	transkripcioni faktor
<b>TGFβ</b>	transformišući faktor rasta β (eng. <i>transforming growth factor β</i> )
<b>TNM</b>	eng. <i>Tumor, Node, Metastasis</i>
<b>UTR</b>	netranslatirajući region (eng. <i>untranslated region</i> )
<b>V</b>	invazija u vene
<b>VEGF-A</b>	vaskularni endotelni faktor rasta A (eng. <i>vascular endothelial growth factor A</i> )
<b>WT</b>	divlji tip (eng. <i>wild type</i> )
<b>XPO5</b>	eksportin 5

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Kolorektalna karcinogeneza .....	1
1.2. Metastatski kolorektalni karcinom.....	2
1.2.1. Epidemiologija metastatskog kolorektalnog karcinoma .....	2
1.2.2. Lečenje CRLM.....	2
1.2.2.1. Resekcija jetre .....	2
1.2.2.2. Sistemska hemioterapija .....	3
1.2.2.3. Biološki agensi.....	4
1.3. TGF $\beta$ signalni put .....	5
1.3.1. Učesnici TGF $\beta$ signalne kaskade .....	6
1.3.2. Uloga TGF $\beta$ signalnog puta u tumorima .....	7
1.3.2.1. Tumor-supresivno dejstvo TGF $\beta$ .....	7
1.3.2.2. Tumor-pokretačko dejstvo TGF $\beta$ .....	8
1.3.2.3. TGF $\beta$ signalni put i CRC .....	9
1.3.3. TGF $\beta$ i odgovor na hemioterapiju.....	10
1.4. MikroRNK molekuli.....	10
1.4.1. Biogeneza miRNK .....	11
1.4.2. MiRNK u tumorima .....	12
1.4.2.1. Uloga miRNK u CRC i CRLM.....	13
1.4.3. MiRNK kao prediktivni i prognostički biomarkeri.....	13
1.4.4. Povezanost između TGF $\beta$ signalnog puta i miRNK molekula .....	14
<b>2. CILJEVI</b> .....	17
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	18
3.1. <i>In silico</i> analiza .....	18
3.2. Kultivacija ćelija .....	18
3.3. Pravljenje SW620 <sub>B</sub> ćelija rezistentnih na 5-FU .....	20
3.4. Tretmani ćelija .....	20
3.4.1. Zasejavanje ćelija za tretmane .....	20
3.4.2. Određivanje IC <sub>50</sub> vrednosti 5-FU .....	21
3.4.3. Tretmani ćelija hemioterapeutskim lekovima i/ili bevacizumabom .....	21
3.5. Transfekcija humanih ćelija.....	21
3.6. Analiza vijabilnosti ćelija .....	22
3.6.1. Analiza vijabilnosti ćelija MTT esejem .....	22
3.6.2. Analiza vijabilnosti ćelija kristal violet bojenjem.....	23
3.7. Analiza ćelijske smrti.....	23

3.7.1. Analiza ćelijske smrti metodom protočne citofluorimetrije.....	23
3.7.2. Analiza ćelijske smrti testom onemogućavanja ćelijama da se zalepe za podlogu.....	24
3.8. Analiza ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije.....	25
3.9. Test zarastanja povrede.....	26
3.10. Test formiranja tuba.....	26
3.11. CAM esej.....	27
3.12. Izolacija RNK.....	28
3.12.1. Izolacija RNK iz ćelija i tkiva.....	28
3.12.2. Izolacija RNK iz seruma ispitanika sa mCRC.....	29
3.13. Određivanje koncentracije RNK.....	29
3.14. Reakcija reverzne transkripcije.....	29
3.14.1. Sinteza komplementarne DNK na osnovu miRNK matrice.....	29
3.14.2. Sinteza komplementarne DNK na osnovu iRNK matrice.....	30
3.15. Kvantitativna reverzno-transkripciona reakcija lančanog umnožavanja (qRT-PCR).....	30
3.15.1. Analiza ekspresije miRNK.....	30
3.15.2. Analiza ekspresije iRNK.....	31
3.15.3. Obrada podataka nakon qRT-PCR.....	31
3.16. Biološki materijal poreklom od ispitanika sa CRLM.....	32
3.17. Statistička obrada podataka.....	34
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>35</b>
4.1. <i>In silico</i> identifikacija miRNK koje regulišu članove kanonskog TGFβ signalnog puta.....	35
4.2. Ispitivanje odgovora miRNK hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p i signalnog puta TGFβ na hemioterapiju za mCRC <i>in vitro</i> .....	38
4.2.1. Ekspresija hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.....	38
4.2.2. Promena ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC tokom vremena.....	39
4.2.3. Aktivacija TGFβ signalnog puta nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.....	40
4.2.4. Procena odgovora SW620 <sub>B</sub> ćelija na tretmane standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.....	41
4.2.4.1. Apoptoza SW620 <sub>B</sub> ćelija nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.....	41
4.2.4.2. Ekspresija EMT markera nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.....	42
4.2.5. Efekat kombinovane terapije za lečenje mCRC na vijabilnost SW620 <sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija i ekspresiju hsa-miR-93-5p.....	45
4.2.5.1. Efekat FOX-a u kombinaciji sa bevacizumabom na vijabilnost SW620 <sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija.....	45

4.2.5.2. Efekat FOX-a u kombinaciji sa bevacizumabom na ekspresiju hsa-miR-93-5p .....	46
4.3. Ispitivanje translacionog potencijala hsa-miR-93-5p kao prediktivnog i prognostičkog biomarkera kod ispitanika sa CRLM .....	47
4.3.1. Karakteristike ispitanika sa CRLM .....	47
4.3.2. Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i u okolnom netumorskom tkivu jetre .....	49
4.3.3. Ispitivanje korelacije ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM sa ekspresijom hsa-miR-93-5p u serumu .....	49
4.3.4. Ispitivanje korelacije ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa tumorskim markerima .....	50
4.3.5. Određivanje granične vrednosti ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu ispitanika sa CRLM .....	51
4.3.6. Povezanost visoke i niske ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa CRLM .....	51
4.3.7. Prediktivni potencijal hsa-miR-93-5p za odgovor na terapiju kod ispitanika sa CRLM .....	52
4.3.8. Prognostički potencijal hsa-miR-93-5p za preživljavanje bez recidiva kod ispitanika sa CRLM .....	52
4.3.9. Prognostički potencijal hsa-miR-93-5p i kliničko-patoloških karakteristika ispitanika sa CRLM za pojavu ranog recidiva .....	53
4.4. Funkcionalna karakterizacija hsa-miR-93-5p u procesima relevantnim za kolorektalnu karcinogenezu i odgovor na terapiju <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	54
4.4.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u neizmenjenim ćelijama kolona i ćelijskim linijama CRC .....	54
4.4.2. Određivanje IC <sub>50</sub> vrednosti 5-FU u SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelijama .....	54
4.4.3. Uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU .....	55
4.4.3.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u SW620 <sub>B</sub> ćelijama rezistentnim na 5-FU .....	55
4.4.3.2. Ekspresija hsa-miR-93-5p u adherentnim i plutajućim SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU .....	56
4.4.4. Analiza uspešnosti transfekcije SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelija hsa-miR-93-5p mimikom i inhibitorom .....	57
4.4.5. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p, sa ili bez kotretmana sa 5-FU, na vijabilnost SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelija .....	58
4.4.6. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijsku smrt po tipu anoikis kod SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelija .....	59
4.4.7. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijski ciklus SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelija .....	60
4.4.8. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na sposobnost formiranja tuba SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelija .....	61
4.4.9. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na migraciju SW620 <sub>E</sub> i HCT116 ćelija .....	62
4.4.10. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na rast tumora <i>in vivo</i> .....	63
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	65
5.1. <i>In silico</i> analiza .....	65

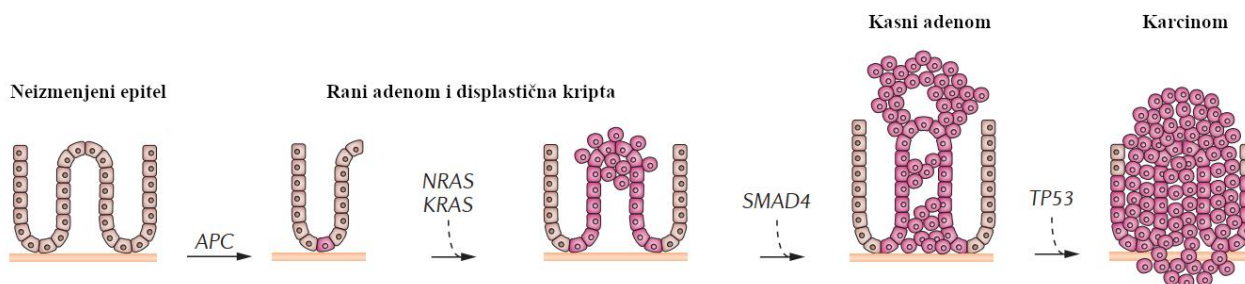
5.2. Odgovor odabranih miRNK na hemioterapiju za lečenje mCRC <i>in vitro</i> i korelacija sa ćelijskim odgovorom.....	66
5.3. Klinički značaj nivoa ekspresije hsa-miR-93-5p u mCRC.....	70
5.3.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u tumorskom tkivu i serumu ispitanika sa CRLM .....	70
5.3.2. Translacioni potencijal hsa-miR-93-5p kao prediktivnog biomarkera kod ispitanika sa CRLM .....	70
5.3.3. Translacioni potencijal hsa-miR-93-5p kao prognostičkog biomarkera kod ispitanika sa CRLM .....	71
5.4. Funkcionalna karakterizacija hsa-miR-93-5p u CRC.....	71
5.4.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u ćelijskim linijama CRC .....	71
5.4.2. Uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU .....	72
5.4.3. Hsa-miR-93-5p i uticaj na vijabilnost i proliferaciju ćelija .....	74
5.4.4. Hsa-miR-93-5p i uticaj na ćelijski ciklus i ćelijsku smrt .....	74
5.4.5. Hsa-miR-93-5p i uticaj na invaziju i migraciju.....	75
5.4.6. Hsa-miR-93-5p i uticaj na angiogenezu.....	75
5.4.7. Hsa-miR-93-5p i uticaj na rast tumora <i>in vivo</i> .....	76
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>77</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>79</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Kolorektalna karcinogeneza

Debelo crevo, dužine 1-1,5m, predstavlja terminalni deo gastrointestinalnog trakta. Digestivna površina humanog debelog creva se sastoji od jednoslojnog epitela koji formira invaginacije koje se nazivaju kripte. Kolorektalni karcinom (eng. *colorectal cancer*, CRC) predstavlja heterogenu bolest koja nastaje postepenom akumulacijom genetičkih i epigenetičkih promena, koje dovode do transformacije normalne mukoze debelog creva u karcinom [1], a zauzima treće i drugo mesto na svetu po stepenu incidence i stopi mortaliteta, respektivno [2]. Prvi uočljivi znak izmene epitela tokom razvoja CRC jeste uočavanje fokusa izmenjenih kripta (eng. *aberrant crypt foci*, ACF), malih hiper- ili displastičnih lezija koje su veće od normalnih kripta, imaju veći perikriptalni prostor, imaju deblji sloj epitelnih ćelija i ovalnim otvorima [3]. Iako će samo mali broj ACF napredovati do CRC, velike ACF sa izmenjenom morfologijom, displastičnom histologijom i različitim genskim mutacijama predstavljaju visokorizične kandidate za razvoj adenoma, benignih polipa epitelnog tkiva žlezdane strukture [4]. Tokom napredovanja adenoma pojavljuje se sve veći broj nediferenciranih ćelija sa izrazitim pleomorfizmom, izmenjenom orijentacijom i neorganizovanim rastom. Ove lezije se takođe nazivaju *in situ* karcinom. Transformacija od adenoma u karcinom može da traje između 10 i 15 godina. Najzad, maligni adenokarcinomi se karakterišu sposobnošću da vrše invaziju u okolno tkivo i da migriraju do distalnih organa gde formiraju metastaze [1].

Opisane korake histoloških promena prate izmene u molekularnim putevima uključenim u normalno funkcionisanje digestivnog epitela. Uopšteno, kolorektalnoj karcinogenezi doprinose aktivacije proto-onkogeno zajedno sa mutacionom inaktivacijom tumor-supresorskih gena, hromozomska nestabilnost (eng. *chromosomal instability*, CIN), mikrosatelitska nestabilnost (eng. *microsatellite instability*, MSI), i fenotip nastao metilacijom CpG ostrva [5]. Tako je poznato da inaktivacija gena *APC* dovodi do razvoja adenoma, mutacija u genu *KRAS* doprinosi rastu adenoma, genetičke promene na hromozomu 18q (uključujući promene u tumor-supresorskom genu *SMAD4*) doprinose progresiji tumora, dok inaktivacija gena *TP53* vodi finalnoj tranziciji ka karcinomu [6] (Slika 1). Pored navedenih promena, otkrivene su i promene u brojnim drugim genima koji doprinose karcinogenezi CRC [7].



**Slika 1. Model nastanka CRC.** Uprošćen model razvoja CRC od normalnog epitela, preko ranog i kasnog adenoma, sa naznačenim genima za koje su najčešće vezane promene u sekvenci koje prate kliničko-patološke promene kod pacijenata. Modifikovano prema Kuipers i sar. [8] i Walther i sar. [9].

## **1.2. Metastatski kolorektalni karcinom**

### **1.2.1. Epidemiologija metastatskog kolorektalnog karcinoma**

Metastatski kolorektalni karcinom (eng. *metastatic colorectal cancer*, mCRC) predstavlja uznapredovali IV stadijum kolorektalnog karcinoma kada je došlo do pojave metastaza u udaljenim delovima tela. Najčešći organ u koji CRC metastazira, pored lokalnih i regionalnih limfnih čvorova, je jetra (eng. *colorectal cancer liver metastasis*, CRLM), ali se metastaze CRC mogu pronaći i u plućima, kostima, mozgu i kičmenoj moždini [10-12]. Kod približno 25% pacijenata sa CRC metastaze se mogu detektovati već pri postavljanju dijagnoze primarnog CRC, dok će oko 50% pacijenata razviti metastaze tokom daljeg toka bolesti [13,14]. Prisustvo i progresija CRLM može biti životno ograničavajući faktor, s obzirom da CRLM predstavljaju uzrok polovine svih smrti pacijenata sa CRC, i stoga doprinose visokom mortalitetu [15]. Primenjujući samo palijativnu negu, srednje ukupno preživljavanje pacijenata sa CRLM je tek oko 5 meseci [16], dok je petogodišnje preživljavanje oko 13% [17]. Međutim, u eri personalizovane medicine i primene različitih modaliteta lečenja koje uključuju resektivnu hirurgiju, sistemsku hemioterapiju i nove ciljane biološke lekove, preživljavanje pacijenata sa CRLM je znatno poboljšano i prelazi 30 meseci [18]. Stoga, kliničko zbrinjavanje pacijenata sa mCRC-om pruža jedinstven izazov u smislu balansiranja koristi i štete lečenja, a uključuje identifikovanje strategija lečenja koje poboljšavaju odgovor na terapiju, i istovremeno ograničavaju toksičnost čime omogućuju sveukupno poboljšanje kvaliteta života pacijenata [19].

### **1.2.2. Lečenje CRLM**

Kada su metastaze ograničene samo na jetru, što je uočeno u 30% slučajeva [12], lečenje CRLM podrazumeva hururšku operaciju jetre (resekcija), sistemsku hemioterapiju, lokalno-regionalne oblike lečenja (termalna ablacija, transarterijska hemo- i radio- embolizacija) i palijativno zbrinjavanje pacijenata [20-22].

#### **1.2.2.1. Resekcija jetre**

Resekcija jetre predstavlja zlatni standard lečenja CRLM [20], i trenutno je jedini vid lečenja koji nudi šansu za izlečenjem i dugoročnim preživljavanjem [22]. Petogodišnje i desetogodišnje preživljavanje pacijenata nakon resekcije jetre iznosi oko 40% i 25%, respektivno [23]. Resekcija jetre se pokazala kao relativno bezbedna procedura, sa <5% mortaliteta prijavljenog nakon operacije [20,24]. Pacijenti su podobni za resekciju jetre ako je moguće obaviti kompletnu resekciju CRLM sa ivicama bez tumora, tako da preostali funkcionalni volumen bude dovoljan da se osigura odgovarajuća postoperativna funkcija jetre. Pacijenti sa metastazama van jetre nisu podobni za resekciju jetre, sem ukoliko se i ove metastaze ne mogu podjednako dobro resekovati [20]. Međutim, kod samo 10-25% pacijenata sa CRLM je moguće izvršiti resekciju jetre u momentu postavljanja dijagnoze, zbog zahvaćenosti jetre metastazama ili ozbiljnih komorbiditeta [20,24-26]. Za ovu grupu pacijenata sistemska neoadjuvantna hemioterapija se primenjuje sa ciljem da se neresektibilna bolest učini resektibilnom, što se u praksi i dešava, međutim kod samo oko 12% pacijenata [26]. Poznato je nekoliko kliničko-patoloških prognostičkih faktora koji koreliraju sa



recidivom u jetri i preživljavanjem poput: margina tumora od minimum 1 cm, TNM stadijum (eng. *Tumor, Node, Metastasis*, TNM) primarnog tumora, interval bez bolesti, broj i veličina metastaza, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima u hilusu jetre i preoperativni nivo CEA (eng. *carcinoembryonic antigen*, CEA) [20,22]. Zbog svega navedenog, odlučivanje o daljem lečenju pacijenata sa CRLM okuplja relevantne stručnjake unutar multidisciplinarnog tima, koji čine makar kolorektalni hirurg, hepatobilijarni hirurg, medicinski onkolog i radiolog, patolog i medicinska sestra koji zajedno donose odluke i optimizuju dalje lečenje kako bi se poboljšao sveukupni ishod bolesti [27].

### 1.2.2.2. Sistemska hemioterapija

Glavni cilj primene neadjuvantne sistemske hemioterapije, sa ili bez bioloških lekova, je da se neresektabilna bolest konvertuje u resektabilnu [14]. Okosnicu lečenja uznapredovalog CRC čini 5-fluorouracil (5-FU), fluorisani pirimidin, za koji se smatra da deluje prvenstveno inhibirajući timidilat sintazu, enzim koji učestvuje u sintezi pirimidina. 5-FU se obično primenjuje sa leukovorinom, redukovanim folatom, koji stabilizuje vezivanje 5-FU za timidilat sintazu, čime se pojačava inhibicija sinteze DNK [28]. Kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću, kombinacija 5-FU i leukovorina smanjuje veličinu tumora za  $\geq 50\%$  kod približno 20% pacijenata i produžava srednje preživljavanje sa 5-6 meseci u slučaju palijativnog lečenja do oko 11 meseci [16,29]. Decenijama, tačnije od sredine 1950-tih do sredine 1990-tih, hemioterapija zasnovana na 5-FU je bila jedina opcija za pacijente sa mCRC [17]. Od 1996. godine, kada je Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (SAD) odobrila upotrebu irinotekana, i 2002. godine upotrebu oksaliplatina, selekcija optimalne strategije za prvu liniju lečenja mCRC je počela da se komplikuje.

Irinotekan (poznatiji i kao CPT-11) je polusintetički derivat prirodnog alkaloida kamptotecina, koji ispoljava citotoksični efekat preko interakcije sa enzimom topoizomeraza I, koji je uključen u odmotavanje DNK tokom replikacije i transkripcije. Irinotekan stabilizuje prekide na DNK tokom ovog procesa, što dovodi do fragmentacije i ćelijske smrti. Irinotekan je prolek koji se hidrolizuje do aktivnog metabolita SN-38 [28]. Pokazano je da je irinotekan u kombinaciji 5-FU+leukovorin (režim poznatiji kao FOLFIRI) značajno povećao stopu odgovora, vreme progresije i preživljavanje pacijenata sa mCRC [30].

Oksaliplatin je lek treće generacije derivata platine, koji dovodi do formiranja adukta DNK i indukuje apoptozu. Iako oksaliplatin primenjen pojedinačno kao lek ima ograničenu efikasnost kada se koristi kao prva ili druga linija lečenja pacijenata sa mCRC, pokazano je da ukoliko se kombinuje sa 5-FU i leukovorinom (režim poznatiji kao FOLFOX) ima klinički benefit [28]. Randomizirane kliničke studije su pokazale da je lečenje FOLFOX režimom bilo superiornije u odnosu na lečenjem samo sa 5-FU i leukovorinom kada se daje kao prva ili druga linija lečenja [31,32]. Analogno FOLFOX režimu, ustanovljen je i CAPOX režim, kada se 5-FU daje u formi njegovog proleka, kapecitabina, za koje je pokazana slična efikasnost poput kombinacije 5-FU+leukovorin [33]. Dakle, u današnjoj kliničkoj praksi se kao standard prve linije lečenja u vidu dublet hemioterapija koriste FOLFOX, CAPOX i FOLFIRI režimi [34]. Izbor između ovih režima se može bazirati na praktičnim pitanjima, preferencama pacijenta i profilu toksičnosti, s obzirom da među ovim režimima nije uočena značajna razlika u njihovoj efikasnosti [35].

Pored pokazane efikasnosti dublet terapija, ubrzo je u studijama II faze otkriveno i sinergističko dejstvo 5-FU, oksaliplatina i irinotekana [36,37], što je dovelo do razvoja FOLFOXIRI režima, sistemske hemioterapije u vidu tripleta sa sva tri navedena citotoksična leka uz pridodat leukovorin.

U III fazi jedne randomizirane studije, ovaj triplet je pokazao veću anti-tumorsku aktivnost i terapijsku efikasnost u poređenju sa FOLFIRI režimom [38].

### 1.2.2.3. Biološki agensi

Korišćenje bioloških agenasa u terapijske svrhe se bazira na ulozi određenih gena u procesu kolorektalne karcinogeneze. Zbog toga su biološki agensi, u formi humanizovanih antitela na određene targete, poput vaskularnog endotelnog faktora rasta A (eng. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A) koji modulira proces angiogeneze, ili receptora epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) koji utiče na progresiju CRC, počeli da se kombinuju sa sistemskom hemioterapijom u lečenju pacijenata sa mCRC [17]. Bevacizumab (monoklonalno antitelo na VEGF-A je odobren za upotrebu 2004. godine, zajedno sa cetuksimabom (monoklonalno antitelo na EGFR), dok je panitumumab odobren 2006. godine, takođe ciljajući EGFR [39]. Najnoviji odobreni lekovi za lečenje mCRC aflibercept, ramucirumab i regorafenib, takođe deluju na anti-angiogenetske mehanizme i primenjuju se kao druga ili kasnija linija lečenja i dovode do umerenog poboljšanja perioda preživljavanja od oko 6 nedelja [40-42].

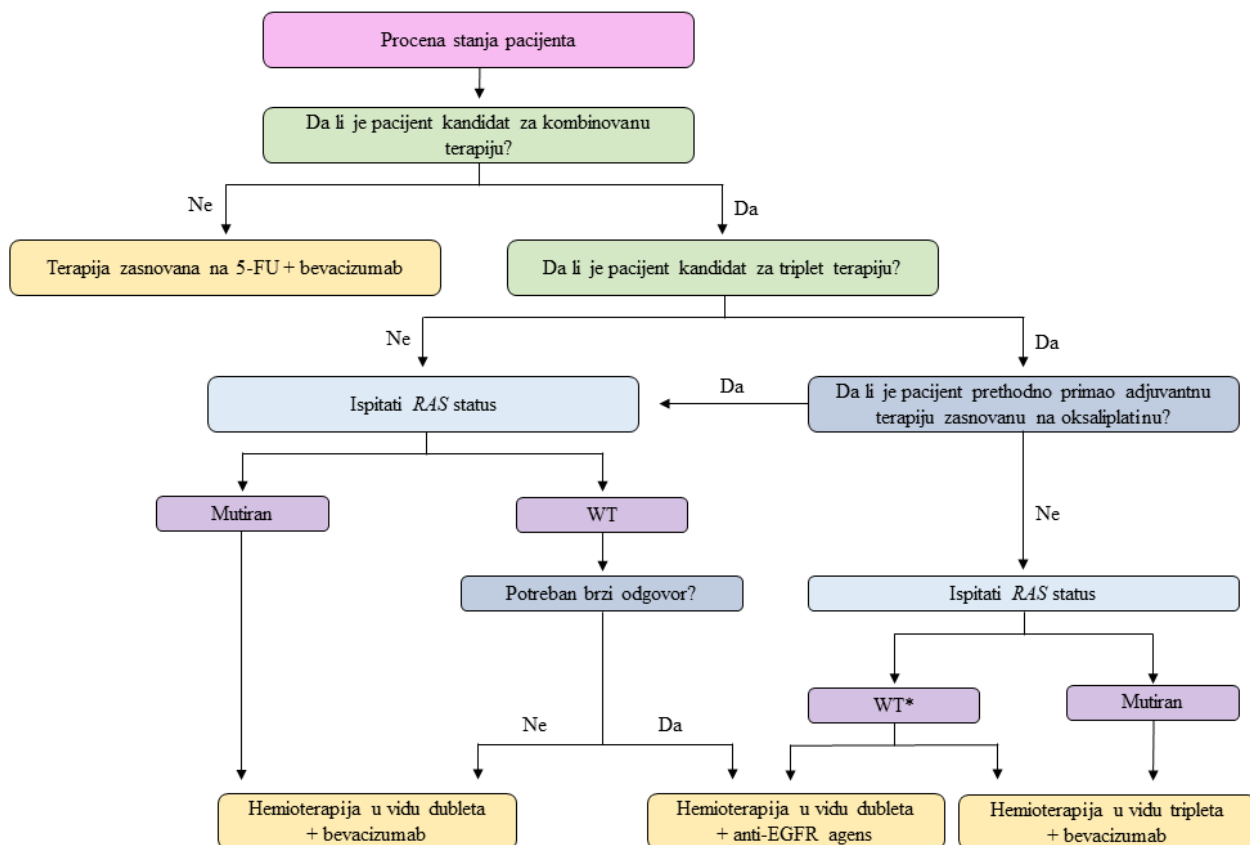
Postojanje nekoliko ciljanih agenasa je navelo istraživače na potragu za optimalnom kombinacijom bioloških agenasa i standardnih hemioterapeutskih lekova [35]. Studija AVF 2107 je pokazala da dodavanje bevacizumaba IFL režimu (sadrži istu kombinaciju lekova kao FOLFIRI režim, s tim da postoji razlika u primenjenoj dozi pojedinačnih lekova i vremenskom profilu njihove primene) dovodi do značajno dužeg srednjeg preživljavanja pacijenata sa mCRC (20,3 meseca prema 15,6 meseci) [43]. Rezultati studije Intergroup N9741 su ukazali na benefit dodavanja bevacizumaba FOLFOX režimu [44]. Objedinjeni rezultati 7 randomiziranih kontrolisanih studija su potvrdili korist upotrebe bevacizumaba sa standardnom dublet hemioterapijom, u poređenju sa samo dublet hemioterapijom [45]. Studija PRIME je pokazala da panitumumab u kombinaciji sa FOLFOX režimom povećava srednje preživljavanje bez bolesti (9,6 meseci i 8,0 meseci), ali je uočen i trend poboljšanja srednjeg ukupnog preživljavanja (23,9 meseci prema 19,7 meseci) [46], dok su slični rezultati dobijeni dodavanjem cetuksimaba FOLFIRI režimu tokom CRYSTAL studije [47].

Poput kombinacije dublet hemioterapija i bioloških agenasa, takođe su ispitivane i kombinacije hemioterapije u vidu tripleta i bioloških agenasa. Tako je pokazano da je kombinacija FOLFOXIRI+bevacizumab superiornija od kombinacije FOLFIRI+bevacizumab [18,48] i FOLFOX+bevacizumab [49]. Međutim, zbog povećane toksičnosti FOLFOXIRI režima koje su pokazale neke od ovih studija, upotreba FOLFOXIRI režima samog ili u kombinaciji sa bevacizumabom je ograničena na pacijente mlađe od 75 godina, dok pacijenti starosti 70-75 godina sa statusom  $>0$  definisanim od strane grupe ECOG (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group*) ne smeju primiti ovu kombinaciju, kao ni pacijenti koji su prethodno primali hemioterapiju zasnovanu na oksaliplatinu [35]. Zbog svega navedenog, prva linija hemioterapije za lečenje mCRC se obično sastoji od kombinacije FOLFOX ili FOLFIRI režima sa biološkim agensima koji ciljaju VEGF ili EGFR.

Uprkos obećavajućem uspehu ovih agenasa, zabrinjavajuće je to što približno 50% pacijenata sa mCRC ne pokazuje odgovor na terapiju, ili čak imaju lošiji ishod usled toksičnosti primenjenih lekova [50]. U vezi sa time, važno je napomenuti da su određene retrospektivne studije pokazale povezanost između aktivirajućih mutacija u egzonu 2 gena *KRAS* i odgovora na terapiju koje ciljaju EGFR [51,52]. Odnosno, primena cetuksimaba i panitumumaba je imala koristi samo kod pacijenata sa divljim tipom *KRAS* gena (*KRAS*<sup>WT</sup>) [53,54]. Nekoliko studija je pokazalo da pored

egzona 2 *KRAS* gena, i mutacije u drugim egzonima ovog gena, ali i *NRAS* gena, mogu predvideti rezistenciju na cetuksimab i panitumumab [55,56]. Zbog toga je genetičko testiranje *RAS* statusa ušlo u kliničku praksu kako bi se selektovali pacijenti koji će imati benefita od ciljane terapije na EGFR [17]. Pored testiranja *RAS* statusa, u kliničkim uslovima ne postoje drugi validirani biomarkeri koji bi predvideli delovanje standardnih hemioterapeutskih lekova kod pacijenata sa mCRC [14,57].

Objedinjavanjem do sada poznatih literaturnih podataka, na Slici 2 je predstavljen algoritam personalizovanog lečenja pacijenata sa mCRC u okviru prve linije lečenja.



**Slika 2. Algoritam personalizovanog lečenja pacijenata sa mCRC u okviru prve linije lečenja.**

Legenda: \* odabir tretmana bi trebalo zasnivati na različitim profilima toksičnosti između ovih režima, s obzirom da ne postoje direktna poređenja između dublet hemioterapije + anti-EGFR agenasa i triplet hemioterapije + bevacizumab kod  $RAS^{WT}$  pacijenata. WT - divlji tip (eng. *wild type*). Preuzeto i modifikovano od Cremolini i sar. [35].

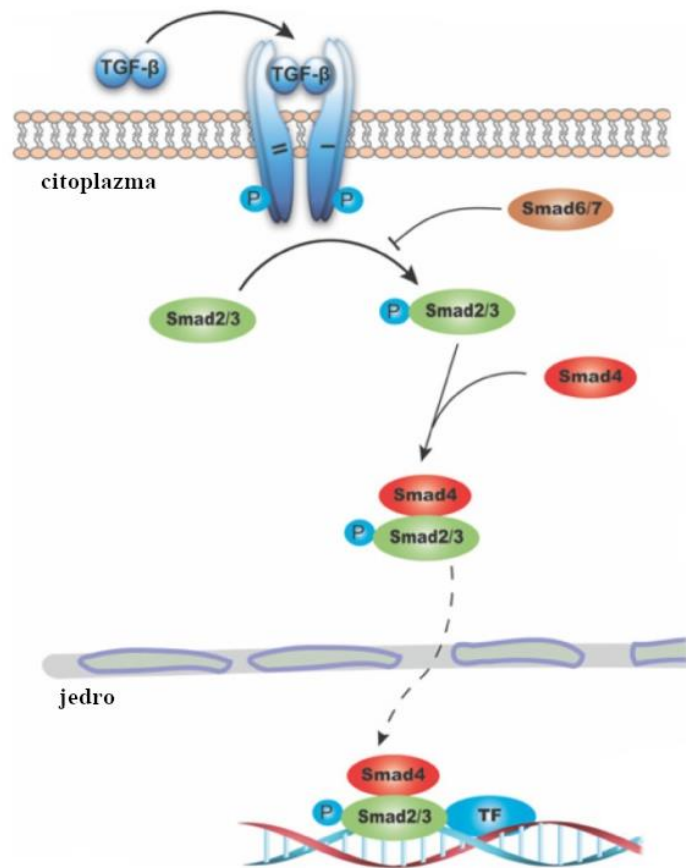
### 1.3. TGF $\beta$ signalni put

Familija proteina transformišućih faktora rasta  $\beta$  (eng. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) je veoma očuvana tokom evolucije metazoa, a sastoji se od preko 35 članova koji kontrolišu različite procese razvika, od gastrulacije i telesne asimetrije do organ-specifične morfogeneze i tkivne homeostaze kod adulta [58]. Na ćelijskom i fiziološkom nivou, članovi familije TGF $\beta$  regulišu proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, preživljavanje, apoptozu, angiogenezu, epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) i imunonadzor [59]. Funkcija TGF $\beta$  je precizno regulisana i

specifična za ćelijski tip i fiziološki kontekst. S obzirom da članovi TGF $\beta$  familije imaju ključne uloge u razvoju i tkivnoj homeostazi, perturbacije u TGF $\beta$  signalizaciji su povezane sa ozbiljnim razvojnim poremećajima i različitim bolestima uključujući maligne bolesti, fibrozu i autoimune bolesti [60].

### 1.3.1. Učesnici TGF $\beta$ signalne kaskade

TGF $\beta$  signalna kaskada počinje vezivanjem liganda za odgovarajuće receptore, čijom se aktivacijom dalje aktiviraju proteini udruženi sa ovim receptorima koji interagujući sa drugim proteinima signal dalje prenose do jedra, gde se vrši regulacija ekspresije ciljnih gena. TGF $\beta$  familija liganada pripada citokinima, a sastoji se od 2 podfamilije TGF $\beta$ /Aktivin/Nodal podfamilije i BMP (eng. *bone morphogenetic protein*) /GDF (eng. *growth and differentiation factor*) /MIS (eng. *Muellerian inhibiting substance*) podfamilije na osnovu sličnosti njihovih sekvenci i specifičnih signalnih puteva koje oni regulišu [61]. Kod sisara su eksprimirane 3 izoforme TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, i TGF $\beta$ 3), od kojih je TGF $\beta$ 1 najčešća i univerzalno eksprimirana izoforma. TGF $\beta$  se sekretuje u vanćelijski matriks kao neaktivna forma u vidu homodimernog liganda, dok njegova aktivacija podrazumeva proteolitičko isecanje i oslobađanje iz proteinskog kompleksa. Jednom aktivirani, TGF $\beta$  ligandi regulišu ćelijske procese vezivanjem za 3 tipa receptora: receptori TGF $\beta$  tipa I (T $\beta$ RI), receptori TGF $\beta$  tipa II (T $\beta$ RII), i receptori TGF $\beta$  tipa III (T $\beta$ RIII, ili betaglikan). T $\beta$ RIII funkcioniše tako što vezuje TGF $\beta$  ligand i prebacuje ga na T $\beta$ RI i T $\beta$ RII [59]. T $\beta$ RI i T $\beta$ RII su transmembranski receptori po tipu serin/treonin kinaza, koji formiraju heterotetramerne komplekse u prisustvu liganda. Kod čoveka i ostalih sisara postoji 5 vrsta T $\beta$ RII i 7 vrsta T $\beta$ RI receptora koji se još nazivaju i kinaze slične receptoru za aktivin (eng. *activin receptor-like kinases*, ALK). Nakon vezivanja liganda, dolazi do fosforilacije T $\beta$ RI od strane T $\beta$ RII, čime se aktivira njegova kinazna aktivnost (Slika 3). Svaki član TGF $\beta$  superfamilije se vezuje za određenu kombinaciju receptora T $\beta$ RI i T $\beta$ RII. Aktivirani T $\beta$ RI fosforiliše, i na taj način aktivira, receptorske SMAD proteine (R-SMAD), članove familije proteina SMAD. U TGF $\beta$ /aktivin putu signal se najčešće prenosi preko receptorskih proteina SMAD2 i SMAD3, dok se BMP/GDF signali prenose preko proteina SMAD1, SMAD5 i SMAD8. Aktivirani R-Smad proteini se udružuju sa zajedničkim medijatorom, proteinom SMAD4. Nastali SMAD oligomer koji se sastoji od dimera odgovarajućih R-SMAD proteina i SMAD4, dalje se transportuje u nukleus. Nukleusni SMAD kompleksi se vezuju za hromatin i zajedno sa drugim transkripcionim regulatorima koji ih regrutuju do specifičnih promotorskih elemenata, regulišu ekspresiju ciljnih gena, poput *PAI-1*, *SNAIL* i drugih. Između ostalog, TGF $\beta$ - ili BMP-specifični SMAD kompleksi indukuju ekspresiju inhibitornih SMAD proteina (I-SMAD), SMAD6 i SMAD7, koji negativno regulišu jačinu i trajanje signalizacije, formirajući negativnu povratnu spregu [58,62]. Opisana signalna kaskada predstavlja kanonski TGF $\beta$  signalni put delovanja TGF $\beta$  u ćeliji, međutim, poznato je da TGF $\beta$  može delovati i preko mehanizama nezavisnih od SMAD proteina koji uključuju mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K)/Akt (protein kinaza B) put [59].



**Slika 3. Kanonski TGFβ signalni put.** Legenda: P - fosforilacija, TF - transkripcioni faktor. Preuzeto i modifikovano od Zhao i sar. [63].

### 1.3.2. Uloga TGFβ signalnog puta u tumorima

S obzirom da TGFβ signalni put učestvuje u važnim biološkim funkcijama, narušavanje ovog signalnog puta je blisko povezano sa nastankom malignih tumora. Međutim, pokazano je da TGFβ može imati dihotomu ulogu u humanim tumorima, odnosno da može pokazivati tumor-supresivno i tumor-pokretačko dejstvo [64], što je poznatije i kao TGFβ paradoks [65]. Danas se ovaj paradoks objašnjava time da TGFβ ima funkciju tumor-supresora u ranim fazama tumorigeneze, a da tokom progresije tumora dolazi do promene njegovog dejstva u tumor-pokretačko [66]. Ulogu tumor-supresora TGFβ ispoljava kroz regulaciju ćelijske proliferacije i apoptoze, dok se tumor-pokretačko dejstvo ogleda kroz regulaciju invazije, migracije, EMT, vanćelijskog matriksa, angiogeneze i imunskog sistema (Slika 4) [59,67].

#### 1.3.2.1. Tumor-supresivno dejstvo TGFβ

TGFβ je potentni inhibitor ćelijske proliferacije tako što reguliše inhibitore ciklin-zavisnih kinaza pri čemu dolazi do zastoja u G1 fazi ćelijskog ciklusa tokom proliferacije [68-71]. Međutim, kada usled mutacija, delecija ili izmenjene ekspresije ključnih komponenti ovog signalnog puta dođe do narušavanja njegove funkcije, ovaj anti-proliferativni efekat se gubi i dolazi do nekontrolisane

proliferacije ćelija zbog nemogućnosti zaustavljanja u G1 fazi ćelijskog ciklusa [64]. TGF $\beta$  takođe indukuje ćelijsku smrt po tipu apoptoze aktivirajući kaspaze [72], povišanjem ekspresije pro-apoptotskih proteina, i/ili smanjivanjem ekspresije anti-apoptotskih proteina [73]. Bitna karakteristika tumorskih ćelija je rezistencija na TGF $\beta$  signale kojima se indukuje apoptoza [59].

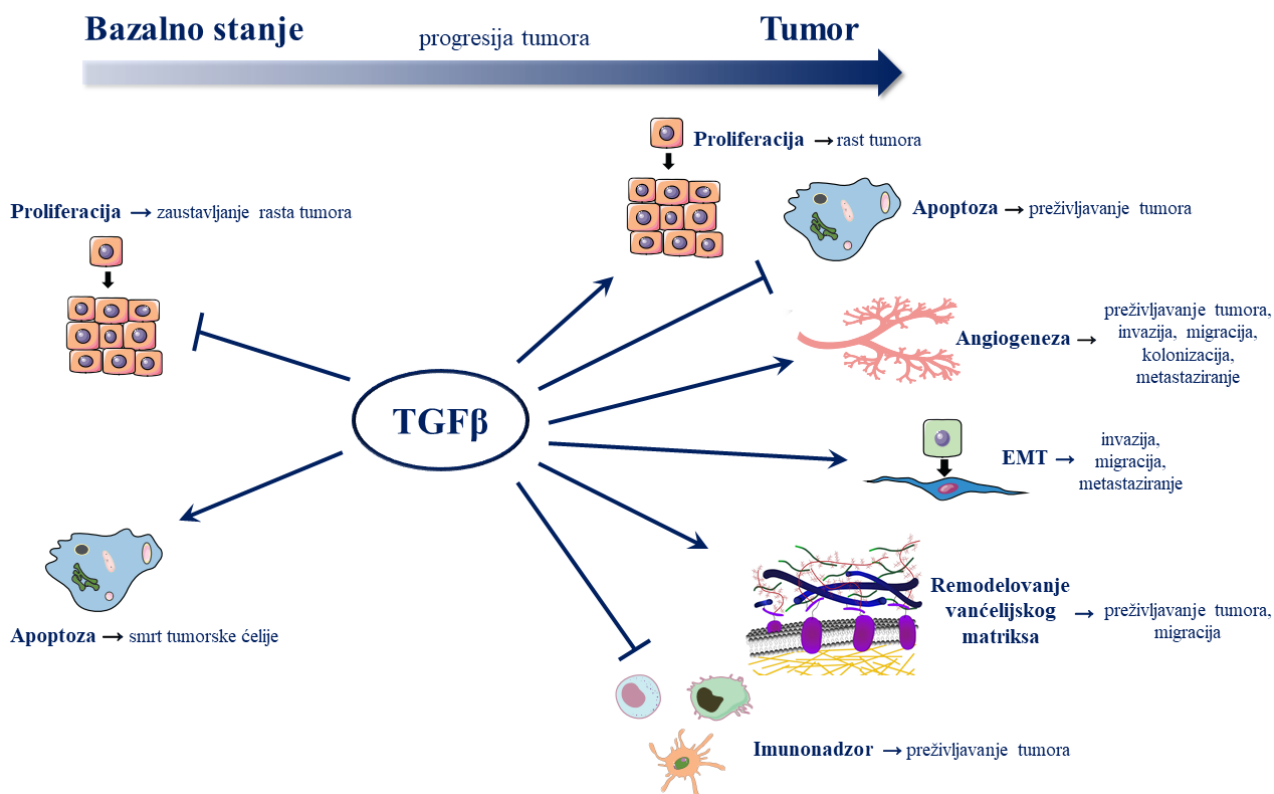
### 1.3.2.2. Tumor-pokretačko dejstvo TGF $\beta$

Kliničke studije su pokazale pro-onkogeno dejstvo TGF $\beta$ . Naime, povišena ekspresija TGF $\beta$  je pokazana u metastazama u limfnim čvorovima u odnosu na primarni tumor. Takođe, povišena ekspresija TGF $\beta$  značajno korelira sa povišenom invazivnošću, progresijom bolesti i lošijom prognozom [74-80].

Solidni tumori ispoljavaju svoje letalno dejstvo kroz invaziju u okolna tkiva i metastaziranje u udaljene delove tela, što se odigrava kroz kompleksne interakcije tumorske ćelije i okolnog matriksa [59]. U osnovi ovog procesa se nalazi EMT. Tokom EMT tumorske ćelije gube polarnost i međućelijske interakcije, odnosno gube epitelijalnu morfologiju i poprimaju karakteristike mezenhimalnih ćelija, što im omogućava da migriraju. Na molekularnom nivou dolazi do snižavanja ekspresije epitelnog markera adhezije *CDH1*, i povišene ekspresije mezenhimalnih markera poput *VIM*, posredstvom transkripcionih regulatora *SNAIL*, *ZEB1*, *TWIST* i drugih [81]. Jedan od glavnih inicijatora EMT je TGF $\beta$  [82].

TGF $\beta$  ima i snažno dejstvo na samu tumorsku mikrosredinu. Naime, TGF $\beta$  dovodi do remodelovanja vanćelijskog matriksa kroz povećavanje ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP). MMP vrše razgradnju vanćelijskog matriksa otvarajući put tumorskim ćelijama za invaziju i migraciju [64,66]. Pored samih tumorskih ćelija, TGF $\beta$  mogu proizvoditi i okolne ćelije tumorske mikrosredine, uključujući stromalne ćelije, makrofage i trombocite čime se dodatno obezbeđuje rast tumora i progresija [83-85]. S obzirom na brzi razvoj tumora, postojeća vaskulatura brzo postaje nedovoljna, zbog čega dolazi do formiranja novih krvnih sudova procesom angiogeneze, kako bi se obezbedio protok nutrijenata i kiseonika [86]. TGF $\beta$  je jedan od nekoliko citokina koji indukuju angiogenezu, dok je povišena ekspresija TGF $\beta$  povezana sa većom gustinom krvnih sudova, što takođe korelira sa lošijom prognozom [77]. TGF $\beta$  može uticati na oslobađanje pro-angiogenetskih faktora kao što je VEGF i faktor rasta vezivnog tkiva (eng. *connective tissue growth factor*, CTGF) iz epitelnih ćelija i fibroblasta, koji direktno stimulišu endotelne ćelije da formiraju krvne sudove [87,88]. Takođe, TGF $\beta$  utiče na migraciju endotelnih ćelija što je neophodno za proces angiogeneze [89,90].

Tumorske ćelije eksprimiraju specifične antigene koji bi inače bili prepoznati od strane imunskog sistema što bi dovelo do uništenja tumorske ćelije. Međutim, tokom tumorogeneze većina tumorskih ćelija stiče sposobnost da izbegne imunskom sistemu. Glavni mehanizam kojim tumorske ćelije odolevaju imunskom sistemu je posredstvom TGF $\beta$ -indukovane imunosupresije i smanjenog imunonadzora [59]. S obzirom da je ekspresija TGF $\beta$  često povišena u tumorima i okolnoj mikrosredini, tumorske ćelije su sposobne da izbegnu uništenje od strane imunskog sistema. Inhibicija imunskog sistema posredovana TGF $\beta$  obuhvata sve komponente imunskog sistema. Naime, TGF $\beta$  inhibira aktivnost citotoksičnih T ćelija, suprimira aktiviranje urođenoubilačkih ćelija, onemogućava diferencijaciju dendritskih ćelija, i menja polarizaciju neutrofila i makrofaga od anti-tumorskog ka tumorogenom fenotipu [64].



**Slika 4. Uloga TGF $\beta$  signalnog puta kao tumor-supresora ili pokretača tumora.** Linije koje se završavaju strelicom označavaju procese koje aktivira TGF $\beta$ , dok linije koje se završavaju crticom označavaju procese koji su inhibirani od strane TGF $\beta$ . Preuzeto i modifikovano od Huang i sar. [64] i Yang i sar. [67].

### 1.3.2.3. TGF $\beta$ signalni put i CRC

S obzirom da TGF $\beta$  signalni put učestvuje u kontroli ćelijskih procesa kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i apoptoza, istraživanja su pokazala da narušavanje funkcije ovog puta ima ključnu ulogu u inicijaciji, progresiji i napredovanju brojnih malignih tumora, uključujući CRC [91]. Pokazano je da TGF $\beta$  inhibira proliferaciju normalnih intestinalnih epitelnih ćelija i stimuliše njihovu diferencijaciju [92,93]. Dok su intestinalne epitelne ćelije i dobro diferencirani adenomi senzitivni na inhibiciju od strane TGF $\beta$ , ćelije poreklom od slabo diferenciranih invazivnih CRC su izgubile osetljivost na TGF $\beta$  [94]. Zbog toga je gubitak TGF $\beta$  signalizacije i njegovog anti-proliferativnog efekta jedna od ključnih karakteristika ćelija CRC [95]. Gubitak senzitivnosti na TGF $\beta$  je kod CRC posledica mutacija, izmenjene ekspresije i aktivnosti TGF $\beta$  liganada, receptora i SMAD proteina [59].

Pokazano je da povišeni nivo TGF $\beta$ 1 značajno korelira sa progresijom bolesti do metastaza, i da je nezavisan od nodalnog statusa i stepena diferencijacije primarnog CRC. Takođe, kod pacijenata sa visokim nivoom TGF $\beta$  u primarnom CRC, postoji veća verovatnoća za recidivom bolesti i pojavom metastaza u jetri nakon tretmana u poređenju sa pacijentima sa niskim nivoom TGF $\beta$  [79]. Takođe, preoperativni nivo TGF $\beta$  je prediktivni faktor za razvoj CRLM nakon kurativne resekcije [96]. Aktivni TGF $\beta$  se može koristiti kao tumor marker CRC, jer je pokazano da postoji korelacija između Dukes-ovog stadijuma i koncentracije aktivnog TGF $\beta$  u plazmi [97].

Mutacije u genu *TGFBR2* predstavljaju najčešći mehanizam gubitka TGF $\beta$  signalizacije kod CRC [98]. Mutacije u ovom genu se vrlo često detektuju kod CRC sa MSI. Naime, više od 80% ćelija CRC sa MSI ima bialelske mutacije u genu *TGFBR2* koje kodiraju skraćeni protein [99], čime se inaktivira tumor-supresorska uloga TGF $\beta$ . Gubitak ekspresije *TGFBR2* usled mutacija kod kasnih adenoma je povezan sa njihovom progresijom do malignih karcinoma [100]. Dok mutacije u *TGFBR2* onemogućavaju njegovu tumor-supresorsku ulogu, ponovna ekspresija *TGFBR2* suprimira proces tumorigeneze, ukazujući da je *TGFBR2* tumor-supresorski gen [101,102].

Mutacije u genu *SMAD4* takođe imaju značajnu ulogu u karcinogenezi CRC. Gubitak aktivacije *SMAD4* i/ili ekspresije se dešava u proseku kod 10-38% slučajeva CRC [59,63]. Ovi pacijenti imaju lošiju prognozu zbog povezanosti *SMAD4* sa naprednim oblikom bolesti i prisustvom metastaza u vreme postavljanja dijagnoze [103-105]. Gubitak funkcije proteina *SMAD4* se dešava u kasnijim stadijumima maligniteta. Stopa učestalosti mutacija gena *SMAD4* se povećava sa progresijom bolesti: 0% kod adenoma, 10% kod intramukozalnih karcinoma, 7% kod invazivnih karcinoma bez distalnih metastaza, 35% kod primarnih invazivnih karcinoma sa distalnim metastazama [106]. Takođe, nizak nivo *SMAD4* proteina ili iRNK kod CRC ukazuje na slabiji odgovor na hemioterapiju i značajno kraće preživljavanje u poređenju sa pacijentima čiji tumori eksprimiraju visok nivo *SMAD4* [91]. Somatske mutacije u drugim *SMAD* genima su takođe identifikovane, ali sa nižom učestalošću. Pored somatskih, mutacije u germinativnim ćelijama takođe dovode do razvoja neoplazija kolona [95].

Tokom poslednje decenije razvijeno je nekoliko agenasa koji pogađaju određene korake tokom TGF $\beta$  signalne kaskade. Mnogi od njih su već ušli u klinička ispitivanja sa obećavajućim terapijskim rezultatima. Međutim, s obzirom da TGF $\beta$  može ostvarivati tumor-supresorsko i tumor-pokretačko dejstvo, neophodno je ispitati kada, kako i u kojoj količini bi trebalo primeniti anti-TGF $\beta$  terapiju kako bi ona imala željeno dejstvo [59,67,91].

### 1.3.3. TGF $\beta$ i odgovor na hemioterapiju

Efekat hemioterapije u suzbijanju tumora je često smanjen usled razvoja rezistencije. U poslednjih nekoliko godina, nekoliko studija je ukazalo na ulogu TGF $\beta$  signalnog puta u rezistenciji na anti-tumorske lekove, kako na standardne, tako i na targetovane agense za lečenje mCRC [107-109]. Naime, pokazano je da je aktivacija TGF $\beta$  signalnog puta povezana sa rezistencijom na hemioterapiju [107,108]. Jedan od poznatih mehanizama je inhibicija apoptoze uzrokovane hemioterapijom [108]. Efekat standardnih hemioterapeutika za lečenje mCRC na članove TGF $\beta$  signalnog puta je takođe proučavan. Naime, pokazano je da 5-FU i oksaliplatin utiču na fosforilaciju i ekspresiju članova TGF $\beta$  signalnog puta [109,110]. Otkrivanje drugih mehanizama koji povezuju TGF $\beta$  signalni put i odgovor na hemioterapiju je od velikog interesa za razvoj novih terapeutika.

## 1.4. MikroRNK molekuli

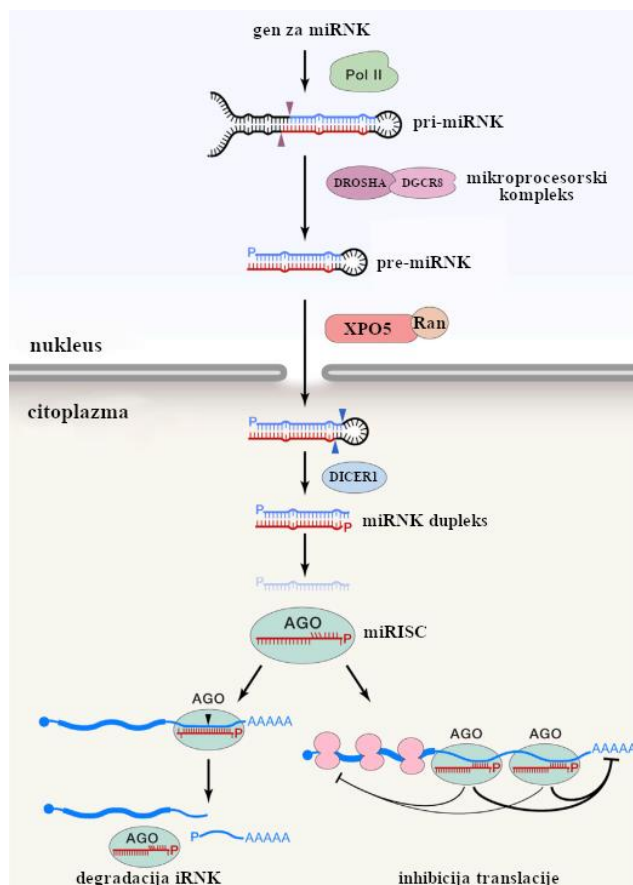
MikroRNK (miRNK) molekuli su jednolančani nekodirajući RNK molekuli. Obično su dugački oko 22 nukleotida (nt) (opseg 18-25) i pripadaju grupi malih regulatornih RNK, s obzirom da negativno regulišu gensku ekspresiju na post-transkripcionom nivou na način specifičan za sekvencu [111]. MiRNK svoju funkciju utišavanja genske ekspresije vrše vezivanjem za



informacionu RNK (iRNK). Prema bioinformatičkim predikcijama, miRNK sisara mogu da regulišu od 30-60% svih protein-kodirajućih gena [112,113]. Do sada je kod čoveka otkriveno na stotine različitih miRNK, od kojih su mnoge evoluciono očuvane kod drugih životinja [114]. Poznato je da jedna miRNK može regulisati na stotine ili hiljade iRNK, kao i da jedna iRNK biva regulisana od strane različitih miRNK [115]. Zbog toga su miRNK uključene u regulaciju različitih ćelijskih funkcija kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza [116], a usled njihove izmenjene ekspresije nastaju promene u fiziološkim i razvojnim procesima i patoloških pojava, poput tumora.

#### 1.4.1. Biogeneza miRNK

Do sada je otkriveno više od 1000 gena za miRNK u humanom genomu. Trećina gena miRNK se nalazi u intronima protein-kodirajućih gena, dok ostali miRNK geni imaju definisane genske lokuse [115]. Kod većine životinja, uključujući i ljude, kanonske miRNK se prepisuju pomoću RNK polimeraze II u vidu dugačkog transkripta sa strukturama ukosnice koji se naziva primarni-miRNK transkript (pri-miRNK) (Slika 5). U nukleusu, pri-miRNK prepoznaje mikroprocesorski kompleks koji iseca strukturu ukosnice koja sadrži zrelu miRNK. Mikroprocesorski kompleks čine endonukleaza DROSHA i dva molekula partnerskog proteina DGCR8. DROSHA vrši isecanje pri-miRNK do prekursorske-miRNK (pre-miRNK) od oko 60-70 nt. Pomoću proteina eksportina 5 (XPO5) i Ran-GTP-aze (eng. *Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphatease*) pre-miRNK se transportuje iz nukleusa u citoplazmu. Pre-miRNK u citoplazmi prepoznaje protein DICER1, koji poput proteina DROSHA, vrši endonukleolitičko isecanje oba lanca u blizini petlje, čime se generiše kratki, neperfektno-spareni miRNK dupleks (miRNK:miRNK\*) koga čine zrela sekvenca miRNK i njegov komplementarni prateći lanac (miRNK\*). MiRNK dupleks se inkorporira u protein Argonaut (AGO), gde se zrela miRNK zadržava, a prateći lanac odbacuje, i ubrzo biva degradovan. Ovako formiran nukleoproteinski kompleks se naziva kompleks za utišavanje posredovan miRNK (eng. *miRNA-induced silencing complex*, miRISC). Zrela miRNK u miRISC kompleksu navodi ceo kompleks do komplementarnih sekvenci koje se najčešće nalaze u 3' netranslatirajućem regionu (eng. *untranslated region*, UTR) iRNK gde se vrši post-transkripciona represija u vidu degradacije iRNK ili inhibicije translacije [111,114,117,118]. Stepem komplementarnosti miRNK i iRNK u regionu semena (eng. *seed region*) miRNK određuje mehanizam utišavanja. Ukoliko je komplementarno sparivanje između miRNK i ciljne iRNK u region semena potpuno (~7 nt) doći će do degradacije iRNK, a ukoliko je sparivanje nepotpuno dolazi do inhibicije translacije (5-6 nt) [116].



**Slika 5. Biogeneza kanonskih miRNK.** Legenda: ljubičaste strelice - isecanje od strane mikroprocesorskog kompleksa, plave strelice - isecanje od strane DICER1, P - 5' fosfat. Preuzeto i modifikovano od Bartel [114].

#### 1.4.2. MiRNK u tumorima

Izmenjena ekspresija miRNK je pokazana u brojnim tumorima [119], kao što su limfomi [120], karcinom dojke [121], glioblastom [122], hepatocelularni karcinom [123], karcinom pluća [124], karcinom pankreasa [125], karcinom prostate [126] i CRC [127,128]. MiRNK mogu imati onkogenu ili tumor-supresorsku ulogu u tumorima [115,119], ali je pokazano i da jedna miRNK u jednom tipu tumora može ispoljavati onkogeno dejstvo, dok u drugom tipu tumora može biti tumor-supresor [129]. Tumorska tkiva obično odlikuje globalno smanjenje ekspresije miRNK [130], kao posledica gubitka genetičke informacije, epigenetičkog utišavanja, usled defekata u procesu biogeneze miRNK, ili globalne transkripcione represije [129]. S obzirom da miRNK regulišu ekspresiju na stotine iRNK, promena ekspresije jedne miRNK ima snažne posledice na mnoge unutarćelijske signalne puteve [129,131]. Pored izmenjene ekspresije u tumorima, miRNK mogu uticati i na rast, razvoj, progresiju i metastaziranje tumora [115,129], regulišući procese povezane sa tumorogenezom poput proliferacije [132], apoptoze [133], invazije i migracije [134]. S obzirom da profili ekspresije miRNK koreliraju sa kliničkim i biološkim karakteristikama tumora kao što je tip tkiva, stepen diferencijacije, agresivnost i odgovor na terapiju, miRNK su izučavane i kao potencijalni dijagnostički, prognostički i prediktivni biomarkeri [119]. Pored potencijalnih biomarkera, miRNK su proučavane i u cilju lečenja tumora. Strategije korišćenja miRNK u terapijske svrhe podrazumevaju inhibiciju prekomerno eksprimiranih onkogenih miRNK i ponovno vraćanje ekspresije utišanih tumor-supresorskih miRNK [129,131,135].

### 1.4.2.1. Uloga miRNK u CRC i CRLM

Još 2003. godine je pokazana izmenjena ekspresija miRNK u CRC u poređenju sa normalnom mukozom creva [127]. Od tada su brojne studije potvrdile da je obrazac ekspresije miRNK konzistentno i reproducibilno izmenjen u CRC [136]. Pored izmenjene ekspresije u CRC, miRNK učestvuju i u napredovanju CRC tako što regulišu ekspresiju ključnih gena signalnih puteva uključenih u proces tumorigeneze, poput WNT/ $\beta$ -katenin, TGF $\beta$ , EGFR i TP53 signalnih puteva [137]. Da miRNK imaju važnu ulogu u ranom razvoju CRC govori i činjenica da se miRNK obrasci ekspresije razlikuju kod normalne mukoze creva, adenoma kolona i kolorektalnih karcinoma [138]. MiRNK utiču na inicijaciju i razvoj CRC regulišući ćelijsku proliferaciju i EMT, a time i njegovu invaziju i migraciju [139].

MiRNK su uključene i u proces metastaziranja CRC. Naime, miRNK mogu regulisati svaki korak metastaziranja CRC počev od angiogeneze, invazije i intravazacije do regulacije cirkulacije, ekstravazacije i metastatskog naseljavanja udaljenih organa [140]. Neke od onkogenih miRNK povezanih sa CRLM koje su do sada opisane u literaturi su miR-19 [141], miR-885-5p [142], miR-20a-5p [143], miR-21 [144], miR-155 [144], miR-181a [145] i miR-429 [146], dok miR-200c [147], miR-26a/26b [148], miR-30e-5p [149], miR-125 [150], miR-127 [150], miR-145 [150], miR-194 [150], miR-199a-30 [150], miR-15b [151] i miR-30a-5p [152] imaju tumor-supresorsku ulogu u CRLM. Nastanak CRLM zahteva prethodno remodelovanje mikrosredine u jetri, kako bi se cirkulišuće tumorske ćelije CRC nastanile u ovom organu. MiRNK molekuli koji se nalaze u specijalnim strukturama poreklom od ćelija primarnog CRC nazvanim egzozomima (male vanćelijske vezikule prečnika od 30-100 nm okružene lipidnim dvoslojem) su odgovorni za pripremu sekundarne metastatske niše [137,153]. Izučavanje miRNK uključenih u razvoj CRLM je trenutno veoma aktuelno, i verovatno će u bliskoj budućnosti biti otkriveno još ovih molekula koji bi bili značajni kao potencijalni biomarkeri ili terapijski agensi ili targeti.

### 1.4.3. MiRNK kao prediktivni i prognostički biomarkeri

Pored operacije, sistemska i ciljana hemioterapija predstavljaju glavne vidove terapije pacijenata sa CRLM. Međutim, kao što je ranije napomenuto, približno 50% pacijenata sa mCRC ne pokazuje odgovor na terapiju [50] usled urođene ili stečene rezistencije, što dovodi do nezadovoljavajuće terapijske efikasnosti [154]. Zbog toga bi izuzetno bili korisni prediktivni biomarkeri koji bi mogli da stratifikuju pacijente prema riziku od razvoja rezistencije na datu terapiju, odnosno predvideli odgovor na terapiju, ali i navodili lekare na pravi izbor terapije koja bi bila najdelotvornija za datog pacijenta. Takođe, time bi se i sprečilo da neki pacijenti dobijaju toksičnu terapiju od koje ne bi imali nikakav benefit. Sve više studija ide u prilog tome da bi se miRNK mogli koristiti kao prediktivni biomarkeri za odgovor na terapiju koja se koristi za lečenje mCRC. Naime, pokazano je da ekspresija određenih miRNK korelira sa odgovorom na 5-FU i oksaliplatin *in vitro* [155,156]. Neke miRNK su povezane sa odgovorom na terapiju tako što regulišu metabolizam i transport lekova u ćeliji, odgovor ćelije na oštećenja DNK i apoptozu [157]. Pored *in vitro* studija, pokazano je da je ekspresija brojnih miRNK povezana sa odgovorom na terapiju zasnovanu na standardnim hemioterapeutcima, anti-VEGR i anti-EGFR-ciljanu terapiju kod pacijenata sa mCRC [158,159]. Neke od opisanih miRNK sa ovom ulogom su Let-7c/miR-99a/miR-125b [160], miR-181a [161], miR-31-5p [162,163], miR-31-3p [164-166] i miR-664-3p [167]. Iako brojne studije podržavaju potencijalnu upotrebu miRNK kao prediktivnih biomarkera, dosadašnja istraživanja nisu iznedrila

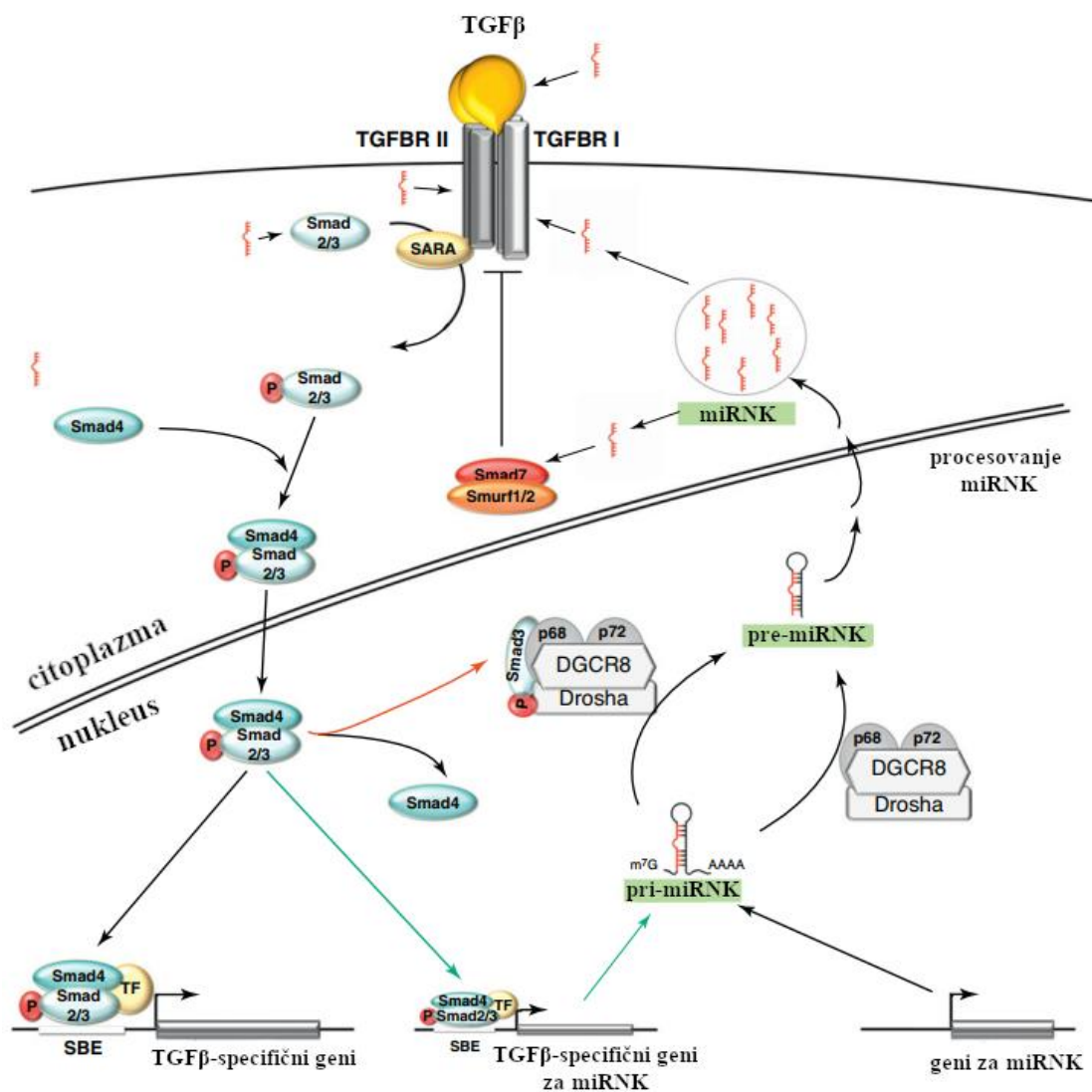
validirane prediktivne biomarkere zasnovane na miRNK za odgovor na sistemsku hemioterapiju za lečenje mCRC [159].

Relaps bolesti nakon operacije je čest događaj u kliničkoj praksi, i predstavlja veliki problem u lečenju pacijenata sa mCRC. Zbog toga bi klasifikacija pacijenata koji su pod povišenim rizikom za relaps, mogla da utiče na odluku da li bi pacijent trebalo da prima adjuvantnu hemioterapiju ili ne. Upotreba miRNK kao prognostičkih biomarkera za relaps bolesti, ukupno preživljavanje i preživljavanje bez bolesti je takođe proučavana kod pacijenata sa CRLM. Neke od miRNK sa prognostičkim potencijalom eksprimiranih u tumoru, a koje su do sada opisane u literaturi su miR-214 [168], miR-625 [169], miR-122 [170] i miR-196b-5p [171].

Pre 11 godina je otkriveno da ne samo da se miRNK eksprimiraju u tkivu, već da se kao veoma stabilni molekuli [172] mogu naći u skoro svim telesnim tečnostima kao što su serum, plazma, urin, pljuvačka, suze, cerebrospinalna tečnost itd. [173]. Prisustvo miRNK u telesnim tečnostima se može objasniti sledećim mehanizmima: pasivno izbacivanje unutarćelijskih miRNK u cirkulaciju usled ćelijske apoptoze ili oštećenja tkiva, selektivna aktivna sekrecija slobodnih miRNK, i aktivna sekrecija miRNK posredstvom egzozoma [174]. Poput miRNK eksprimiranih u tkivu, i za cirkulišuće miRNK je pokazano da mogu imati dijagnostički, prediktivni i prognostički potencijal. Zbog njihove moguće kliničke primene kao biomarkera za mCRC, i mogućnosti detekcije u različitim telesnim tečnostima koristeći minimalno-invazivni pristup, aktivno se vrše istraživanja u cilju neinvazivnog i personalizovanog lečenja pacijenata sa mCRC [175].

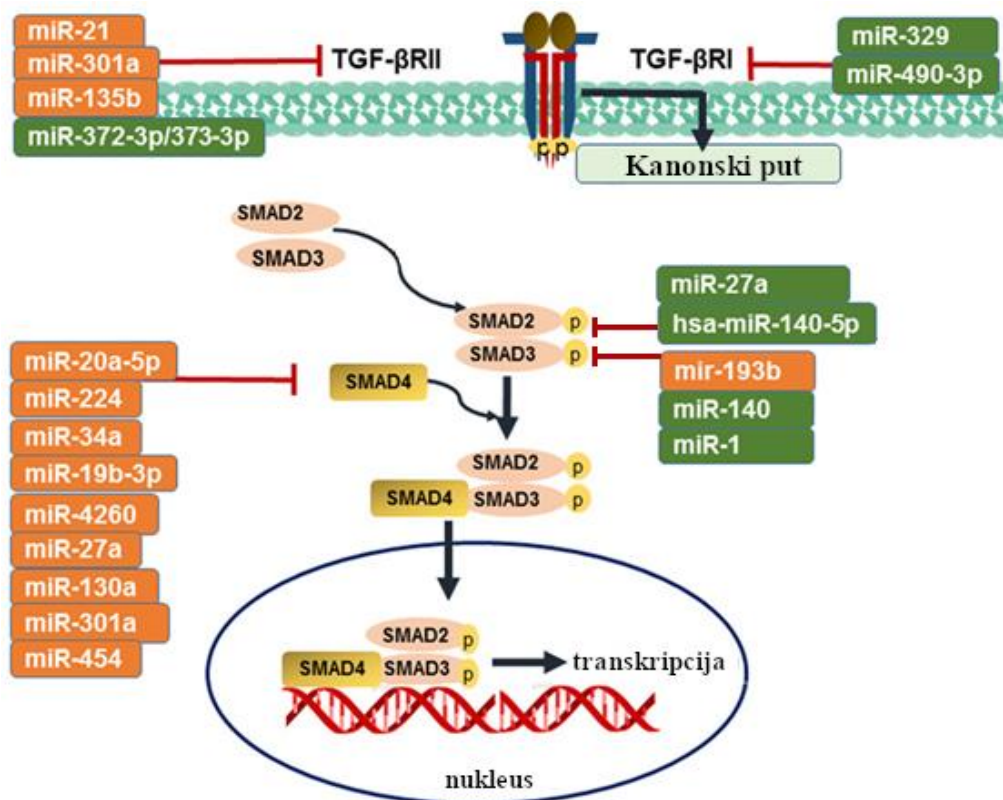
#### **1.4.4. Povezanost između TGFβ signalnog puta i miRNK molekula**

Brojni dokazi ukazuju da su miRNK uključene u regulaciju genske ekspresije različitih evoluciono očuvanih signalnih kaskada u ćeliji, uključujući TGFβ [176,177]. Odnosno, pokazano je da TGFβ signalni put obuhvata miRNK molekule kao bitne komponente svoje signalne kaskade [178-183]. Većina, ako ne i svi članovi TGFβ signalnog puta su regulisani jednom ili sa nekoliko miRNK [184]. MiRNK mogu regulisati članove TGFβ signalnog puta na svakom nivou signalne transdukcije, od liganada i receptora, preko receptorskih, partnerskih i inhibitornih SMAD proteina, pa sve do nishodnih targeta [185]. Takođe, TGFβ signalni put može pokrenuti ekspresiju gena za miRNK ili uticati na biogenezu miRNK vezivajući se za mikroprocesorski kompleks, čime se uspostavlja recipročna komunikacija između TGFβ signalnog puta i miRNK mašinerije (Slika 6) [184].



**Slika 6. Komunikacija između kanonskog TGFβ signalnog puta i miRNA mašinerije.** Zelene i crvene strelice označavaju mesta povezanosti između TGFβ signalnog puta i biogeneze miRNA. Preuzeto i modifikovano prema Butz i sar. [184].

Izmenjena funkcija miRNA koje regulišu članove TGFβ signalnog puta je povezana sa različitim humanim malignitetima uključujući karcinom dojke [186], želuca [187], pankreasa [188] i CRC [189]. Otkrivene su brojne onkogene i tumor-supresorske miRNA koje regulišu članove TGFβ signalnog puta, a učestvuju u patogenezi CRC. Neke od pomenutih miRNA su prikazane na Slici 7. Nekoliko studija je predložilo da se ekspresija miRNA uključenih u regulaciju TGFβ signalnog puta može koristiti za dijagnozu i klasifikaciju humanih maligniteta [189]. S obzirom da TGFβ-regulišuće miRNA mogu imati dijagnostički značaj, ispitivanje njihovog prediktivnog i prognostičkog potencijala bi dodatno doprinelo razumevanju njihove funkcije i potencijalne kliničke primene.



**Slika 7. Uloga onkogenih i tumor-supresorskih miRNK koje regulišu članove TGFβ signalnog puta u patogenezi CRC.** Onkogene miRNK su prikazane u narandžastim pravougaonicima, dok su tumor-supresorske miRNK prikazane u zelenim pravougaonicima. Preuzeto i modifikovano prema Soleimani i sar. [189].

## 2. CILJEVI

TGF $\beta$  signalni put i miRNK molekuli imaju ključne uloge u procesu patogeneze i metastaziranja CRC, kao i rezistenciji na hemioterapiju. Imajući u vidu povezanost TGF $\beta$  signalnog puta sa molekulima miRNK i njihovu značajnu ulogu u tumorigenezi i odgovoru na terapiju, postavljena je hipoteza da bi molekuli miRNK uključeni u regulaciju većeg broja članova TGF $\beta$  signalnog puta, eksprimirani u tkivu ili kao slobodno cirkulišući molekuli, mogli biti dobri kandidati za prediktivne biomarkere odgovora na hemioterapiju, ali i potencijalni prognostički biomarkeri za pojavu recidiva i preživljavanje pacijenata sa CRLM. Stoga je ovo istraživanje imalo sledeće ciljeve:

1. Ispitivanje odgovora odabranih miRNK koje učestvuju u regulaciji TGF $\beta$  signalnog puta na standardnu hemioterapiju za mCRC *in vitro*;
2. Ispitivanje translacionog potencijala odabrane miRNK kao prediktivnog i prognostičkog biomarkera za pacijente sa CRLM u okviru prospektivne kliničke studije;
3. Funkcionalna karakterizacija odabrane miRNK u procesima relevantnim za kolorektalnu karcinogenezu i odgovoru na terapiju *in vitro* i *in vivo*.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. *In silico* analiza

Za identifikaciju miRNK molekula koji regulišu članove kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta pretražena je miRWalk2.0 baza podataka (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>, datum pristupa 16.05.2019. godine) i njen modul koji sadrži informacije o eksperimentalno potvrđenim interakcijama miRNK sa iRNK [190]. *In silico* analiza je obuhvatila 10 gena koji učestvuju u kanonskom TGF $\beta$  signalnom putu. Nazivi gena koji su uključeni u pretragu i njihovi pristupni brojevi u bazi NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) su prikazani u Tabeli 1. Pretraga je obuhvatila samo humane gene dostupne u bazi NCBI, dok je kao tip identifikatora korišćen RefSeqID. Za svaki gen od interesa je dobijena tabela sa spiskom miRNK koje se vezuju za iRNK datog gena. Podaci su analizirani korišćenjem internet aplikacije *ConnectTheDots* (<https://databasic.io/en/connectthedots/>), dok je bioinformatička platforma *Cytoscape 3.7.2* (Institute of Systems Biology, SAD) korišćena za vizualizaciju interakcija miRNK-iRNK.

**Tabela 1. Nazivi gena uključenih u kanonski TGF $\beta$  signalni put i njihovi pristupni brojevi u NCBI bazi korišćeni za *in silico* analizu.**

Naziv gena uključenog u kanonski TGF $\beta$ signalni put	Pristupni broj u NCBI bazi
<i>TGFB1</i>	NM_000660
<i>TGFB2</i>	NM_003238
<i>TGFB3</i>	NM_003239
<i>TGFBR1</i>	NM_001130916
<i>TGFBR2</i>	NM_001024847
<i>SMAD2</i>	NM_005901
<i>SMAD3</i>	NM_005902
<i>SMAD4</i>	NM_005359
<i>SMAD6</i>	NM_005585
<i>SMAD7</i>	NM_005904

#### 3.2. Kultivacija ćelija

U ovom radu su korišćene sledeće ćelijske linije:

- adherentne humane ćelijske linije primarnog adenokarcinoma kolona HCT116, DLD-1 i SW480
- adherentna humana ćelijska linija primarnog adenokarcinoma rektuma SW837
- adherentna humana ćelijska linija metastatskog adenokarcinoma kolona SW620
- adherentne humane ćelijske linije nemalignog epitela kolona HCEC i HCEC-1CT
- adherentna mišija ćelijska linija metastatskog melanoma 4C11+

Eksperimenti na ćelijskoj liniji SW620 su rađeni na SW620 ćelijama koje su gajene u Beogradu u Srbiji (u daljem tekstu SW620<sub>B</sub>) i na SW620 ćelijama koje su gajene u Erlangenu u Nemačkoj (u



daljem tekstu SW620<sub>E</sub>). Čelijska linija 4C11+ je korišćena kao pozitivna kontrola u testu formiranja tuba.

Čelije su gajene u sterilnim uslovima u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO<sub>2</sub> na temperaturi od 37°C. Detalji vezani za uslove gajenja ovih ćelija su prikazani u Tabeli 2.

**Tabela 2. Uslovi gajenja korišćenih ćelijskih linija.**

Ćelijska linija	Sastav medijuma (proizvođač)
SW620 <sub>B</sub>	DMEM (Thermo Fisher Scientific, SAD), 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, SAD), Penicilin-streptomycin 100 U/mL (Thermo Fisher Scientific, SAD)
SW620 <sub>E</sub>	DMEM (Thermo Fisher Scientific, SAD), 10% FBS (PAN-Biotech, Nemačka), Penicilin-streptomycin 100 U/mL (PAN-Biotech, Nemačka)
SW480	RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austrija), 10% FBS (PAN-Biotech, Nemačka), Penicilin-streptomycin 100 U/mL (PAN-Biotech, Nemačka)
SW837	
HCT116	
DLD-1	
HCEC-1CT	ColoUp (Evercyte, Austrija), 2% FBS (Thermo Fisher Scientific, SAD), Penicilin-streptomycin 100 U/mL (Thermo Fisher Scientific, SAD)
HCEC*	Basal HCEC medium (PAN-Biotech, Nemačka), Penicilin-streptomycin 100 U/mL (PAN-Biotech, Nemačka), 2 mM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, SAD), 30 µg/mL ekstrakt hipofize govečeta (PromoCell, Nemačka), 38 µg/mL askorbinska kiselina (Sigma-Aldrich, SAD), 1 nM deksametazon (Sigma-Aldrich, SAD), 100 nM retinol (Sigma-Aldrich, SAD)
4C11+	RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austrija), 5% FBS (PAN-Biotech, Nemačka), Penicilin-streptomycin 100 U/mL (PAN-Biotech, Nemačka)

Skraćenice: FBS - eng. *Fetal Bovine Serum*; DMEM - eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; SAD - Sjedinjene Američke Države; RPMI - eng. *Roswell Park Memorial Institute*.

Pred kultivaciju, alikvoti ćelija su izvađeni iz kanistera sa tečnim azotom (-196°C), brzo otopljeni u odgovarajućem kompletnom medijumu prethodno zagrejanom na temperaturi od 37°C, i ćelije su zasejane u sud za gajenje (Petri posuda prečnika 10 cm, T-25 flask ili T-75 flask (Sarstedt, SAD), ili u slučaju HCEC ćelija kada su korišćene specifične *CellBIND* (Corning, SAD) posude za gajenje ćelija). Subkultivacija ćelija je vršena na svaka 3 ili 4 dana, odnosno kada ćelije dostignu približnu konfluentnost od 90%. Nakon odlivanja medijuma za gajenje, ćelije su jednom isprane rastvorom 1 × PBS (eng. *Phosphate Buffer Saline*, PBS) a zatim je dodat rastvor 1 × tripsin-EDTA (0,5 mg/mL tripsina i 0,2 mg/mL EDTA (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), Sigma Aldrich, SAD), nakon čega su ćelije vraćene u inkubator u trajanju od 3-5 minuta (min). Zatim je tripsin inaktiviran dodavanjem kompletnog medijuma, a ćelije su resuspendovane i zasejane u odgovarajuće posude za gajenje, ili su zamrzavane.

Za određivanje broja ćelija je korišćena pločica za brojanje ćelija sa 4 velika polja podeljena na 16 manjih polja (Neubauer, Austrija). Na pločicu je naneto 10 µL resuspendovanih ćelija, a ćelije su prebrojane u 2 velika polja. Broj ćelija u rastvoru je određen prema sledećoj formuli: broj ćelija/mL = (broj ćelija/2) × 10<sup>4</sup>.

Kako bi se ćelije pripremile za zamrzavanje u tečnom azotu najpre su isprane rastvorom  $1 \times$  PBS, zatim odlepljene od suda pomoću rastvora  $1 \times$  tripsin-EDTA i centrifugirane 3 min na 1800 rpm (eng. *rotations per minut*, rpm). Supernatant je odbačen, a ćelije su resuspendovane u medijumu za zamrzavanje koji se sastoji od 90% FBS-a i 10% dimetil sulfoksida (Serva, Nemačka). Ćelije resuspendovane u medijumu za zamrzavanje su zatim stavljene u kriotube (Sarstedt, SAD) i postepeno prebacivane na niže temperature: sa  $37^{\circ}\text{C}$  na  $-20^{\circ}\text{C}$  (približno 2 h (eng. *hour*, h)), dalje na  $-80^{\circ}\text{C}$  (preko noći) i na kraju su smeštene u tečni azot.

### 3.3. Pravljenje SW620<sub>B</sub> ćelija rezistentnih na 5-FU

Kako bi se napravio klinički relevantan model koji bi imitirao uslove pod kojima ispitanici sa mCRC primaju hemioterapiju, napravljene su SW620<sub>B</sub> ćelije rezistentne na 5-FU (EBEWE Pharma, Austrija) (SW620<sub>B</sub> 5-FUR). Ćelije SW620<sub>B</sub> 5-FUR su dobijene postepenim povećavanjem koncentracije 5-FU (5, 10, 15, 20 i 30  $\mu\text{M}$ ) tretmanima koji su trajali 3 dana nakon čega je usledio period oporavka od 4 dana u medijumu bez 5-FU. Ovakav jednonedeljni ciklus terapije je ponavljan sve dok oporavljene ćelije nisu formirale konfluentan sloj u T-75 flasku, nakon čega se prešlo na sledeću višu koncentraciju 5-FU. Pravljenje ćelija SW620<sub>B</sub> 5-FUR je trajalo 6 meseci. Ćelije SW620<sub>B</sub> 5-FUR su održavane u 30  $\mu\text{M}$  5-FU, dok su ove ćelije pred izvođenje merenja ili postavke eksperimenta gajene u medijumu bez 5-FU tokom jednog pasaža.

### 3.4. Tretmani ćelija

#### 3.4.1. Zasejavanje ćelija za tretmane

Detaljan pregled broja zasejanih ćelija u zavisnosti od postavke eksperimenta je dat u Tabeli 3.

**Tabela 3. Broj zasejanih ćelija za odgovarajući eksperiment.**

Test	Ćelijska linija	Broj zasejanih ćelija	Posuda u kojoj su ćelije zasejane	Trajanje tretmana
MTT esej - određivanje vijabilnosti ćelija	SW620 <sub>B</sub>	$1,5 \times 10^4$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	72 h
MTT esej - određivanje vijabilnosti ćelija	HCEC-1CT	$6 \times 10^3$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	72 h
MTT esej - određivanje IC <sub>50</sub> vrednosti 5-FU	SW620 <sub>E</sub> HCT116	$7,5 \times 10^3$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	48 h
MTT esej - određivanje IC <sub>50</sub> vrednosti 5-FU	SW620 <sub>B</sub>	$1 \times 10^4$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	72 h
MTT esej - određivanje IC <sub>50</sub> vrednosti 5-FU	SW620 <sub>B</sub> 5-FUR	$6 \times 10^3$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	72 h
Analiza ekspresije gena	SW620 <sub>B</sub>	$5 \times 10^5$	mikrotitar ploča sa 6 bunarića	24 h, 72 h ili 144 h <sup>1,2</sup>
Analiza ekspresije gena	HCEC-1CT	$2,5 \times 10^5$	mikrotitar ploča sa 6 bunarića	72 h
Analiza ekspresije gena	SW620 <sub>E</sub> HCT116	$1,5 \times 10^6$	Petri posuda prečnika 10 cm	48 h
Test zarastanja povrede	SW620 <sub>E</sub> *	$1,3 \times 10^5$	komora silikonskog inserta	48 h, 72 h
Test zarastanja povrede	HCT116*	$8 \times 10^4$	komora silikonskog inserta	48 h, 72 h
Test formiranja tuba	SW620 <sub>E</sub> *	$1,2 \times 10^5$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	20 h, 40 h
Test formiranja tuba	HCT116*	$8 \times 10^4$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	20 h, 40 h
Test formiranja tuba	4C11+	$3 \times 10^4$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	20 h, 40 h
Test onemogućavanja ćelijama da se zalepe za podlogu	SW620 <sub>E</sub> * HCT116*	$2,5 \times 10^4$	mikrotitar ploča sa 6 bunarića	24 h, 48 h, 72 h, 96 h

Skraćenica: MTT - eng. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*.

1. Pri tretmanu od 144 h medijum za gajenje ćelija nije menjan.
  2. Gustina gajenja ćelija je prethodno optimizovana tako da ćelije SW620<sub>B</sub> ne dostignu konfluentnost od 100% do 144 h gajenja.
- \* označava ćelije koje su prethodno transfekovane.

### 3.4.2. Određivanje IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU

IC<sub>50</sub> (eng. *half-maximal inhibitory concentration*, IC<sub>50</sub>) vrednost 5-FU je određena za ćelije SW620<sub>B</sub>, SW620<sub>B</sub> 5-FUR, HCT116 i SW620<sub>E</sub>. Broj zasejanih ćelija za određivanje IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU je prikazan u Tabeli 3, a uslovi gajenja kao u Tabeli 2.

Senzitivnost SW620<sub>B</sub> i SW620<sub>B</sub> 5-FUR ćelija na 10 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM i 300 μM 5-FU je 72 h nakon tretmana proverena MTT esejem. Svi uzorci su rađeni u triplikatu u 3 nezavisna eksperimenta. Promena u rezistenciji, FR (eng. *fold resistance*, FR), je izračunata prema formuli  $FR = IC_{50} \text{ SW620}_B \text{ 5-FUR} / IC_{50} \text{ SW620}_B$ .

HCT116 i SW620<sub>E</sub> su tretirane 48 h sa 5,35 μM, 10,7 μM, 21,4 μM, 42,8 μM, 85,6 μM, 128,5 μM i 171,6 μM 5-FU nakon čega je usledila analiza MTT esejem. Uzorci su rađeni u četvorplikatu u 2 nezavisna eksperimenta.

### 3.4.3. Tretmani ćelija hemioterapeutskim lekovima i/ili bevacizumabom

Ćelije korišćene u ovoj studiji su uvek tretirane sa sveže pripremljenim hemioterapeutskim lekovima koji su rastvoreni u dvostruko destilovanoj vodi (ddH<sub>2</sub>O) i razblaženi u medijumu za gajenje ćelija. Korišćene koncentracije hemioterapeutskih lekova za tretmane ćelijskih linija su bile sledeće:

- SW620<sub>B</sub> - 2 × IC<sub>50</sub> vrednosti koje su prethodno dobijene za SW480 ćelije [191] i to: 21,4 μM 5-FU, 85 μM oksaliplatin (Actavis Italy, Italija) i 16 μM irinotekan (Sindan-Pharma, Rumunija). Iste koncentracije pojedinačnih hemioterapeutskih lekova su korišćene i u kombinovanim tretmanima FOX (5-FU/oksaliplatin) i FIRI (5-FU/irinotekan).
- SW620<sub>E</sub> - IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU dobijena za ove ćelije
- HCT116 - IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU dobijena za ove ćelije.

Ćelije SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT su tretirane sa 3 klinički relevantne koncentracije bevacizumaba (Avastin®, Roche, Švajcarska) izabranih na osnovu kliničkih farmakokinetičkih analiza: 25 μg/mL (koncentracija niža od stabilnog stanja), 85 μg/mL (koncentracija pri stabilnom stanju) [192,193] i 250 μg/mL (prosečna maksimalna koncentracija bevacizumaba u plazmi ispitanika sa mCRC na osnovu studija Liston i sar. [194] i Zhi i sar. [193]) sa ili bez FOX kotretmana. Svaki eksperiment je podrazumevao i negativnu kontrolu (ćelije tretirane samo sa ddH<sub>2</sub>O).

### 3.5. Transfekcija humanih ćelija

Pregled broja zasejanih ćelija i samog procesa transfekcije za različite tipove eksperimenata je dat u Tabeli 4.

**Tabela 4. Pregled procesa transfekcije za različite tipove eksperimenata.**

Ćelijska linija	Broj zasejanih ćelija	Posuda za zasejavanje	Test
SW620 <sub>E</sub>	$5 \times 10^5$	mikrotitar ploča sa 6 bunarića	Analiza uspešnosti transfekcije
SW620 <sub>E</sub> HCT116	$6,5 \times 10^5$	mikrotitar ploča sa 6 bunarića	Test zarastanja povrede, Test formiranja tuba, Test onemogućavanja ćelijama da se zalepe za podlogu, Analiza ćelijskog ciklusa
SW620 <sub>E</sub> HCT116	$2,64 \times 10^6$ $1,8 \times 10^6$	posuda prečnika 10 cm	CAM esej
SW620 <sub>E</sub> HCT116	$15 \times 10^3$ $9 \times 10^3$	mikrotitar ploča sa 96 bunarića	Kristal violet bojenje

Za transfekciju je korišćen reagens *Lipofectamine*® *RNAiMAX* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Ćelije su zasejane pri gustini navedenoj u Tabeli 4, u mikrotitar ploču sa 6 ili 96 bunarića, ili posudu prečnika 10 cm. Nakon 24 h od zasejavanja ćelije su transfektovane prema uputstvu proizvođača. Transfeksiona smeša koja se dobija tako što se tuba sa *Lipofectamine*® *RNAiMAX* reagensom i *Opti-MEM*<sup>TM</sup> *I Reduced Serum* (Thermo Fisher Scientific, SAD) (u daljem tekstu Opti-MEM), je pomešana u odnosu 1:1 sa smešom Opti-MEM medijuma i:

- 10 nM *hsa-miR-93-5p mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA mimic*, ID: MC10591 (Ambion, SAD) - služi za povećanje ekspresije hsa-miR-93-5p (u daljem tekstu hsa-miR-93-5p mimik), ili
- 10 nM *mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA mimic Negative Control #1* (Ambion, SAD) - služi kao negativna kontrola transfekcije sa hsa-miR-93-5p mimikom (u daljem tekstu hsa-miR-93-5p mNK), ili
- 50 nM *hsa-miR-93-5p mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA inhibitor*, ID: MH10591 (Ambion, SAD) - služi za smanjenje ekspresije hsa-miR-93-5p (u daljem tekstu hsa-miR-93-5p inhibitor), ili
- 50 nM *mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA Negative Control #1* (Ambion, SAD) - služi kao negativna kontrola transfekcije sa hsa-miR-93-5p inhibitorom (u daljem tekstu hsa-miR-93-5p iNK).

Smeša je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi kako bi se formirao kompleks između DNK i reagensa *Lipofectamine*® *RNAiMAX*. U međuvremenu je medijum u kome su gajene ćelije zamenjen novim medijumom bez seruma i antibiotika. Smeša je zatim nakapana na ćelije i ostavljena 24 h nakon čega su ćelije dalje procesuirane u zavisnosti od primenjenog testa. Za analizu vijabilnosti ćelija koja je podrazumevala i tretman sa 5-FU, ćelije su najpre transfektovane kako je prethodno opisano, a 24 h nakon transfekcije ćelije su tretirane odgovarajućom IC<sub>50</sub> vrednošću 5-FU za datu ćelijsku liniju, a 48 h nakon tretmana sa 5-FU usledila je analiza vijabilnosti ćelija kristal violet bojenjem.

### 3.6. Analiza vijabilnosti ćelija

#### 3.6.1. Analiza vijabilnosti ćelija MTT esejem

MTT esej je kvantitativna kolorimetrijska metoda kojom se određuje metabolička aktivnost ćelija, a koja može poslužiti kao indikator za merenje vijabilnosti ćelija, proliferacije ćelija i citotoksičnosti. Ova metoda se zasniva na sposobnosti enzima mitohondrija NAD(P)H-zavisnih oksidoreduktaza da redukuju žuti MTT reagens u ljubičasti formazan. Reakcija se odvija samo u živim ćelijama u kojima su NAD(P)H-zavisne oksidoreduktaze aktivne pa je količina dobijenog formazana proporcionalna broju vijabilnih ćelija.

Ćelije su zasejane i tretirane kako je prethodno opisano u sekciji 3.4. MTT prah je rastvoren u PBS-u, dok je MTT rastvor finalno razblažen do 0,5 mg/mL u medijumu za gajenje ćelija. Ćelije su inkubirane u medijumu sa MTT-om tokom 2h na 37°C u inkubatoru, nakon čega je medijum sa MTT-om odliven a ćelije su lizirane u 100 µL DMSO (eng. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) (Serva, Nemačka) tokom 30 min. Apsorbanca je izmerena na 550 nm na aparatu *Infinite M200 PRO plate reader* (TECAN, Švajcarska). Podaci su prikupljeni i analizirani pomoću softvera *Magellan 7.2*. Svaka analizirana mikrotitar ploča sa 96 bunarića je sadržala i ćelije u triplikatu koje nisu inkubirane u MTT rastvoru i služile su za normalizaciju signala (blank uzorak). Procenat vijabilnih ćelija je izračunat preko vrednosti apsorbance (Abs) koristeći sledeću formulu:

$$\% \text{ vijabilnih ćelija} = ((\text{Abs}_{\text{uzorak}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{kontrola}} - \text{Abs}_{\text{blank}})) \times 100.$$

Svaki tretman je rađen u triplikatu, a svaki eksperiment je ponovljen 3 puta.

### 3.6.2. Analiza vijabilnosti ćelija kristal violet bojenjem

Bojenje kristal violetom (heksametil-pararosanilin hlorid) je ne-enzimska metoda za analizu vijabilnih adherentnih ćelija koja se zasniva na afinitetu boje kristal violet za spoljašnju površinu dvostruke zavojnice DNK. Količina boje koja se apsorbuje zavisi od količine DNK prisutne u kulturi ćelija na osnovu čega se može proceniti broj adherentnih ćelija u kulturi. Metoda ne boji mrtve ćelije jer će one biti odlepljene od podloge i biti odstranjene tokom koraka ispiranja.

Rastvor za bojenje kristal violet je pripremljen tako što je 0,5 g kristal violeta (Sigma-Aldrich, SAD) rastvoreno u 20 mL 100% metanola i 80 mL dH<sub>2</sub>O. Nakon završenog tretmana, ćelije su oprane sa 300 µL 1 × PBS-om, PBS rastvor je odstranjen i u svaki bunarić je dodato 50 µL kristal violet rastvora. Mikrotitar ploča je ostavljena na klackalici 15 min na sobnoj temperaturi. Rastvor kristal violeta je uklonjen, a ćelije su zatim 2 puta isprane sa 300 µL dH<sub>2</sub>O nakon čega je mikrotitar ploča prevrnutu kako bi se sva tečnost ocedila tokom narednog sata na ubrus koji je postavljen ispod. Nakon sušenja, dodato je 200 µL metanola po bunariću i mikrotitar ploča je ponovo ostavljena na klackalici 15 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je izmerena na 595 nm na *VICTOR X3* (PerkinElmer, SAD) čitaču mikrotitar ploča. Procenat vijabilnih ćelija je izračunat preko vrednosti apsorbance (Abs) koristeći formulu opisanu u sekciji 3.6.1. Svaki uzorak je rađen u četvorplikatu, a svaki eksperiment je ponovljen dva puta.

## 3.7. Analiza ćelijske smrti

### 3.7.1. Analiza ćelijske smrti metodom protočne citofluorimetrije

Analiza ćelijske smrti po tipu apoptoze je izmerena metodom protočne citofluorimetrije koristeći komercijalno dostupni kit *APOPTTEST™-FITC* (Dako, Danska) koji se zasniva na dualnom bojenju sa aneksinom V konjugovanim sa fluorescein-izotiocijanatom (FITC), i propidijum-jodidom (PI). Ovaj kit koristi svojstvo aneksina V da se veže za membranski fosfolipid fosfatidil-serin u prisustvu Ca<sup>2+</sup>. Translokacija fosfatidil serina sa unutrašnje strane membrane na spoljašnju je jedna od prvih karakteristika ćelija koje su krenule u ćelijsku smrt po tipu apoptoze. PI se vezuje za DNK. Ovakvo bojenje omogućava razlikovanje: živih ćelija (aneksin V-FITC-, PI-), ćelija u ranoj fazi apoptoze

(aneksin V-FITC+, PI-), ćelija u kasnim fazama apoptoze (aneksin V-FITC+, PI+) i mrtvih ćelija (aneksin V-FITC-, PI+).

Priprema komponenti pre izvođenja eksperimenta je podrazumevala:

- razblaživanje  $10\times$  koncentrovanog pufera za vezivanje u dH<sub>2</sub>O i stavljanje na led
- razblaživanje aneksin V-FITC rastvora  $10\times$  sa hladnim razblaženim puferom za vezivanje
- rastvaranje PI u 1 mL dH<sub>2</sub>O do finalne koncentracije od 250  $\mu$ g/mL.

SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane pojedinačnim i kombinovanim hemioterapeutskim lekovima u trajanju od 72 h (videti sekciju 3.4.3.) nakon čega je analizirana ćelijska smrt po tipu apoptoze. Medijum u kojem su ćelije gajene je pokupljen i sačuvan kako bi u analizu bile uključene i odlepljene apoptotične ćelije. Zalepljene ćelije su isprane 2 puta sa  $1 \times$  PBS-om, tripsinizovane, pokupljene sa prethodno sačuvanim medijumom i centrifugirane (1800 rpm, 5 min). Supernatant je odliven i ćelije su još jednom isprane  $1 \times$  PBS-om i centrifugirane pri istim uslovima. Supernatant je odliven a ćelije su resuspendovane u 490  $\mu$ L hladnog, prethodno  $10\times$  razblaženog pufera za vezivanje. Nakon toga je u ćelijsku suspenziju dodato 5  $\mu$ L razblaženog aneksin V-FITC rastvora i 5  $\mu$ L PI. Tube sa uzorcima su inkubirane 10 min na ledu, u mraku. Nakon inkubacije, ćelije su prebačene u kivetu (Sarstedt, SAD) za protočni citometar nakon čega je dodato još 500  $\mu$ L PBS-a. Pri analizi je korišćeno između  $1 \times 10^5$  i  $1 \times 10^6$  ćelija po uzorku. Negativna kontrola je podrazumevala da ćelije prolaze sve korake protokola bojenja, sem što nije dodavan ni aneksin V-FITC ni PI (nebojane ćelije). Tretirane SW620<sub>B</sub> ćelije obojene aneksin V-FITC-om i PI-om su analizirane u toku narednog sata na protočnom citometru *CyFlow Space* (Partec, Nemačka). Intenzitet fluorescencije je izmeren u zelenom FL1 i narandžastom FL2 kanalu. Za svaki uzorak je propušteno 50000 ćelija, a procenat živih ćelija, ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze, kao i procenat mrtvih ćelija je analiziran pomoću softvera *FloMax*®. Eksperiment je ponovljen 4 puta.

### 3.7.2. Analiza ćelijske smrti testom onemogućavanja ćelijama da se zalepe za podlogu

Anoikis je podvrsta programirane ćelijske smrti po tipu apoptoze koja može nastati ukoliko dođe do odvajanja ćelija od vanćelijskog matriksa. Testom onemogućavanja ćelijama da se zalepe za podlogu (eng. *detachment assay*) je analizirana sposobnost ćelija da prežive tako što agregiraju i formiraju sferoide, odnosno sposobnost da izbegnu ćelijsku smrt po tipu anoikis. Kako bi se ćelijama onemogućilo da se zalepe za površinu suda za gajenje, mikrotitar ploča sa 6 bunarića je obložena biokompatibilnim hidrogelom PolyHEMA (eng. *poly(2-hydroxyethyl methacrylate)*). Rastvor PolyHEMA je napravljen tako što je 2 g PolyHEMA praha dodato u 100 mL sterilnog 95% etanola. Smeša je ostavljena 6 h na 65°C kako bi se prah u potpunosti rastvorio. Nakon toga, u svaki bunarić je dodato po 250  $\mu$ L PolyHEMA rastvora nakon čega su mikrotitar ploče sa blago otvorenim poklopcem ostavljene 24 h u laminaru sa stabilnim protokom vazduha. Preostali rastvor PolyHEMA je preko noći ostavljen na 4°C, a proces oblaganja je ponovljen narednog dana.

Dva dana pred izvođenje testa ćelije su zasejane, a sledećeg dana su transfekovane kako je prethodno opisano u sekciji 3.5. 24 h nakon transfekcije ćelije su odlepljene od podloge, prebrojane i zasejane u triplicatu u 2 mL medijuma (kao što je prikazano u Tabeli 3) u mikrotitar ploče sa 6 bunarića obložene PolyHEMA hidrogelom i vraćene u inkubator. Sposobnost ćelija da formiraju agregate/sfere je praćena na svetlosnom mikroskopu *DMi1* (Leica, Nemačka) i zabeležena fotografijama na svakih 24 h sve do 96 h. Eksperiment je ponovljen dva puta.

### 3.8. Analiza ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije

Ćelijski ciklus se sastoji od interfaze i mitoze. Interfazu čine G1 faza (eng. *gap*, G) (tokom koje ćelija raste i dolazi do pripreme ćelije za replikaciju molekula DNK), S faza (eng. *synthesis*, S) (tokom koje dolazi do replikacije DNK) i G2 faze (tokom koje dolazi do pripreme ćelije za deobu). Svaka faza ćelijskog ciklusa se razlikuje po količini DNK, tako da je u G1 fazi broj hromozoma u ćeliji ( $n$ ) jednak  $2n$ , u S fazi  $2n-4n$ , i u G2 fazi  $4n$ . Ćelije reverzibilno mogu da prestanu da se dele i da pređu u stanje mirovanja koje se označava kao G0 faza. Ćelije u apoptozi se označavaju kao sub-G1 populacija ćelija jer su hipodiploidne, tj. imaju sadržaj DNK  $< 2n$ . Analiza ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije se bazira na razlikovanju količine DNK u ćeliji pomoću DNK-vezujuće boje PI.

Pre procedure su napravljeni pufer za permeabilizaciju i PI pufer za bojenje.

Pufer za permeabilizaciju (pH 7,8):

- 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (9/10 delova) (Merck, Nemačka)
- 25 mM limunska kiselina (1/10 delova) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 0,1% Triton X 100 (Merck, Nemačka)
- 0,01% NaN<sub>3</sub> (Serva, Nemačka)

PI - pufer za bojenje:

- 25 mL PBS
- 3,75 mg PI
- 25 mg natrijum citrat (Sigma-Aldrich, SAD)
- 25 μL Triton X 100 (Merck, Nemačka)
- rastvor se na kraju filtrira sterilišućom filtracijom

SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije su zasejane i transfekovane narednog dana kao što je prikazano u Tabeli 4. SW620<sub>E</sub> ćelije su transfekovane samo sa hsa-miR-93-5p mimikom i mNK, dok su HCT116 ćelije transfekovane sa hsa-miR-93-5p inhibitorom i iNK. 24 h nakon transfekcije, supernatant u kome plivaju ćelije je pokupljen u Falcon tubu od 50 mL. Adherentne ćelije su isprane sa 4 mL PBS rastvora koji je takođe pokupljen u istu Falcon tubu. Adherentne ćelije su odlepljene pomoću 750 μL tripsina i prebačene u istu Falcon tubu. Najzad je posuda u koje su ćelije gajene dva puta isprana sa 4 mL PBS rastvora, gde su potencijalno zaostale ćelije pridružene već pokupljenim ćelijama. Na ovaj način su za analizu pokupljene i plutajuće i adherentne ćelije. Nakon centrifugiranja na  $200 \times g$ , 5 min na 4°C, supernatant je pažljivo odstranjen. Ćelijski talog je ispran sa 2 mL PBS rastvora, nakon čega je usledilo centrifugiranje pod istim uslovima. Nakon što je supernatant pažljivo odstranjen, pristupilo se procesu fiksacije ćelija.

Dobijeni ćelijski talog je resuspendovan u 0,5 mL PBS rastvora. Zatim je uz lagano mešanje polako dodavano 3 mL 70% etanola (u PBS-u) po principu kap-po-kap, nakon čega je smeša ostavljena na ledu 30 min. Zatim su ćelije centrifugirane ( $200 \times g$ , 5 min, 4°C), supernatant je odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u 1 mL PBS rastvora, nakon čega su ćelije prebačene u kivete za protočnu citometriju u kojima su ćelije dalje bile bojene sa PI.

Ćelije u kivetama su centrifugirane ( $200 \times g$ , 5 min, 4°C), supernatant je odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u 1 mL pufera za permeabilizaciju. Smeša je ostavljena da se inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ćelije su centrifugirane pod istim uslovima i supernatant je odliven. Ćelije su zatim resuspendovane u 100 μL PI - pufera za bojenje i 5 μL sveže dodate RNaze (10 mg/mL, Thermo Fisher Scientific, SAD) i ostavljene da se inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi

u mraku. Nakon toga, ćelije su isprane sa 2 mL PBS rastvora, centrifugirane pri istim uslovima i supernatant je odliven. Ćelije su finalno resuspendovane u 200  $\mu$ L PBS-a i analizirane na *BD FACSCanto™ II* protočnom citometru (BD Biosciences, SAD). Dobijeni podaci su analizirani pomoću *BD FACSDiva™* programa koji automatski određuje distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. U svakom uzorku je analizirano 10 000 pojedinačnih događaja.

### 3.9. Test zarastanja povrede

Testom zarastanja povrede (eng. *wound-healing assay* ili eng. *wound-scratch assay*) je praćena migracija SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija. Ćelije su najpre zasejane i transfekovane kako je prethodno opisano u sekciji 3.5. 24 h nakon transfekcije ćelije su odlepljene od podloge, prebrojane i zasejane (kao što je prikazano u Tabeli 3) i ostavljene 24 h da se zalepe za dno posude u 2 komore silikonskog inserta između kojih se nalazi definisani prostor koji ćelije ne mogu da nastane (Ibidi, Nemačka), a koji je postavljen u bunarić mikrotitar ploče sa 24 bunarića. Nakon toga, u svaku komoru silikonskog inserta je dodat 1  $\mu$ g/mL mitomicin C (Sigma-Aldrich, SAD). Mitomicin C služi kao inhibitor proliferacije ćelija kako bi se izbegla mogućnost da ćelije popune razmak između komora tako što se dele, već je popunjavanje razmaka isključivo posledica njihove migracije. Nakon 2 h od dodavanja mitomicina C, insert je uklonjen, a ćelije su pažljivo isprane sa 500  $\mu$ L PBS-a. Najzad, u svaki bunarić je dodato 500  $\mu$ L odgovarajućeg medijuma za gajenje ćelija u koji je dodat 1  $\mu$ g/mL mitomicina C. Vreme kada je insert uklonjen je označeno kao  $t_0$ , vreme 24 h nakon uklanjanja inserta kao  $t_{24h}$ , a vreme 48 h nakon uklanjanja inserta kao  $t_{48h}$ . Po 2 fotografije su napravljene za svaki bunarić u sve tri vremenske tačke, i to tako da je uvek slikana ista pozicija bunarića. Površina razmaka u vremenskim tačkama  $t_0$ ,  $t_{24h}$  i  $t_{48h}$  je izmerena korišćenjem softvera *ImageJ* (U. S. National Institutes of Health, SAD).

Procenat popunjenosti razmaka nakon 24 h je izračunat pomoću formule:  $X_{24h} = [1 - (t_{24h}/t_0)] \times 100$ .

Procenat popunjenosti razmaka nakon 48 h je izračunat pomoću formule:  $X_{48h} = [1 - (t_{48h}/t_0)] \times 100$ .

### 3.10. Test formiranja tuba

Angiogeneza podrazumeva proces stvaranja novih krvnih sudova od postojećih i neophodna je za rast i metastaziranje tumora. Neke ćelijske linije se u *in vitro* uslovima umrežavaju kreirajući strukture poput kanala i lumena tj. struktura koje liče na vaskularne mreže nastalih od endotelnih ćelija. Ovaj proces se naziva vaskularna mimikrija. Test formiranja tuba je *in vitro* test proučavanja procesa angiogeneze. Testom formiranja tuba (eng. *tube formation assay*) su analizirane SW620<sub>E</sub> ćelije, dok su HCT116 ćelije služile kao negativna kontrola, a 4C11+ ćelije kao pozitivna kontrola za stvaranje tuba.

Dva dana pred izvođenje testa ćelije su zasejane, a sledećeg dana su transfekovane kako je prethodno opisano u sekciji 3.5. Dan pre početka testa, Matrigel matriks (*Matrigel Basement Membrane Matrix, Phenol Red-Free* (Corning, SAD)) na kome će ćelije biti zasejane je stavljen na led i ostavljen u frižideru preko noći da se odledi. Mikrotitar ploča sa 96 bunarića je stavljena na led neposredno pred izvođenje testa. U svaki bunarić je pažljivo naliveno 40  $\mu$ L Matrigel matriksa pomoću nastavaka koji su prethodno ohlađeni na  $-20^\circ\text{C}$ , vodeći računa da je dno bunarića u potpunosti pokriveno i da ne postoje balončići vazduha. Mikrotitar ploča sa 96 bunarića je nakon nalivanja Matrigel matriksa stavljena u inkubator na  $37^\circ\text{C}$  na 30 min kako bi Matrigel matriks prešao iz tečnog stanja u gelastu strukturu. Istog dana (24 h nakon transfekcije) ćelije su odlepljene



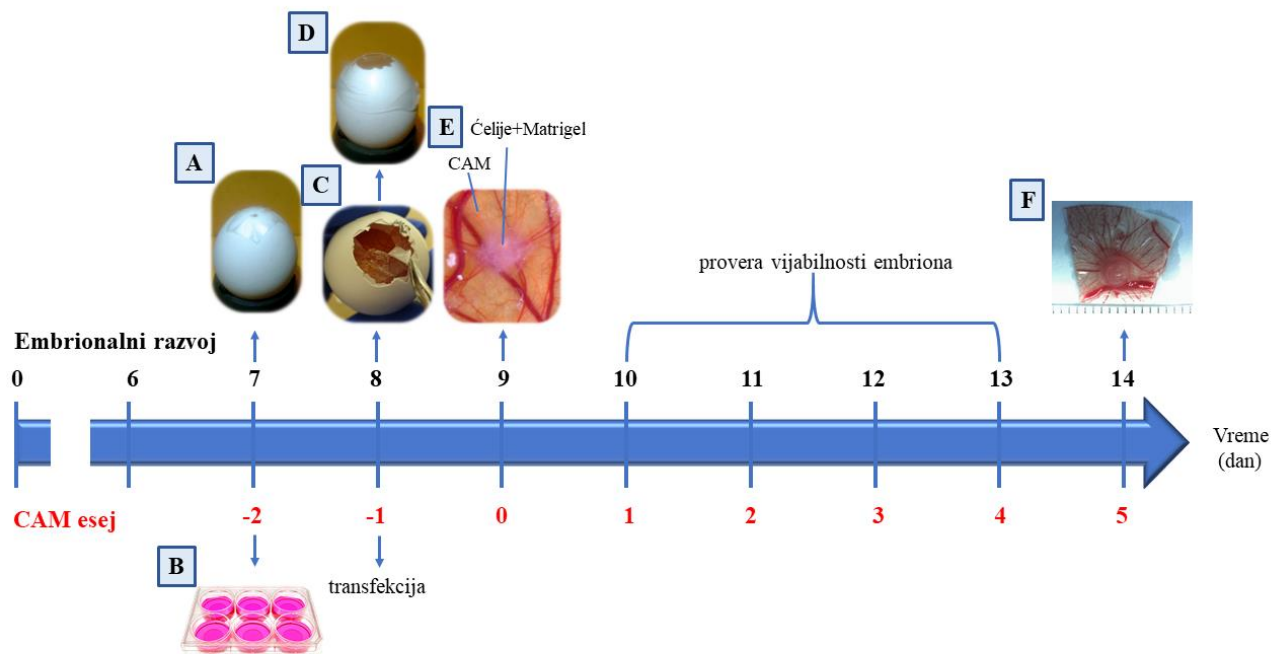
od podloge, prebrojane i zasejane u odgovarajućem medijumu, u zapremini 100  $\mu$ L, u triplikatu, na Matrigel matriks kao što je prikazano u Tabeli 3. Formiranje tuba je praćeno na svetlosnom mikroskopu *DMi1* (Leica, Nemačka) i zabeleženo fotografijama 20 h i 40 h nakon zasejavanja. Eksperiment je ponovljen dva puta.

### 3.11. CAM esej

Za proučavanje uloge hsa-miR-93-5p na rast tumora na *in vivo/in ovo* model sistemu, korišćen je embrion pileta, odnosno CAM esej (eng. *chorioallantoic-membrane assay*, CAM). Prema direktivi 2010/63/EU Evropskog Parlamenta i Saveta od 22. septembra 2010. godine o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe, za izvođenje eksperimenta posredstvom CAM eseja nije potrebna dozvola etičkog komiteta jer ni horioalantoisna membrana ni embrion pileta ne poseduju receptore bola, i eksperimenti se mogu vršiti sve do momenta izleganja [195]. Za CAM esej su korišćena specifična oplođena jaja bez patogena (VALO BioMedia, Nemačka) koja su čuvana u inkubatoru na 37°C i relativnoj vlažnosti oko 80%.

Procedura izvođenja CAM eseja je prikazana na Slici 8. Sedmog dana embrionalnog razvoja, širi pol jajeta po uzdužnoj osi je prebrisan 70% etanolom i preko ljuske je zalepljena Durapore™ hirurška traka (3M, SAD), nakon čega je napravljena rupica u ljusci jajeta pomoću oštre pincete koja je takođe prebrisana 70% etanolom. Rupica u ljusci jajeta se pravi kako bi vazduh izašao i CAM se spustio što će olakšati stavljanje ćelija na CAM. Preko napravljene rupice je stavljen novi sloj Durapore™ hirurške trake i jaja su vraćena u inkubator. Istog dana, SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije su zasejane za transfekciju kao što je prikazano u Tabeli 4. Osmog dana embrionalnog razvoja, na mestu gde je ranije napravljena rupica, sada je pomoću makazica pažljivo napravljen otvor prečnika 1-1,5 cm. Kap PBS rastvora je naneta na membranu koja naleže na ljusku jajeta, nakon čega je membrana probušena. PBS se nanosi kako bi se lakše uočilo mesto na kome je membrana probušena. Zatim je deo membrane ispod napravljenog otvora pažljivo uklonjen kako se ne bi povredili krvni sudovi embriona, nakon čega je bilo moguće pristupiti CAM-u. Ukoliko je embrion izgledao zdravo, preko napravljenog otvora je stavljen Durapore™ hirurška traka i jaja su vraćena u inkubator. Istog dana su SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije transfekovane kako je prikazano u Tabeli 4. Devetog dana embrionalnog razvoja, transfekovane ćelije su prebrojane,  $1 \times 10^6$  ćelija je prebaćeno u 1,5 mL tubu koja je zatim centrifugirana na  $300 \times g$ , 5 min, 4°C dok je preostali deo ćelija sačuvan za analizu ekspresije hsa-miR-93-5p kako bi se proverila uspešnost transfekcije ćelija koje su nanete na CAM. Supernatant je odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u 20  $\mu$ L medijuma, nakon čega je dodato 20  $\mu$ L hladnog Matrigel matriksa i dobro je promešano. Smeša je zatim nanosena u vidu kapi na poklopac Petri posude koja je prvo ostavljena 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim stavljena u inkubator 1 h kako bi Matrigel prešao iz tečnog stanja u gelastu strukturu. Nakon što je smeša ćelija sa Matrigel matriksom očvrstnula, pomoću laboratorijske špatule smeša je pažljivo nanosena na CAM na mesto gde se ukrštaju veći krvni sudovi. Za svaku ćelijsku liniju su urađene 4 transfekcije (hsa-miR-93-5p mimik, mNK, inhibitor i iNK), a za svaku grupu je odvojeno 10 jaja ( $1 \times 10^6$  ćelija pomešanih sa Matrigel matriksom se nanosi na jedno jaje). Naredna 4 dana jaja su svakodnevno proveravana kako bi se eventualno uklonili embrioni koji su uginuli. Tumorska masa je uklonjena sa CAM-a četrnaestog dana embrionalnog razvoja (petog dana od stavljanja ćelija na CAM). Naime, najpre je nekoliko kapi 4% formaldehida (Sigma, SAD) naneto na tumorsku masu, ostavljeno oko 30 s, a zatim je makazicama isečen tumor sa okolnim CAM-om i potopljen u Petri posudu sa PBS-om. Dok je isečena tumorska masa u PBS rastvoru, izvršena je eutanazija embriona dekapitacijom. Tumorska masa sa okolnim CAM-om je prebaćena

iz PBS rastvora na filter membranu od celuloznog acetata (Sartorius, Nemačka), nakon čega je fotografisana i premerena joj je dužina, širina i visina. Sav životinjski otpad je prikupljen, zamrznut na  $-20^{\circ}\text{C}$  tokom noći i dalje uništen prema lokalnim regulativama. Ukupna zapremina tumorske mase je izračunata prema formuli koja pretpostavlja elipsoidni oblik:  $V = \text{dužina} \times \text{širina} \times \text{visina} \times 0,526$  [196]. Eksperiment je izveden jednom.



**Slika 8. Eksperimentalni postupak izvođenja CAM eseja.** A) pravljenje rupice u ljusci jajeta, B) zasejavanje ćelija za transfekciju, C) uklanjanje membrane koja naleže na ljusku jajeta kako bi se oslobodio CAM, D) stavljanje Durapore<sup>TM</sup> hirurške trake preko otvora, E) nanošenje smeše ćelija i Matrigel matriksa na CAM, F) uklanjanje tumorske mase sa CAM-a.

### 3.12. Izolacija RNK

#### 3.12.1. Izolacija RNK iz ćelija i tkiva

Ukupna RNK je izolovana iz ćelija gajenih u kulturi pomoću reagensa TRIzol (Thermo Fisher Scientific, SAD) prateći uputstva proizvođača uz nekoliko modifikacija. Naime, medijum u kojem su gajene ćelije u posudi sa 6 bunarića je odliven i dodato je 1 mL TRIzol reagensa u trajanju od 1 minuta kako bi došlo do lize ćelija. Zatim su ćelije nekoliko puta propuštene kroz nastavak od 1 mL pomoću pipete kako bi se uzorak u potpunosti homogenizovao, pokupljene u 1,5 mL plastičnu tubu i dalje čuvane na  $-80^{\circ}\text{C}$  sve do trenutka izolacije RNK.

Zamrznuti uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi kako bi se odledili, a zatim je dodato 200  $\mu\text{L}$  hloroforma (Merck, Nemačka) nakon čega je smeša dobro promućkana tokom 15 sekundi (s) i ostavljena da se inkubira 10 min. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani u hladnoj kliničkoj centrifugi na  $12000 \times g$  tokom 15 min na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja, u novu plastičnu tubu od 1,5 mL je prebačeno približno 600  $\mu\text{L}$  vodene faze u vidu supernatanta koja sadrži RNK, dok donja organska faza i središnja faza koja sadrži DNK nisu prebačene. U supernatant sa RNK je zatim dodato 500  $\mu\text{L}$  hladnog 100% izopropanola (Merck, Nemačka) i smeša je ostavljena

da se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi. Kako bi došlo do precipitacije RNK uzorci su centrifugirani ( $12000 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) pri čemu je došlo do formiranja RNK taloga. Supernatant je odliven a RNK talog je resuspendovan u 1 mL hladnom 75% etanolu napravljenog u DEPC-om (eng. *diethyl pyrocarbonate*, DEPC) tretiranoj ddH<sub>2</sub>O kako bi se RNK isprala. Uzorci su promešani i ponovo centrifugirani ( $7500 \times g$ , 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), i supernatant je odliven. Uzorci su ostavljeni da se osuše, finalno resuspendovani u 30  $\mu\text{L}$  DEPC-tretiranoj vodi (Thermo Fisher Scientific, SAD) i inkubirani na  $55^{\circ}\text{C}$ , 10 min u termo bloku. Izolovana RNK je čuvana na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Prikupljeni biološki materijal od ispitanika sa mCRC u vidu CRLM i netumorskog tkiva jetre su najpre sitno iseckani pomoću skalpela. Komadići tkiva su zatim prebačeni u 1,5 mL plastičnu tubu sa 500  $\mu\text{L}$  TRIzol reagensa gde su ručno homogenizovani pomoću plastičnih homogenizera prilagođenih 1,5 mL tubama. Nakon homogenizacije, dodato je još 500  $\mu\text{L}$  TRIzol reagensa nakon čega su uzorci centrifugirani kako bi se uklonio nerastvorljivi materijal ( $3500 \times g$ , 4 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant je prebačen u novu 1,5 mL tubu, a dalji koraci protokola od momenta dodavanja hloroforma su isti kao u već opisanom protokolu za izolaciju RNK iz ćelija.

### **3.12.2. Izolacija RNK iz seruma ispitanika sa mCRC**

U 400  $\mu\text{L}$  seruma dodato je 1 mL TRIzol reagensa i 1  $\mu\text{L}$  glikogena oslobođenog od nukleaza (USB, SAD) koncentracije 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Smeša je vorteksovana 20 s kako bi se razbile nastale žučkaste kuglice, a zatim je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Odmah nakon toga, dodato je 200  $\mu\text{L}$  hloroforma i tuba sa uzorkom je snažno mućkana u ruci 20 s, a zatim inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani ( $12,000 \times g$ , 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). U novu plastičnu tubu od 2 mL je prebačeno približno 800  $\mu\text{L}$  gornje vodene faze u vidu supernatanta koja sadrži RNK, a zatim je dodato 1,2 mL izopropanola. Smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana ( $12,000 \times g$ , 8 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant je pažljivo odliven, a zatim je dodat 75% etanol napravljen u DEPC-om tretiranoj ddH<sub>2</sub>O i uzorci su ponovo centrifugirani ( $7500 \times g$ , 5 min, sobna temperatura). Supernatant je uklonjen, a talog je ostavljen da se osuši na 5 min. RNK talog je resuspendovan u 20  $\mu\text{L}$  DEPC-tretiranoj ddH<sub>2</sub>O. Izolovana RNK iz seruma je čuvana na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.13. Određivanje koncentracije RNK**

Koncentracija i čistoća izolovane ukupne RNK je određena spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm, korišćenjem aparata *BioSpec-nano* (Shimadzu, Japan).

### **3.14. Reakcija reverzne transkripcije**

#### **3.14.1. Sinteza komplementarne DNK na osnovu miRNK matrice**

Za sintezu komplementarne DNK (cDNK) na osnovu miRNK matrice, 50 ng ukupne RNK prevedeno je u cDNK koristeći *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Sinteza cDNK na osnovu miRNK matrice se odvijala u reakcionoj smeši ukupnog volumena od 7,5  $\mu\text{L}$  sledećeg sastava:

- 2,08  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O oslobođene od nukleaza
- 0,75  $\mu\text{L}$  10  $\times$  *Reverse Transcription Buffer*
- 1,5  $\mu\text{L}$  5  $\times$  *Reverse Transcription Primer* (specifičan za svaku miRNK)
- 0,5  $\mu\text{L}$  *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 50 U/ $\mu\text{L}$
- 0,075  $\mu\text{L}$  *dNTPs (with dTTP)*, 100mM
- 0,095  $\mu\text{L}$  *RNase Inhibitor*, 20 U/ $\mu\text{L}$
- 2,5  $\mu\text{L}$  ukupne RNK (50 ng)

Za sintezu cDNK na osnovu miRNK matrice korišćen je sledeći program: 16°C 30 min, 42°C 30 min i 85°C 5 min.

### 3.14.2. Sinteza komplementarne DNK na osnovu iRNK matrice

Za sintezu cDNK na osnovu iRNK matrice, 1  $\mu\text{g}$  ukupne RNK preveden je u cDNK koristeći *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, SAD). Sinteza cDNK na osnovu iRNK matrice se odvijala u reakcionoj smeši ukupnog volumena od 20  $\mu\text{L}$  sledećeg sastava:

- 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  *RT Buffer*
- 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  *RT Random Primers*
- 0,8  $\mu\text{L}$  25  $\times$  *dNTP Mix*, 100 mM
- 1  $\mu\text{L}$  *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*
- 1  $\mu\text{g}$  RNK
- ddH<sub>2</sub>O oslobođene od nukleaza do 20  $\mu\text{L}$

Za sintezu cDNK na osnovu iRNK matrice korišćen je sledeći program: 25°C 10 min, 37°C 120 min i 85°C 5 min.

## 3.15. Kvantitativna reverzno-transkripciona reakcija lančanog umnožavanja (qRT-PCR)

Za analizu ekspresije gena od interesa korišćena je kvantitativna reverzno-transkripciona reakcija lančanog umnožavanja (eng. *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) koja se odvija u realnom vremenu. Za detalje vezano za reakcione smeše videti sekcije 3.15.1 i 3.15.2. Za reakciju umnožavanja je korišćen sledeći program: 50°C 2 min, 95°C 10 min, praćeno sa 40 ciklusa na 95°C 15 s i 60°C 1 min. Merenje je izvršeno na aparatu *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD), a podaci su prikupljeni i obrađeni pomoću softvera *7500 System Software*. Nakon svakog merenja određena je kriva topljenja fragmenta kako bi se potvrdila specifičnost reakcije, sem ukoliko je korišćena *TaqMan* hemija. Svaki uzorak je analiziran u triplikatu.

### 3.15.1. Analiza ekspresije miRNK

Za kvantifikaciju ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p i hsa-miR-93-5p korišćen je komercijalni esej *TaqMan MicroRNA Assay* (identifikacioni broj eseja 002308, 000397, 001090, respektivno) (Thermo Fisher Scientific, SAD). Relativna ekspresija humanog gena *RNU6B* (*TaqMan Assay*, 001093) ili ekspresija hsa-miR-16-5p (*TaqMan MicroRNA Assay*, 001093) su korišćene za normalizaciju ekspresije miRNK u eksperimentima u ćelijskoj kulturi, dok je hsa-miR-

16-5p korišćena za normalizaciju ekspresije hsa-miR-93-5p u serumu ispitanika sa mCRC. Reakcija qRT-PCR za analizu ekspresije miRNK pripremljena je tako da sadrži:

- 5  $\mu$ L *TaqMan 2  $\times$  Universal PCR Master Mix, No AmpErase<sup>TM</sup> UNG*
- 0,5  $\mu$ L 20  $\times$  *TaqMan MicroRNA Assay* (specifičan za svaku miRNK)
- 0,66  $\mu$ L proizvoda reakcije reverzne transkripcije
- ddH<sub>2</sub>O oslobođene od nukleaza do 10  $\mu$ L

### 3.15.2. Analiza ekspresije iRNK

Za kvantifikaciju ekspresije gena *PAI-1*, *CDHI*, *VIM* i *GAPDH* korišćena je komercijalna hemija *HOT FIREPol<sup>®</sup> EvaGreen<sup>®</sup> qPCR Mix Plus (ROX)* (Solis BioDyne, Estonija). Sekvence korišćenih oligonukleotidnih graničnika su prikazani u Tabeli 5. Relativna ekspresija humanog gena *GAPDH* je korišćena za normalizaciju ekspresije gena *PAI-1*, *CDHI* i *VIM*. Reakcija qRT-PCR za analizu ekspresije gena od interesa pripremljena je tako da sadrži:

- 2  $\mu$ L 5  $\times$  *HOT FIREPol<sup>®</sup> EvaGreen<sup>®</sup> qPCR Mix Plus*
- 0,2  $\mu$ L F graničnika, 10  $\mu$ M
- 0,2  $\mu$ L R graničnika, 10  $\mu$ M
- 1  $\mu$ L cDNK (prethodno razblažena 1:5,  $\approx$  200 ng)

**Tabela 5. Nukleotidne sekvence korišćenih graničnika.**

Oznaka graničnika za dati gen	Sekvenca u smeru 5'-3'	Dužina produkta (bp)
<i>PAI-1</i> F	CAAGATTGATGACAAGGGGCAT	205
<i>PAI-1</i> R	GGCTCTCTCCACCTCTGAAA	
<i>CDHI</i> F	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG	200
<i>CDHI</i> R	GTGTATGTGGCAATGCGTTC	
<i>VIM</i> F	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	163
<i>VIM</i> R	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC	
<i>GAPDH</i> F	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	112
<i>GAPDH</i> R	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	

Skraćenica: bp - bazni par.

### 3.15.3. Obrada podataka nakon qRT-PCR

Ekspresija ciljnog gena je normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu i/ili u odnosu na kalibrator (ćelije tretirane samo ddH<sub>2</sub>O u *in vitro* eksperimentima). Podaci o ekspresiji željenog gena kod ispitanika sa mCRC su analizirani 2<sup>dCt</sup> metodom, dok su podaci o ekspresiji željenog gena u ćelijskoj kulturi analizirani korišćenjem 2<sup>-dCt</sup> ili 2<sup>-ddCt</sup> metode.

Relativna vrednost količine ekspresije gena analizirana 2<sup>dCt</sup> metodom se dobija prema formuli:

$$X_1 = 2^{dCt}, \text{ gde je}$$

$$dCt = Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}} - Ct_{\text{target, uzorak}}.$$

Relativna vrednost količine ekspresije gena analizirana  $2^{-dCt}$  metodom se dobija prema formuli:

$$X_2 = 2^{-dCt}, \text{ gde je}$$

$$dCt = Ct_{\text{target, uzorak}} - Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}}.$$

Relativna vrednost količine ekspresije gena analizirana  $2^{-ddCt}$  metodom se dobija prema formuli:

$$X_3 = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$$ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{kalibrator}} = (Ct_{\text{target, uzorak}} - Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}}) - (Ct_{\text{target, kalibrator}} - Ct_{\text{endogena kontrola, kalibrator}}).$$

Ct vrednost u prikazanim formulama se odnosi na prosečnu Ct vrednost analiziranih triplikata.

Za izračunavanje skora EMT korišćena je  $\log_2$ -transformacija odnosa ekspresije gena *CDHI* i *VIM* izražena kroz njihove  $2^{-dCt}$  vrednosti. Formula za izračunavanje skora EMT glasi:

$$\text{Skor EMT} = \log_2 (2^{-dCt_{CDHI}} / 2^{-dCt_{VIM}}) [197].$$

### 3.16. Biološki materijal poreklom od ispitanika sa CRLM

U ovu studiju je uključeno 35 ispitanika sa CRLM koji su praćeni na Klinici za digestivnu hirurgiju - I hirurška, Univerzitetski klinički centar Srbije u periodu od maja 2019. godine do aprila 2020. godine. Svi ispitanici su podvrgnuti resekciji jetre sa kurativnom namerom zbog CRLM. Lekari specijalisti iz oblasti opšte i abdominalne hirurgije su obavljali regrutovanje ispitanika.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju bili su:

- kurativna resekcija jetre, simultano ili nakon radikalne resekcije primarnog karcinoma zbog CRLM
- starost 18-90 godina u trenutku resekcije jetre
- potpisan informisani pristanak na predloženo lečenje.

Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz studije bili su:

- prisustvo primarnog karcinoma ili konkomitantnih ekstrahepatičnih metastaza koje se neće tretirati kurativnom resekcionom procedurom simultano sa resekcijom jetre
- prethodno kurativno hirurško lečenje metastaza u jetri.

Podaci koji su prikupljeni od ispitanika podrazumevali su demografske i kliničko-patološke karakteristike uključujući: pol, starost, informacije o primarnom karcinomu (lokalizacija, TNM stadijum, L stadijum (invazija u limfne sudove), V stadijum (invazija u vene), R stadijum (resekcija), PN stadijum (invazija u perineuralni prostor), stadijum po Dukes-u, administracija neoadjuvantne i/ili adjuvantne hemioterapije), informacije o metastatskom karcinomu (broj, prečnik i lobarna distribucija CRLM, prisustvo metastaza pri dijagnozi, prezentacija metastaza, histološka diferenciranost, rezidualni status, administracija neoadjuvantne i/ili adjuvantne hemioterapije), vrednosti tumor markera CEA (eng. *carcinoembryonic antigen*, CEA) i CA 19-9 (eng. *carbohydrate antigen*, CA) u serumu i pojavu recidiva. Stadijum tumora je određen

transabdomalnim ultrazvukom, radiografijom grudnog koša, računarskom tomografijom i/ili magnetnom rezonancom.

Ukupno 17 ispitanika je primalo neoadjuvantnu hemioterapiju baziranu na 5-FU u formi:

- FOLFOX-bevacizumab (N=12), pri čemu je jedan ispitanik kao drugu liniju lečenja primio kombinaciju lekova cetuksimab-irinotekan
- CAPOX-bevacizumab (N=3)
- FOLFOX-CAPOX (N=1)
- kapecitabin (N=1).

Objektivni odgovor tumora na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju je izračunat prema RECIST smernicama verzije 1.1 (eng. *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*, RECIST) [198]. Na osnovu ovih smernica ispitanici su svrstani u 4 grupe:

- kompletan odgovor - nestanak svih target lezija
- parcijalni odgovor - najmanje 30% smanjenja zbira prečnika svih target lezija
- progresivna bolest - najmanje 20% povećanja zbira prečnika svih target lezija
- stabilna bolest - niti dovoljno smanjenje target lezija da bi se odgovor okarakterisao kao parcijalni odgovor, niti dovoljno povećanje da bi se odgovor okarakterisao kao progresivna bolest.

Na osnovu ove podele, ispitanici su dalje klasifikovani u 2 grupe: ispitanici koji su pokazali odgovor na neoadjuvantnu hemioterapiju (kompletan odgovor i parcijalni odgovor) i ispitanici koji nisu pokazali odgovor na neoadjuvantnu hemioterapiju (progresivna bolest i stabilna bolest) [199].

Svi ispitanici su praćeni tokom jedne godine nakon operacije kako bi se detektovao potencijalni recidiv. Različiti dijagnostički testovi su primenjivani u nekoliko vremenskih tačaka, a oni su uključivali: merenje nivoa tumor markera CEA i CA 19-9 i transabdominalni ultrazvuk na svaka 3 meseca, zatim radiografija grudnog koša i /ili magnetna rezonanca nakon 6 meseci i nakon godinu dana od resekcije jetre, dok su kolonoskopija/rektoskopija i pozitronska emisija tomografija uzimane u obzir ukoliko je postojala sumnja na lokalni ili udaljeni recidiv. Rani recidiv definisan je kao prisustvo recidiva na mestu primarne resekcije karcinoma, pojave novih metastaza u jetri ili ekstrahepatične bolesti godinu dana posle operacije. U odnosu na pojavu recidiva, ispitanici su podeljeni na grupu ispitanika koja je razvila recidiv i na grupu koja nije razvila recidiv.

Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (pod brojem 110/1, dana 23.05.2019. godine). Za sve ispitanike obuhvaćene ovom studijom je dobijena pismena saglasnost za uključjenje u studiju.

Od svih 35 ispitanika sa CRLM je prikupljen biološki materijal u vidu seruma, CRLM i okolnog netumorskog tkiva jetre neposredno uz metastazu.

Serum je izdvojen iz periferne krvi ispitanika (10-15 mL) u periodu od sedam dana pre operacije do neposredno pred operaciju. Uzorci periferne krvi su ostavljeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min kako bi došlo do koagulacije, a zatim su centrifugirani (3500 rpm, 10 min). Dobijeni supernatant je prebačen u novu tubu od 1,5 mL i ponovo centrifugiran (3500 rpm, 5 min) kako bi se u potpunosti oslobodili prisustva eventualno zaostalih ćelija. Dobijeni supernatant u vidu seruma je zamrznut i čuvan na temperaturi -80°C do momenta izolacije RNK.

CRLM i okolno netumorsko tkivo jetre su uzorkovani isecanjem sa preparata neposredno po završetku resekcije jetre i momentalno potopljeni u rastvor *RNAlater® RNA Stabilization Solution* (Thermo Fisher Scientific, Litvanija) i dalje čuvani na -80°C do momenta izolacije RNK.

### 3.17. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka su korišćeni softveri *GraphPad Prism 9.0.0* i *IBM SPSS Statistics 20.0* u zavisnosti od korišćenog testa. Kategorijske varijable su predstavljene kao apsolutni brojevi izraženi u procentima, dok su kontinualne varijable predstavljene kao medijana sa opsegom vrednosti ili kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Kolmogorov-Smirnov test je korišćen kako bi se ispitala normalna distribucija kontinualnih vrednosti i izabrao odgovarajući test. U slučaju normalne distribucije kontinualnih vrednosti primenjen je Student-ov t-test, jednofaktorska analiza varijanse (pod uslovom da je zadovoljen i uslov homogenosti varijanse koji je ispitan Levene-ovim testom) praćena Dunette-ovim post hoc testom kako bi se uporedili tretmani u odnosu na kontrolni tretman, i određen je Pearson-ov koeficijent korelacije. Spearman-ov koeficijent korelacije, Kruskal–Wallis-ov test, Mann-Whitney U test za dva nezavisna uzorka ili Wilcoxon-ov test sume rankova su korišćeni za distribuciju kontinualnih vrednosti koja je odstupala od normalne kad god je to bilo prikladno. Nezavisne kategorijske promenljive su analizirane korišćenjem Fisher-ovog  $\chi^2$  testa kako bi se analizirali prognostički faktori za nastanak ranog recidiva. Multipla regresija je korišćena kako bi se testirala povezanost ekspresije *PAI-1* sa ekspresijom odabranih miRNK nakon kombinovanih tretmana. Statistički značajnom je smatrana  $p$  vrednost  $\leq 0,050$ . Na slikama u rezultatima nisu predstavljene relevantne veze koje nisu bile statistički značajne.

Kako bi se odredila granična vrednost ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu na osnovu uzoraka, odrađena je analiza ROC krive (eng. *Receiver Operating Characteristic*, ROC) uz korišćenje Youden-ovog indeksa. Formula za izračunavanje Youden-ovog indeksa glasi: Youden-ov indeks = senzitivnost + specifičnost - 1, a u SPSS programu je korišćena opcija gde veći rezultat testa ukazuje na pozitivniji test. Na osnovu dobijene granične vrednosti, ispitanici su podeljeni u odgovarajuće grupe, odnosno u grupu sa visokom ekspresijom hsa-miR-93-5p i u grupu sa niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM ili u serumu. Kaplan-Meier-ov metod uz primenu Log rank testa je korišćen kako bi se procenilo jednogodišnje preživljavanje bez recidiva kod ispitanika sa visokom ili niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM ili u serumu.



## 4. REZULTATI

### 4.1. *In silico* identifikacija miRNK koje regulišu članove kanonskog TGFβ signalnog puta

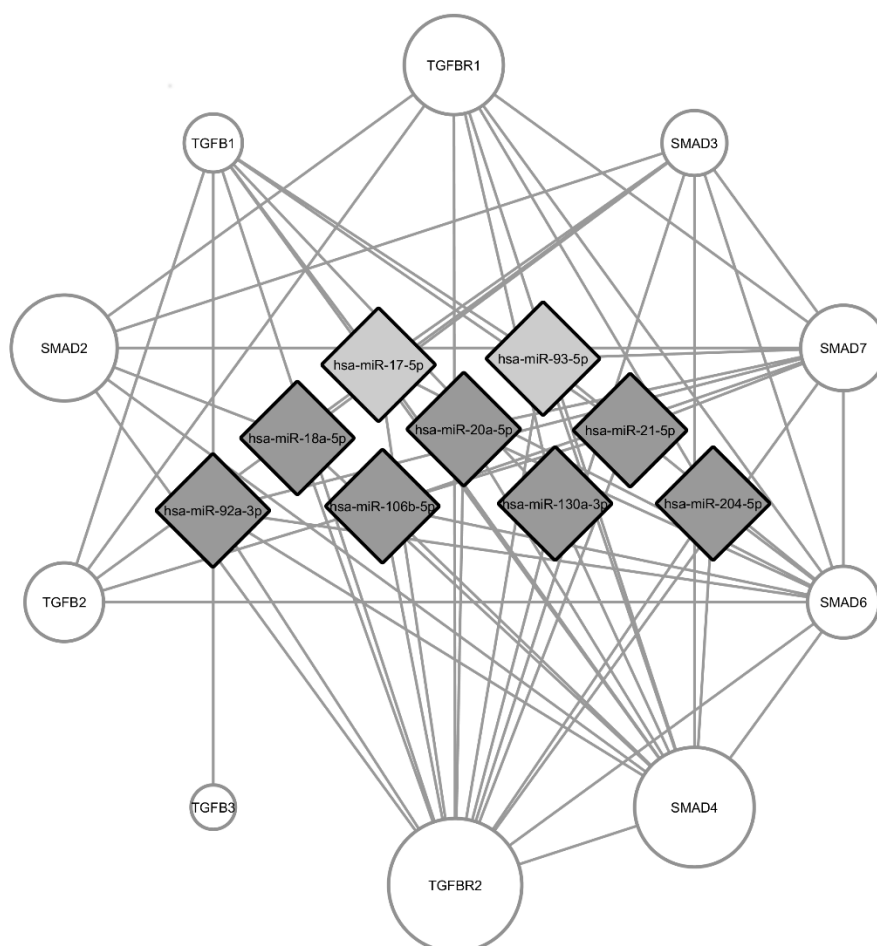
*In silico* alati su korišćeni kako bi se identifikovale miRNK koje regulišu članove kanonskog TGFβ signalnog puta. Pretragom modula miRWalk2.0 baze podataka koji sadrži informacije o eksperimentalno potvrđenim interakcijama miRNK sa iRNK, identifikovano je ukupno 316 jedinstvenih miRNK koje regulišu članove kanonskog TGFβ signalnog puta. Kompletan lista miRNK koje regulišu članove kanonskog TGFβ signalnog puta je prikazana u Tabeli 6.

Obradom rezultata prikazanih u Tabeli 6, pokazano je da je od gena koji pripadaju kanonskom TGFβ signalnom putu gen *TGFBR2* regulisan sa najviše miRNK (101 miRNK), nakon čega sledi gen *SMAD4* (76 miRNK), *SMAD2* (48 miRNK), *TGFBR1* (46 miRNK), *SMAD7* (45 miRNK), *SMAD6* (30 miRNK), *TGFBR2* (26 miRNK), *SMAD3* (17 miRNK), *TGFB1* (14 miRNK) i na kraju *TGFB3* (3 miRNK). Molekulima miRNK koje regulišu najveći broj članova kanonskog TGFβ signalnog puta pripadaju hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p koje regulišu po 5 članova, dok hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p i hsa-miR-92a-3p regulišu po 4 člana kanonskog TGFβ signalnog puta (Slika 9 i Tabela 7).

**Tabela 6. Kompletan lista miRNK koje targetuju članove kanonskog TGFβ signalnog puta.**

<p><b>TGFB1</b></p> <p>hsa-miR-21-5p hsa-miR-633 hsa-miR-24-3p hsa-miR-29b-3p hsa-miR-744-5p hsa-miR-122-5p hsa-miR-130a-3p hsa-miR-17-5p hsa-miR-19b-3p hsa-miR-144-3p hsa-miR-663a hsa-miR-211-5p hsa-miR-93-5p hsa-miR-324-3p</p>	<p>hsa-miR-6826-3p hsa-miR-6832-3p hsa-miR-8058</p> <p><b>TGFB3</b></p> <p>hsa-miR-29a-3p hsa-miR-10a-5p hsa-miR-29b-3p</p> <p><b>TGFBR1</b></p> <p>hsa-let-7b-5p hsa-let-7c-5p hsa-let-7d-5p hsa-let-7f-5p hsa-let-7g-5p hsa-miR-101-3p hsa-miR-1283 hsa-miR-128-3p hsa-miR-130a-3p hsa-miR-1343-3p hsa-miR-135b-5p hsa-miR-140-5p hsa-miR-142-3p hsa-miR-181a-5p hsa-miR-204-3p hsa-miR-204-5p hsa-miR-216a-3p hsa-miR-27a-3p hsa-miR-27b-3p hsa-miR-3153 hsa-miR-3156-5p hsa-miR-3529-5p hsa-miR-3681-3p hsa-miR-376c-3p hsa-miR-379-5p hsa-miR-3927-3p hsa-miR-4480 hsa-miR-4643 hsa-miR-4646-5p hsa-miR-466 hsa-miR-4668-5p</p>	<p>hsa-miR-4789-3p hsa-miR-6733-5p hsa-miR-6739-5p hsa-miR-6742-3p hsa-miR-6783-3p hsa-miR-6795-3p hsa-miR-6826-3p hsa-miR-6831-5p hsa-miR-6852-5p hsa-miR-6887-3p hsa-miR-6888-3p hsa-miR-8063 hsa-miR-8083 hsa-miR-939-3p hsa-miR-98-5p</p> <p><b>TGFBR2</b></p> <p>hsa-let-7f-2-3p hsa-miR-101-3p hsa-miR-106a-5p hsa-miR-106b-5p hsa-miR-1185-1-3p hsa-miR-1185-2-3p hsa-miR-1200 hsa-miR-1253 hsa-miR-1276 hsa-miR-130a-3p hsa-miR-130b-3p hsa-miR-142-5p hsa-miR-147a hsa-miR-17-5p hsa-miR-1827 hsa-miR-18a-5p hsa-miR-1910-3p hsa-miR-19a-3p hsa-miR-19b-3p hsa-miR-204-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-20b-5p hsa-miR-211-5p</p>	<p>hsa-miR-21-5p hsa-miR-216a-5p hsa-miR-2682-5p hsa-miR-301a-3p hsa-miR-302b-3p hsa-miR-3065-5p hsa-miR-3200-5p hsa-miR-335-5p hsa-miR-33a-3p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-34b-5p hsa-miR-34c-5p hsa-miR-3609 hsa-miR-3666 hsa-miR-370-3p hsa-miR-372-3p hsa-miR-373-3p hsa-miR-3978 hsa-miR-409-3p hsa-miR-4295 hsa-miR-4316 hsa-miR-4324 hsa-miR-4438 hsa-miR-449a hsa-miR-449b-5p hsa-miR-449c-5p hsa-miR-454-3p hsa-miR-4649-3p hsa-miR-4732-5p hsa-miR-4796-3p hsa-miR-488-3p hsa-miR-495-3p hsa-miR-505-3p hsa-miR-5095 hsa-miR-515-5p hsa-miR-519a-3p hsa-miR-519b-3p hsa-miR-519c-3p hsa-miR-519d-3p</p>	<p>hsa-miR-519e-5p hsa-miR-526b-3p hsa-miR-544b hsa-miR-548ah-5p hsa-miR-548c-3p hsa-miR-548u hsa-miR-551b-5p hsa-miR-5590-3p hsa-miR-5688 hsa-miR-570-3p hsa-miR-574-5p hsa-miR-582-5p hsa-miR-590-5p hsa-miR-595 hsa-miR-606 hsa-miR-610 hsa-miR-630 hsa-miR-6511a-5p hsa-miR-655-3p hsa-miR-6758-3p hsa-miR-6758-5p hsa-miR-6770-5p hsa-miR-6777-3p hsa-miR-6806-5p hsa-miR-6808-5p hsa-miR-6818-5p hsa-miR-6832-5p hsa-miR-6856-5p hsa-miR-6867-5p hsa-miR-6893-5p hsa-miR-7151-3p hsa-miR-7159-5p hsa-miR-7161-5p hsa-miR-7162-3p hsa-miR-7849-3p hsa-miR-92a-3p hsa-miR-93-5p hsa-miR-940 hsa-miR-9-5p</p>
--	--	---	---	--

<p><b>SMAD2</b>  hsa-let-7g-5p  hsa-miR-106a-3p  hsa-miR-1228-3p  hsa-miR-1324  hsa-miR-146a-5p  hsa-miR-148a-3p  hsa-miR-155-5p  hsa-miR-181a-5p  hsa-miR-188-5p  hsa-miR-18a-5p  hsa-miR-18b-5p  hsa-miR-192-3p  hsa-miR-196a-3p  hsa-miR-200a-3p  hsa-miR-200b-3p  hsa-miR-2115-3p  hsa-miR-2276-5p  hsa-miR-27a-3p  hsa-miR-27b-3p  hsa-miR-324-5p  hsa-miR-329-3p  hsa-miR-3613-3p  hsa-miR-361-5p  hsa-miR-362-3p  hsa-miR-371a-5p  hsa-miR-372-5p  hsa-miR-374a-3p  hsa-miR-4469  hsa-miR-4502  hsa-miR-4757-5p  hsa-miR-484  hsa-miR-495-5p  hsa-miR-503-5p  hsa-miR-505-3p  hsa-miR-5089-3p  hsa-miR-548av-3p  hsa-miR-548g-3p  hsa-miR-5680  hsa-miR-5702  hsa-miR-6072  hsa-miR-624-3p  hsa-miR-642a-5p  hsa-miR-6501-5p  hsa-miR-652-3p</p>	<p>hsa-miR-6744-3p  hsa-miR-6891-3p  hsa-miR-6892-3p  hsa-miR-937-5p</p> <p><b>SMAD3</b>  hsa-miR-143-3p  hsa-miR-145-5p  hsa-miR-155-5p  hsa-miR-15a-5p  hsa-miR-15b-5p  hsa-miR-16-5p  hsa-miR-17-5p  hsa-miR-18a-3p  hsa-miR-18a-5p  hsa-miR-193b-3p  hsa-miR-195-5p  hsa-miR-200a-3p  hsa-miR-335-5p  hsa-miR-3529-3p  hsa-miR-4290  hsa-miR-491-5p  hsa-miR-92b-3p</p> <p><b>SMAD4</b>  hsa-miR-106a-5p  hsa-miR-106b-5p  hsa-miR-125a-5p  hsa-miR-125b-5p  hsa-miR-1260b  hsa-miR-130a-3p  hsa-miR-130b-3p  hsa-miR-145-5p  hsa-miR-1468-3p  hsa-miR-146a-5p  hsa-miR-154-5p  hsa-miR-155-5p  hsa-miR-17-5p  hsa-miR-182-5p  hsa-miR-183-5p  hsa-miR-186-5p  hsa-miR-18a-5p  hsa-miR-199a-5p  hsa-miR-19a-3p  hsa-miR-19b-3p  hsa-miR-204-5p  hsa-miR-205-5p</p>	<p>hsa-miR-20a-5p  hsa-miR-20b-5p  hsa-miR-224-5p  hsa-miR-26a-5p  hsa-miR-27a-3p  hsa-miR-27b-3p  hsa-miR-301a-3p  hsa-miR-302a-5p  hsa-miR-34a-5p  hsa-miR-34c-5p  hsa-miR-3666  hsa-miR-371b-5p  hsa-miR-373-5p  hsa-miR-421  hsa-miR-4295  hsa-miR-449a  hsa-miR-449b-5p  hsa-miR-452-5p  hsa-miR-4528  hsa-miR-454-3p  hsa-miR-4668-5p  hsa-miR-4799-5p  hsa-miR-483-3p  hsa-miR-513a-5p  hsa-miR-519a-3p  hsa-miR-519b-3p  hsa-miR-519c-3p  hsa-miR-519d-3p  hsa-miR-526b-3p  hsa-miR-548aj-5p  hsa-miR-548au-3p  hsa-miR-548aw  hsa-miR-548az-5p  hsa-miR-548c-3p  hsa-miR-548f-5p  hsa-miR-548g-5p  hsa-miR-548t-5p  hsa-miR-548x-5p  hsa-miR-551b-5p  hsa-miR-5582-3p  hsa-miR-5701  hsa-miR-6072  hsa-miR-616-3p  hsa-miR-616-5p  hsa-miR-670-3p</p>	<p>hsa-miR-6715a-3p  hsa-miR-6715b-3p  hsa-miR-6731-3p  hsa-miR-6891-3p  hsa-miR-8062  hsa-miR-8076  hsa-miR-888-5p  hsa-miR-92a-3p  hsa-miR-93-5p</p> <p><b>SMAD6</b>  hsa-let-7c-5p  hsa-miR-106b-5p  hsa-miR-1238-3p  hsa-miR-1305  hsa-miR-134-5p  hsa-miR-17-5p  hsa-miR-204-5p  hsa-miR-20a-5p  hsa-miR-20b-5p  hsa-miR-211-5p  hsa-miR-26b-5p  hsa-miR-3118  hsa-miR-3124-3p  hsa-miR-3164  hsa-miR-32-5p  hsa-miR-4287  hsa-miR-4501  hsa-miR-4685-3p  hsa-miR-4691-5p  hsa-miR-519d-3p  hsa-miR-520h  hsa-miR-670-3p  hsa-miR-6749-3p  hsa-miR-6792-3p  hsa-miR-6820-3p  hsa-miR-6832-3p  hsa-miR-8066  hsa-miR-92a-3p  hsa-miR-92b-3p  hsa-miR-93-5p</p> <p><b>SMAD7</b>  hsa-miR-100-5p  hsa-miR-103a-3p  hsa-miR-106b-5p  hsa-miR-1244</p>	<p>hsa-miR-15a-5p  hsa-miR-15b-5p  hsa-miR-16-5p  hsa-miR-195-5p  hsa-miR-20a-5p  hsa-miR-21-5p  hsa-miR-216a-5p  hsa-miR-217  hsa-miR-25-3p  hsa-miR-26b-5p  hsa-miR-32-5p  hsa-miR-3616-5p  hsa-miR-3664-3p  hsa-miR-374b-3p  hsa-miR-376a-3p  hsa-miR-3973  hsa-miR-424-5p  hsa-miR-4459  hsa-miR-4524a-5p  hsa-miR-4524b-5p  hsa-miR-4768-3p  hsa-miR-4795-5p  hsa-miR-497-5p  hsa-miR-503-5p  hsa-miR-510-5p  hsa-miR-520g-3p  hsa-miR-544a  hsa-miR-545-3p  hsa-miR-573  hsa-miR-595  hsa-miR-644a  hsa-miR-646  hsa-miR-663b  hsa-miR-6735-3p  hsa-miR-6838-5p  hsa-miR-7108-5p  hsa-miR-766-5p  hsa-miR-92a-3p  hsa-miR-92b-3p  hsa-miR-93-5p  hsa-miR-98-5p</p>
---	--	--	--	--



**Slika 9. Prikaz mreže miRNK koje regulišu članove kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta.** Legenda: krugovi - geni uključeni u kanonsku TGF $\beta$  signalizaciju (veličina kruga odlikava broj miRNK koje regulišu dati gen), svetli i tamni kvadrati - miRNK koje regulišu po 5 i 4 člana kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta, respektivno. Interaktivni prikaz je dostupan na sledećem linku: <http://bit.ly/TGFb-miRNAs>.

**Tabela 7. miRNK koje regulišu po 5 i 4 člana kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta.**

Broj članova TGF $\beta$ signalnog puta koje reguliše data miRNK	miRNK	Članovi TGF $\beta$ signalnog puta
5	hsa-miR-17-5p	<i>TGFB1, TGFB2, SMAD3, SMAD4, SMAD6</i>
	hsa-miR-93-5p	<i>TGFB1, TGFB2, SMAD4, SMAD6, SMAD7</i>
4	hsa-miR-106b-5p	<i>TGFB2, SMAD4, SMAD6, SMAD7</i>
	hsa-miR-130a-3p	<i>TGFB1, TGFB1, TGFB2, SMAD4</i>
	hsa-miR-18a-5p	<i>TGFB2, SMAD2, SMAD3, SMAD4</i>
	hsa-miR-204-5p	<i>TGFB1, TGFB2, SMAD4, SMAD6</i>
	hsa-miR-20a-5p	<i>TGFB2, SMAD4, SMAD6, SMAD7</i>
	hsa-miR-21-5p	<i>TGFB1, TGFB2, TGFB2, SMAD7</i>
	hsa-miR-92a-3p	<i>TGFB2, SMAD4, SMAD6, SMAD7</i>

Od ukupno identifikovanih 316 miRNK, za dalju analizu su odabrane hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p, zato što ove miRNK regulišu najviše članova TGF $\beta$  signalnog puta (po 5 članova), pa se očekuje da će promene u ovim miRNK imati najveći uticaj na ukupnu aktivnost TGF $\beta$  signalnog puta. Dodatno, iz grupe miRNK koje regulišu po 4 člana TGF $\beta$  signalnog puta, u analizu je uključena i hsa-miR-21-5p zbog njene dobro poznate onkogene uloge u CRC (Tabela 7).

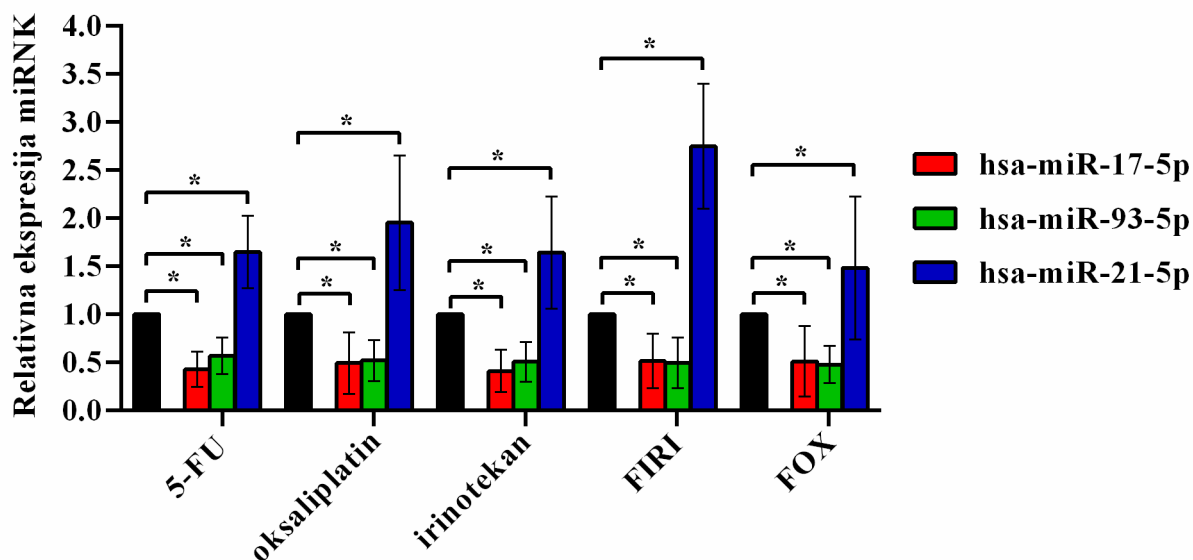
#### **4.2. Ispitivanje odgovora miRNK hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p i signalnog puta TGF $\beta$ na hemioterapiju za mCRC *in vitro***

Odgovor miRNK hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p i signalnog puta TGF $\beta$  na hemioterapiju za lečenje mCRC je ispitan *in vitro* na SW620<sub>B</sub>, SW620<sub>E</sub> i HCEC-1CT ćelijama, a zatim je taj odgovor koreliran sa odgovorom samih ćelija na hemioterapiju.

##### **4.2.1. Ekspresija hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p nakon tretmana standardnim hemioterapeutcima za lečenje mCRC**

Kako bi se ispitao uticaj standardnih hemioterapeutika za lečenje mCRC na ekspresiju 3 odabrane miRNK koje regulišu članove kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta, SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane sa 21,4  $\mu$ M 5-FU, 85  $\mu$ M oksaliplatinom, 16  $\mu$ M irinotekanom ili njihovim kombinacijama u vidu FIRI i FOX režima tokom 72 h. Svi testirani tretmani su doveli do smanjenja ekspresije hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p za približno 50% u poređenju sa kontrolnim ćelijama ( $p < 0,050$ ) (Slika 10), dok je ekspresija hsa-miR-21-5p bila povećana nakon svih tretmana ( $p < 0,050$ ). Među testiranim hemioterapeutskim lekovima, kombinovani FIRI tretman je doveo do najizražajnijeg povećanja ekspresije hsa-miR-21-5p, u poređenju sa kontrolnim ćelijama.

Ovi rezultati pokazuju da 5-FU, oksaliplatin, irinotekan i njihovi kombinovani režimi utiču na ekspresiju miRNK koje regulišu TGF $\beta$  signalni put hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p u SW620<sub>B</sub> ćelijama.

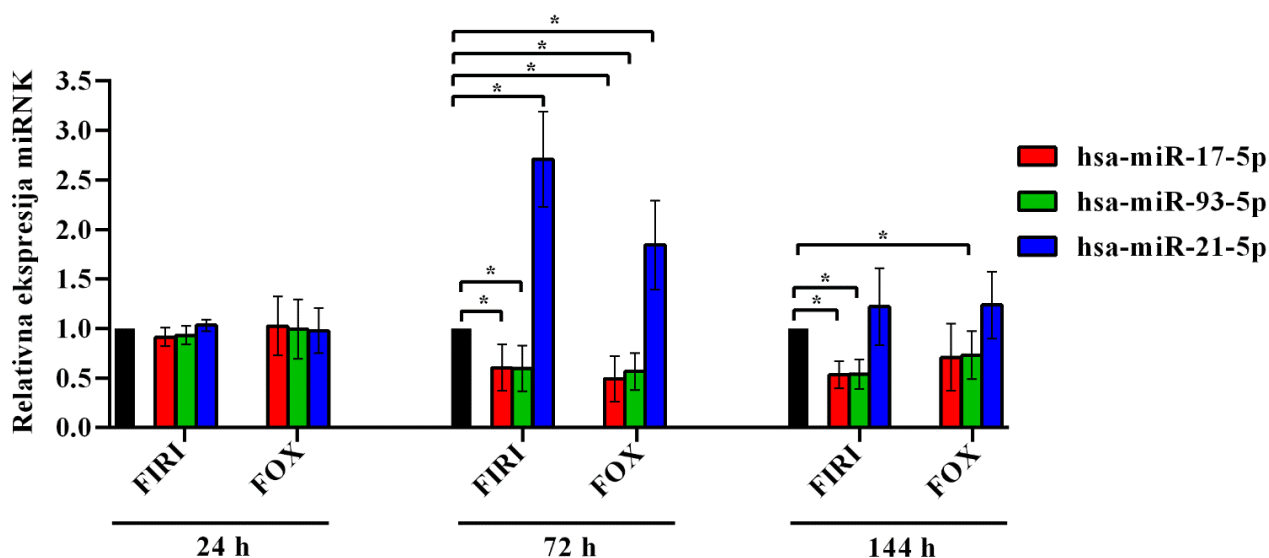


**Slika 10. Ekspresija hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.** qRT-PCR analiza relativne ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p ( $2^{-\text{ddCt}}$ ) 72 h nakon tretmana sa 5-FU, oksaliplatinom, irinotekanom i njihovim kombinovanim režimima FIRI i FOX. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije  $\pm$  standardna devijacija (SD) iz 3 nezavisna eksperimenta. Crni stub predstavlja odgovarajuću kontrolu. \*  $p < 0,050$ .

#### 4.2.2. Promena ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC tokom vremena

Kako bi se utvrdilo da li je modularni efekat koji standardni hemioterapeutici za lečenje mCRC imaju na odabrane miRNK tranzijentan ili stabilan, ekspresija odabranih miRNK je izmerena 24, 72, i 144 h nakon tretmana sa kombinovanim režimima FIRI i FOX. Kao što je prikazano na Slici 11, ekspresija sve 3 testirane miRNK je bila stabilna 24 h nakon tretmana. Ekspresija hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p je pokazala trend ka smanjenju ekspresije od 24 h do 144 h nakon tretmana. Ekspresija hsa-miR-21-5p je 72 h nakon tretmana bila povišena, ali je 144 h od tretmana bila vraćena približno na početni nivo. Ekspresija hsa-miR-93-5p je ostala smanjena sve do 144 h i nakon tretmana sa FOX i nakon tretmana sa FIRI kombinovanim režimima ( $p=0,037$ ). U ovoj vremenskoj tački, ekspresija hsa-miR-17-5p je bila smanjena nakon FOX i FIRI tretmana, ali u slučaju FOX tretmana smanjenje nije bilo statistički značajno (FOX  $p=0,487$ , FIRI  $p=0,037$ ).

Sveukupno, efekat hemioterapeutskih lekova za lečenje mCRC na ekspresiju hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p tokom vremena je bio specifičan za datu miRNK, s obzirom da je hsa-miR-21-5p ispoljila prolaznu promenu ekspresije nakon čega je njena ekspresija vraćena na početni nivo, dok su ostale miRNK pokazale stabilnu promenu ekspresije tokom vremena. S obzirom da je hsa-miR-93-5p pokazala najstabilniji odgovor na oba kombinovana režima, ova miRNK je izabrana za analizu u kliničkoj studiji koja uključuje ispitanike sa CRLM i dalju funkcionalnu karakterizaciju.



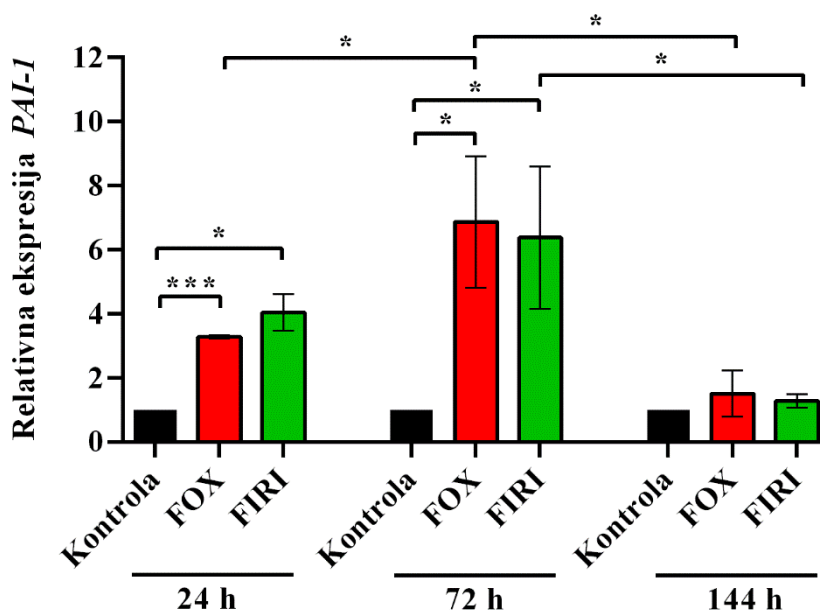
**Slika 11. Promena ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC tokom vremena.** SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane sa kombinovanim režimima FIRI i FOX tokom 24 h, 72 h i 144 h, a ekspresija odabranih miRNK je određena qRT-PCR analizom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije ( $2^{-ddCt}$ )  $\pm$  SD iz 3 različita eksperimenta. Crni stub predstavlja odgovarajuću kontrolu. \*  $p < 0,050$ .

#### 4.2.3. Aktivacija TGF $\beta$ signalnog puta nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC

Kako bi se analizirao efekat hemioterapeutika za lečenje mCRC na aktivnost TGF $\beta$  signalnog puta, SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane sa kombinovanim režimima FOX i FIRI tokom 24, 72, i 144 h, i izmerena je ekspresija gena *PAI-1*, jednog od glavnih nishodnih gena TGF $\beta$  signalizacije. Kao što se vidi na Slici 12, FOX i FIRI kombinovani režimi su doveli do povećanja ekspresije *PAI-1* nakon 24 h i to 3,3 i 4 puta ( $p < 0,001$  i  $p = 0,012$ , respektivno), i nakon 72 h i to 6,9 i 6,4 ( $p = 0,038$  i  $p = 0,050$ , respektivno). Dodatno, ekspresija *PAI-1* indukovana FOX tretmanom je bila statistički značajno viša nakon 72 h nego nakon 24 h ( $p = 0,033$ ), dok povećanje ekspresije *PAI-1* do kojeg je došlo nakon 72 h FIRI tretmana nije bilo statistički značajno u poređenju sa ekspresijom *PAI-1* nakon 24 h ( $p = 0,191$ ). U poređenju sa ekspresijom *PAI-1* nakon 72 h, ekspresija *PAI-1* nakon 144 h je značajno opala do bazalnog nivoa i nakon tretmana sa FOX ( $p = 0,032$ ) i nakon tretmana sa FIRI režimom ( $p = 0,032$ ).

Višestrukom regresijom je testirana zavisnost ekspresije *PAI-1* nakon 24 h i 72 h i ekspresije odabranih miRNK nakon tretmana sa kombinovanim režimima FOX i FIRI. Međutim, pomenuta zavisnost nije uočena ( $p > 0,050$ ).

Sveukupno, pokazano je da kombinovani hemioterapeutske tretmani indukuju aktivaciju TGF $\beta$  signalizacije u SW620<sub>B</sub> ćelijama, međutim, ovo povećanje nije povezano sa promenama ekspresije odabranih miRNK.

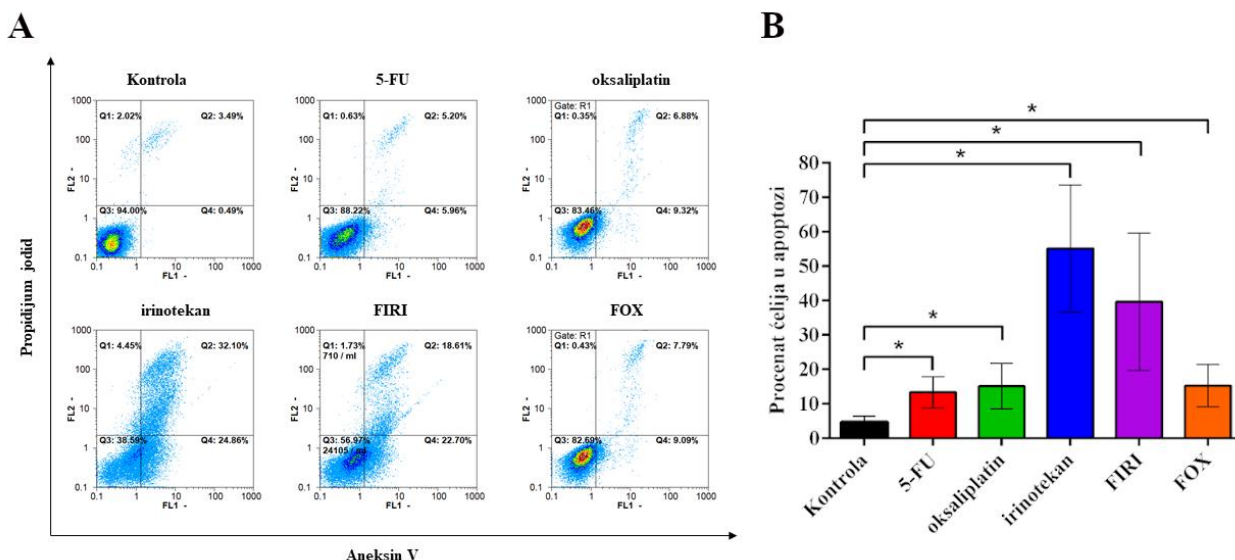


**Slika 12. Ekspresija *PAI-1* nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.** SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane sa kombinovanim režimima FOX i FIRI tokom 24, 72, i 144 h, a ekspresija gena *PAI-1* je određena qRT-PCR analizom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije ( $2^{-ddCt}$ )  $\pm$  SD iz 3 različita eksperimenta. \*  $p < 0,050$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.4. Procena odgovora SW620<sub>B</sub> ćelija na tretmane standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC

##### 4.2.4.1. Apoptoza SW620<sub>B</sub> ćelija nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC

Nakon 72 h od tretmana SW620<sub>B</sub> ćelija pojedinačnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC analizirana je apoptoza SW620<sub>B</sub> ćelija protočnom citofluorimetrijom, kako bi se procenio citotoksični efekat primenjenih hemioterapeutika. Svi testirani hemioterapeutici za lečenje mCRC su doveli do povećanja procenta SW620<sub>B</sub> ćelija u apoptozi ( $p < 0,050$ ) (Slika 13). Među testiranim hemioterapeuticima tretmani irinotekanom i FIRI-jem su imali najveći uticaj na indukciju ukupne apoptoze (zbir procenta ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi) i to  $55,14 \pm 18,47\%$  i  $39,7 \pm 19,95\%$ , respektivno. U poređenju sa pojedinačnim hemioterapeuticima, pri tretmanu SW620<sub>B</sub> ćelija sa kombinovanim hemioterapeuticima FIRI i FOX nije primećen sinergistički efekat na apoptozu. FIRI tretman je doveo do manjeg procenta ćelija u apoptozi u poređenju sa samim irinotekanom, dok je procenat ćelija u apoptozi bio sličan pri kombinovanom tretmanu FOX u poređenju sa pojedinačnim tretmanima 5-FU ili sa oksaliplatinom.

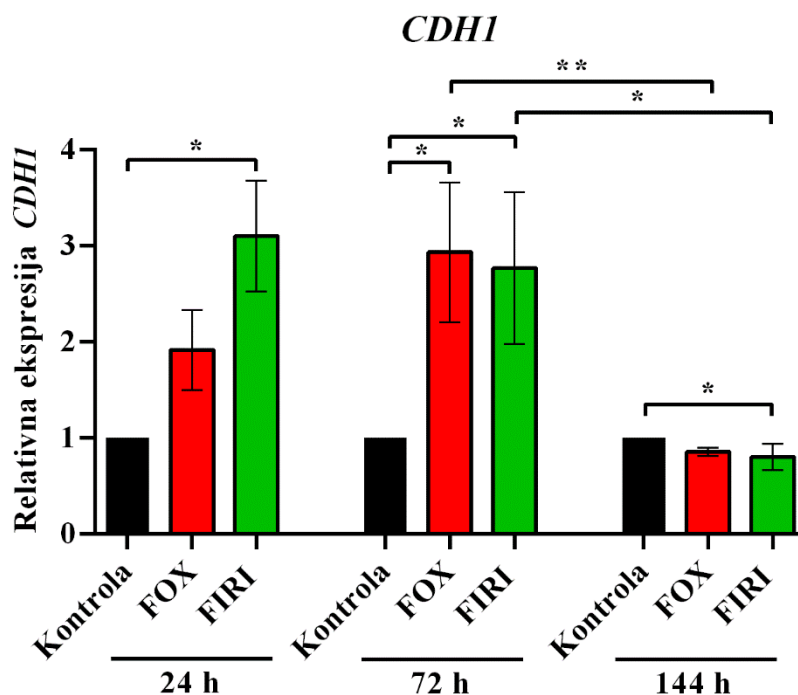


**Slika 13. Apoptoza SW620<sub>B</sub> ćelija nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.** SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane pojedinačnim ili kombinovanim hemioterapeuticima za lečenje mCRC tokom 72 h, nakon čega je analizirana apoptoza SW620<sub>B</sub> ćelija protočnom citofluorimetrijom. A) Reprerzentativni histogram plotovi sa naznačenim procentom živih ćelija (donji levi ugao), ćelija u ranoj apoptozi (donji desni ugao), ćelija u kasnoj apoptozi (gornji desni ugao) i procentom mrtvih ćelija (gornji levi ugao). B) Kvantitativni prikaz ćelija u apoptozi (zbir ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost procenta ćelija u apoptozi ± SD iz 4 različita eksperimenta. \*  $p < 0,050$ .

#### 4.2.4.2. Ekspresija EMT markera nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC

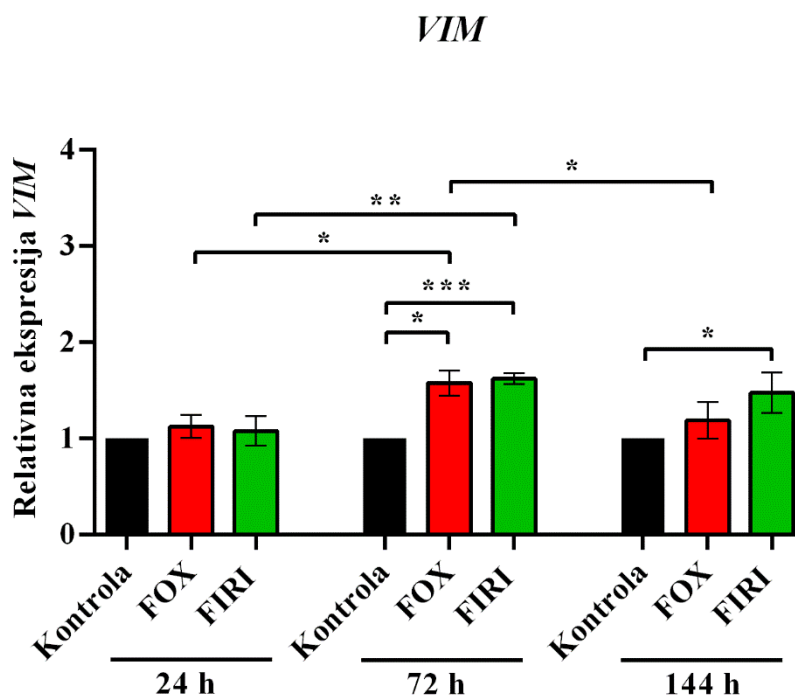
Ekspresija epitelnog markera *CDH1* i ekspresija mezenhimalnog markera *VIM* je analizirana 24, 72 i 144 h nakon tretmana SW620<sub>B</sub> ćelija sa kombinovanim režimima FOX i FIRI. Rezultati su pokazali da je tretman sa FIRI režimom doveo do povećanja ekspresije *CDH1* 3,1 puta ( $p=0,024$ ) (Slika 14), dok tretman sa FOX režimom nije doveo do promene u ekspresiji *CDH1* ( $p > 0,050$ ) 24 h od tretmana. Oba tretmana su dovela do povećanja ekspresije *CDH1* nakon tretiranja 72 h, i to FOX 2,9 puta ( $p=0,010$ ), a FIRI 2,8 puta ( $p=0,018$ ). Nije postojala statistički značajna razlika u ekspresiji *CDH1* 72 h nakon tretmana u poređenju sa ekspresijom *CDH1* 24 h nakon tretmana sa FOX ( $p=0,103$ ) i FIRI ( $p=0,586$ ) režimima. Nakon 144 h od tretmana sa FIRI režimom, ekspresija *CDH1* je bila smanjena za 20% ( $p=0,041$ ), u poređenju sa kontrolom. Ekspresija *CDH1* je bila značajno smanjena i nakon tretmana sa FOX ( $p=0,008$ ) i nakon tretmana sa FIRI ( $p=0,013$ ) režimima kada se upoređi njihova ekspresija 144 h nakon tretmana i 72 h nakon tretmana.





**Slika 14. Ekspresija epitelnog markera *CDHI* nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.** Ekspresija epitelnog markera *CDHI* je analizirana qRT-PCR-om 24, 72 i 144 h nakon tretmana SW620<sub>B</sub> ćelija sa kombinovanim režimima FOX i FIRI. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije ( $2^{-ddCt}$ )  $\pm$  SD iz 3 različita eksperimenta. \*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,010$ .

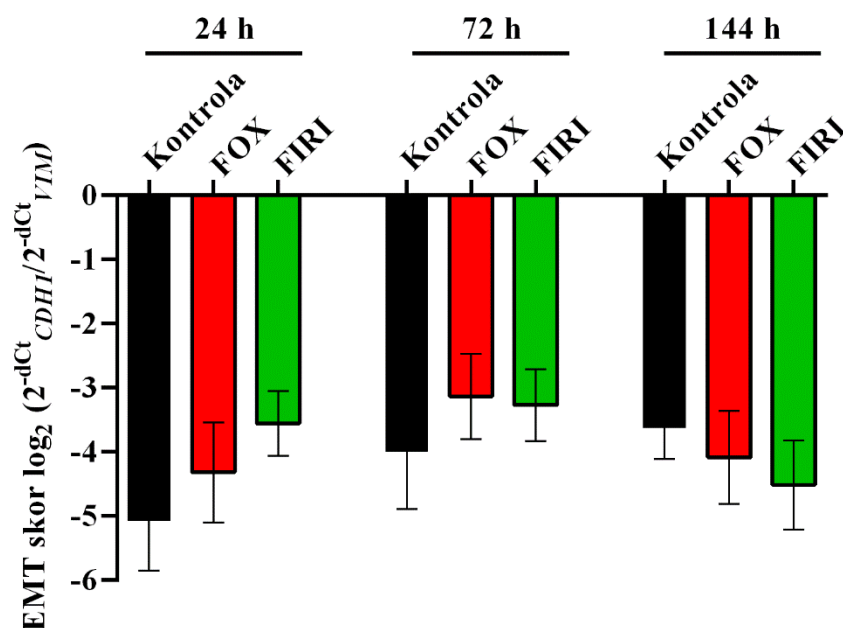
Ekspresija *VIM* nije bila značajno izmenjena 24 h nakon tretmana ( $p > 0,050$ ), ali je zato bila povećana 1,6 puta 72 h nakon tretmana sa FOX režimom ( $p = 0,017$ ), i 1,6 puta nakon tretmana sa FIRI režimom ( $p < 0,001$ ) (Slika 15). Ekspresija *VIM* je bila viša 72 h nakon tretmana sa FOX režimom ( $p = 0,012$ ) i FIRI režimom ( $p = 0,004$ ) u poređenju sa ovim tretmanima nakon 24 h. Nakon 144 h od tretmana sa FIRI režimom, ekspresija *VIM* je bila povećana 1,5 puta ( $p = 0,022$ ), u poređenju sa kontrolom. Ekspresija *VIM* je bila značajno smanjena nakon tretmana sa FOX režimom ( $p = 0,044$ ) 144 h nakon tretmana u poređenju sa ekspresijom *VIM* 72 h nakon tretmana.



**Slika 15. Ekspresija mezenhimalnog markera *VIM* nakon tretmana standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC.** Ekspresija mezenhimalnog markera *VIM* je analizirana qRT-PCR-om 24, 72 i 144 h nakon tretmana SW620<sub>B</sub> ćelija sa kombinovanim režimima FOX i FIRI. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije ( $2^{-ddCt}$ )  $\pm$  SD iz 3 različita eksperimenta. \*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,010$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Kako bi se ispitaio uticaj standardnih hemioterapeutika za lečenje mCRC na TGF- $\beta$ -zavisni proces EMT, kao još jednog pokazatelja odgovora ćelija na tretman hemioterapeutika, izračunat je skor EMT. Kao što je prikazano na Slici 16, nakon tretmana sa FOX i FIRI režimima, odnos *CDH1/VIM* je pokazao trend ka smanjenju karakteristika sličnih mezenhimalnim u poređenju sa kontrolnim tretmanom nakon 24 h i nakon 72 h (npr. FIRI režim u poređenju sa kontrolnim tretmanom nakon 24 h,  $p = 0,066$ ). Međutim, 144 h nakon tretmana sa FOX i FIRI, ovaj trend je ponovo ukazivao na mezenhimalne karakteristike.

Ukratko, ovi rezultati ukazuju na to da je efekat kombinovanih hemioterapeutskih tretmana na SW620<sub>B</sub> ćelije 72 h od tretmana takav da SW620<sub>B</sub> ćelije blago poprimaju karakteristike slične epitelnim ćelijama, što ukazuje na njihov relativno dobar odgovor na ove lekove, dok 144 h nakon tretmana ovaj efekat više nije bio uočljiv.

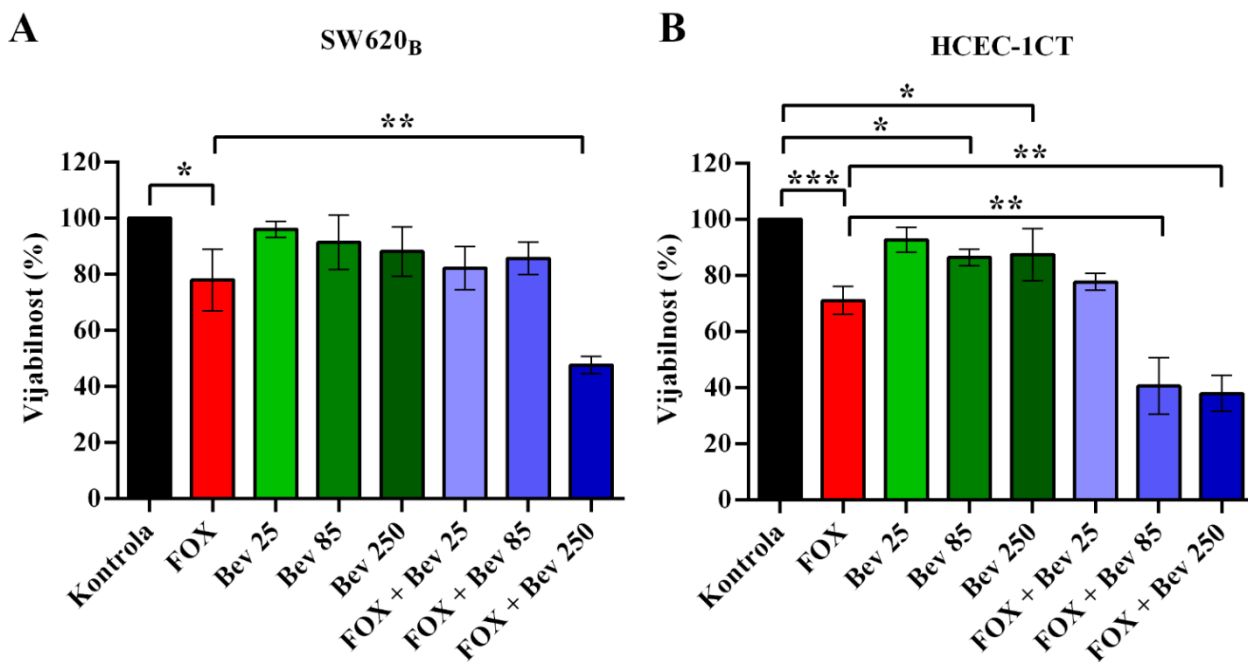


**Slika 16.** Skor EMT kao mera odgovora SW620<sub>B</sub> ćelija na tretman standardnim hemioterapeuticima za lečenje mCRC. Za izračunavanje skora EMT korišćena je log<sub>2</sub>-transformacija odnosa ekspresije gena *CDHI* i *VIM* izražena kroz njihove 2<sup>-dCt</sup> vrednosti. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije ± SD iz 3 različita eksperimenta.

#### 4.2.5. Efekat kombinovane terapije za lečenje mCRC na vijabilnost SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija i ekspresiju hsa-miR-93-5p

##### 4.2.5.1. Efekat FOX-a u kombinaciji sa bevacizumabom na vijabilnost SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija

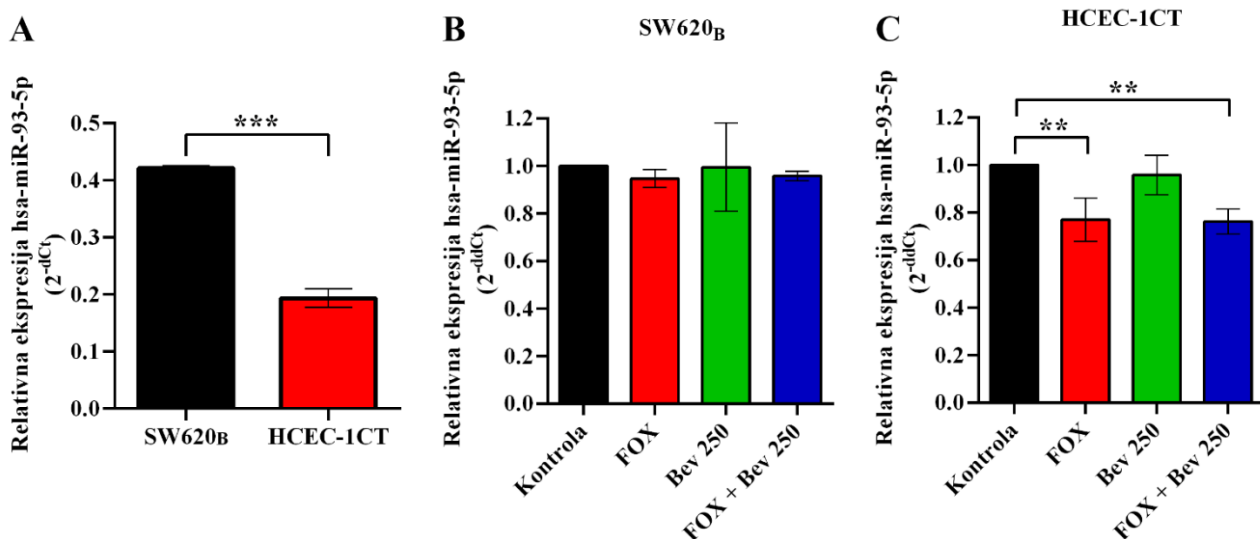
Da bi se proučili *in vitro* efekti sistemske (FOX), ciljane (bevacizumab) i kombinovane terapije (FOX + bevacizumab) koja se koristi za lečenje mCRC, SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelije su tretirane FOX-om, 3 klinički relevantne koncentracije bevacizumaba (25, 85 i 250 μg/mL) ili kombinacijom FOX + bevacizumab, a vijabilnost ćelija je analizirana pomoću MTT testa. Kao što se može videti sa Slike 17 A i B, tretman FOX-om je doveo do smanjenja preživljavanja SW620<sub>B</sub> ćelija na 78,0±11,0% ( $p=0,029$ ) i HCEC-1CT ćelija na 71,1±4,9% ( $p<0,001$ ). Povećane koncentracije bevacizumaba nisu imale uticaja na vijabilnost SW620<sub>B</sub> ćelija, dok je nakon tretmana sa 85 μg/mL bevacizumabom vijabilnost HCEC-1CT ćelija smanjena na 84,4±2,9% ( $p=0,033$ ), a nakon tretmana sa 250 μg/mL bevacizumabom na 87,4±9,3% ( $p=0,048$ ). Što se tiče kombinovanih tretmana FOX + bevacizumab, samo kombinacija FOX + 250 μg/mL bevacizumab je značajno smanjila vijabilnost SW620<sub>B</sub> ćelija na 47,6±3,1% ( $p=0,003$ ), dok je kombinacija FOX + 85 μg/mL bevacizumab i FOX + 250 μg/mL bevacizumab smanjila vijabilnost HCEC-1CT ćelija na 40,6±10,1% ( $p=0,003$ ), odnosno 37,9±6,4% ( $p=0,002$ ), respektivno.



**Slika 17. Efekat FOX-a u kombinaciji sa bevacizumabom na vijabilnost SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija.** Ćelije SW620<sub>B</sub> (A) i ćelije HCEC-1CT (B) su tretirane sa FOX-om, bevacizumabom ili njihovom kombinacijom tokom 72 h nakon čega je analizirana vijabilnost ovih ćelija MTT esejem. Pri jednofaktorskoj analizi varijanse, bev 25, bev 85 i bev 250 tretmani su poređeni sa kontrolom, dok su kombinacije FOX + bev 25, FOX + bev 85 i FOX + bev 250 poređeni sa FOX tretmanom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz 3 različita eksperimenta. bev 25, bevacizumab 25 µg/mL; bev 85, bevacizumab 85 µg/mL; bev 250, bevacizumab 250 µg/mL; \*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,010$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.5.2. Efekat FOX-a u kombinaciji sa bevacizumabom na ekspresiju hsa-miR-93-5p

Najpre je izmerena bazalna ekspresija hsa-miR-93-5p u SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelijama kultivisanim tokom 72 h. Ekspresija hsa-miR-93-5p je bila veća u ćelijama SW620<sub>B</sub> u poređenju sa ćelijama HCEC-1CT ( $p < 0,001$ ) (Slika 18 A). Budući da je samo najviša ispitana koncentracija bevacizumaba (250 µg/mL) u kombinaciji sa FOX-om uspela da značajno smanji vijabilnost i SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija (Slika 17 A i B), ova koncentracija je dalje korišćena kako bi se utvrdilo da li bevacizumab sam ili u kombinaciji sa FOX-om utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p u ovim ćelijama. Kao što je prikazano na Slici 18 B, FOX, 250 µg/mL bevacizumab niti kombinacija FOX + 250 µg/mL bevacizumab nije imala efekta na ekspresiju hsa-miR-93-5p ( $p > 0,050$  za sve) u SW620<sub>B</sub> ćelijama. Međutim, u ćelijama HCEC-1CT (Slika 18 C), u poređenju sa kontrolom, FOX je doveo do smanjenja ekspresije hsa-miR-93-5p za  $22,8 \pm 9,2\%$  ( $p < 0,008$ ), kao i kombinacija FOX + 250 µg/mL bevacizumab za  $23,7 \pm 5,3\%$  ( $p < 0,006$ ). Međutim, kada se kombinacija FOX + 250 µg/mL bevacizumab uporedi sa FOX tretmanom, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji hsa-miR-93-5p ( $p = 0,998$ ). Takođe, kada je bevacizumab u koncentraciji 250 µg/mL primenjen kao zaseban tretman, nije došlo do promene ekspresije hsa-miR-93-5p ( $p = 0,790$ ).



**Slika 18. Ekspresija hsa-miR-93-5p u bazalnom stanju i nakon tretmana.** A) Bazalna ekspresija hsa-miR-93-5p (2<sup>-dCt</sup>) u SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelijama kultivisanim tokom 72 h. SW620<sub>B</sub> (B) i HCEC-1CT (C) ćelije su tretirane FOX-om, 250 µg/mL bevacizumabom ili njihovom kombinacijom tokom 72 h nakon čega je analizirana relativna ekspresija hsa-miR-93-5p (2<sup>-ddCt</sup>) qRT-PCR metodom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz 3 različita eksperimenta. bev 250, bevacizumab 250 µg/mL; \*\* *p*<0,010; \*\*\* *p*<0,001.

### 4.3. Ispitivanje translacionog potencijala hsa-miR-93-5p kao prediktivnog i prognostičkog biomarkera kod ispitanika sa CRLM

#### 4.3.1. Karakteristike ispitanika sa CRLM

U ovu studiju je uključeno 35 ispitanika sa CRLM od kojih je prikupljen biološki materijal u vidu seruma, CRLM i okolnog netumorskog tkiva jetre neposredno uz metastazu. Demografske i kliničko-patološke karakteristike ispitanika sa CRLM su prikazane u Tabeli 8.

**Tabela 8. Demografske i kliničko-patološke karakteristike ispitanika sa CRLM.**

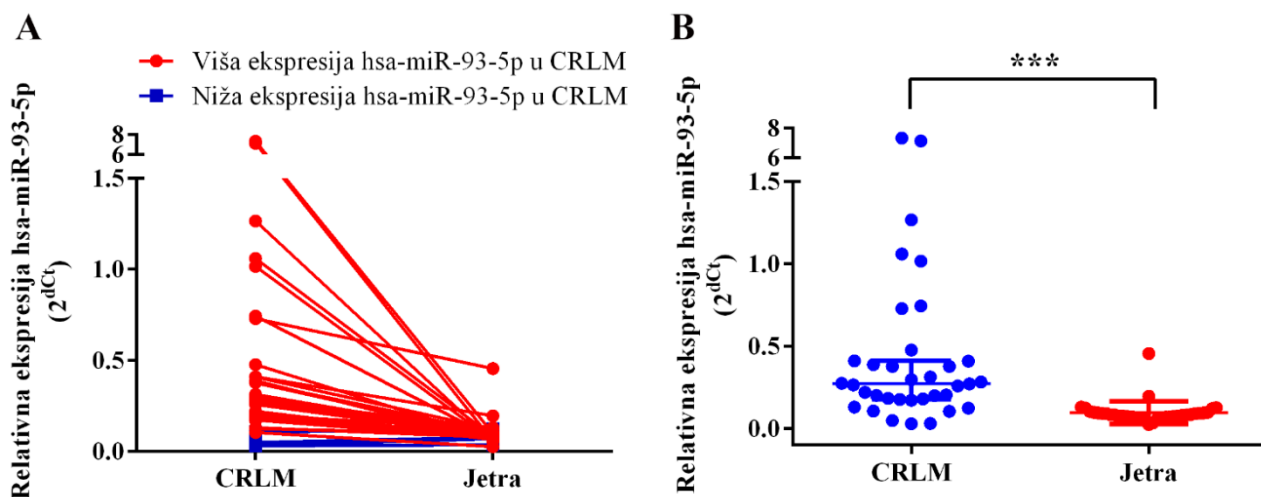
	Ispitanici (n=35)
Starost (godine), srednja vrednost ± SD (opseg)	63,7 ± 12,2 (24-84)
Pol, n (%)	
muškarci	19 (54,3)
žene	16 (45,7)
Tumor markeri	
CEA (ng/mL), srednja vrednost ± SD (opseg)	57,4 ± 121,3 (2-704)
CA 19-9 (IU/mL), srednja vrednost ± SD (opseg)	669,7 ± 2267,2 (2-12999)
<b>Podaci o primarnom karcinomu</b>	<b>n (%)</b>
Mesto	
kolon	14 (40,0)
rektum	21 (60,0)
T stadijum	
T1	1 (2,9)
T3	24 (68,6)
T4	10 (28,6)
N stadijum	
N0	8 (22,9)
N1	16 (45,7)

N2	11 (31,4)
L stadijum	
L0	10 (28,6)
L1	25 (71,4)
V stadijum	
V0	8 (22,9)
V1	27 (77,1)
R stadijum	
R0	30 (85,7)
R1	5 (14,3)
PN stadijum	
PN0	16 (45,7)
PN1	19 (54,3)
Stadijum po Dukes-u	
A-B	3 (8,6)
C-D	32 (91,4)
Terapija	
Neoadjuvantna hemioradioterapija	
Ne	29 (82,9)
Da	6 (17,1)
Adjuvantna hemioterapija	
Ne	28 (80,0)
Da	7 (20,0)
<b>Podaci o CRLM</b>	n (%)
Broj	
≤3	23 (65,7)
>3	12 (34,3)
Maksimalni prečnik metastaza	
≤5 cm	27 (77,1)
>5 cm	8 (22,9)
Lobarna distribucija metastaza	
Unilobarna	20 (57,1)
Bilobarna	15 (42,9)
Prisustvo metastaza pri dijagnozi	
Sinhrono	25 (71,4)
Metahrono	10 (28,6)
Prezentacija metastaza	
Jedna	15 (42,9)
Više	20 (57,1)
Histološka diferentovanost	
Dobro diferentovane (G1)	16 (45,7)
Umereno diferentovane (G2)	19 (54,3)
Rezidualni status	
R0	10 (28,6)
R1	25 (71,4)
Terapija	
Neoadjuvantna hemioterapija	
Ne	18 (51,4)
Da	17 (48,6)
Adjuvantna hemioterapija	
Ne	16 (45,7)
Da	19 (54,3)

Skraćenice: n - broj ispitanika, T - tumor, N - čvor, L - invazija u limfne sudove, V - invazija u vene, R - resekcija, PN - invazija u perineuralni prostor.

#### 4.3.2. Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i u okolnom netumorskom tkivu jetre

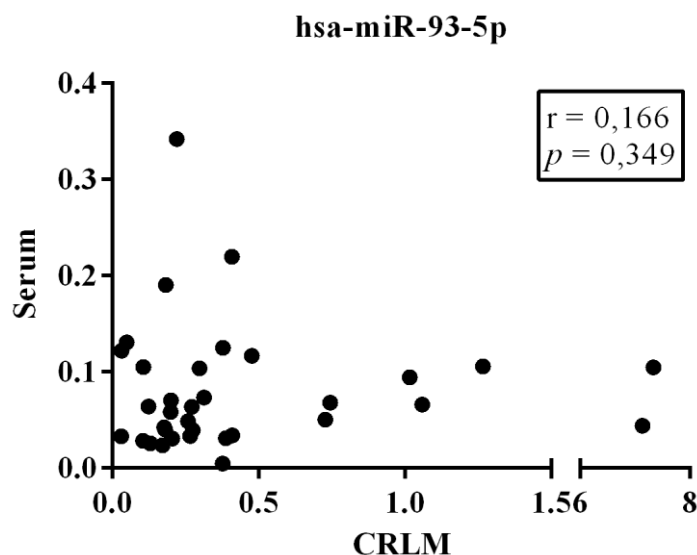
Ekspresija hsa-miR-93-5p je analizirana u CRLM i u okolnom netumorskom tkivu jetre ispitanika sa CRLM. Ekspresija hsa-miR-93-5p je bila povišena kod 31 od 35 ispitanika (88,6%), dok je kod 4 ispitanika (11,4%) ekspresija hsa-miR-93-5p bila niža u poređenju sa netumorskim tkivom jetre (Slika 19 A). Relativna ekspresija hsa-miR-93-5p je bila statistički značajno viša u CRLM u poređenju sa netumorskim tkivom jetre ( $p < 0,001$ ) (Slika 19 B).



**Slika 19. Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i u okolnom netumorskom tkivu jetre ispitanika sa CRLM.** Relativni nivo ekspresije hsa-miR-93-5p ( $2^{\Delta Ct}$ ) u CRLM i netumorskom tkivu jetre (na slici označeno samo kao Jetra) je analiziran qRT-PCR metodom i predstavljen je kao grafikon uparenih uzoraka (A) i kao tačkasti dijagram (B). \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.3.3. Ispitivanje korelacije ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM sa ekspresijom hsa-miR-93-5p u serumu

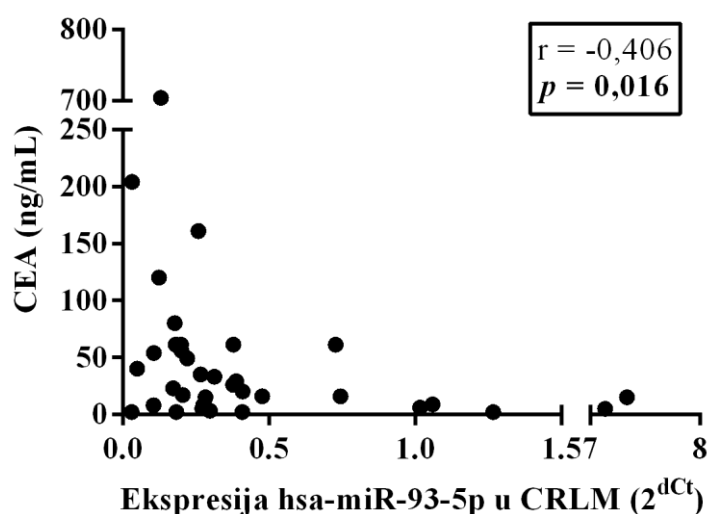
Da bi se utvrdilo da li ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM korelira sa serumskom ekspresijom hsa-miR-93-5p, izračunat je Spearman-ov koeficijent korelacije ranga ( $r$ ). Kao što je prikazano na Slici 20, nije bilo značajne korelacije između ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i u serumu ( $r = 0,166$ ;  $p = 0,349$ ).



**Slika 20. Korelacija ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM sa ekspresijom hsa-miR-93-5p u serumu.** Korelacija ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM sa ekspresijom hsa-miR-93-5p u serumu je izražena kroz Spearman-ov koeficijent korelacije ranga ( $r$ ), a predstavljena je tačkastim dijagramom.

#### 4.3.4. Ispitivanje korelacije ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa tumorskim markerima

Analizirana je korelacija između ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa tumorskim markerima CEA i CA 19-9. Postojala je statistički značajna umerena negativna korelacija između ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i nivoa CEA ( $r=-0,406$ ;  $p=0,016$ ) (Slika 21). Međutim, nije bilo značajne korelacije između serumske ekspresije hsa-miR-93-5p i CEA ( $r=-0,112$ ;  $p=0,528$ ), ili CRLM i serumske ekspresije hsa-miR-93-5p i nivoa CA 19-9 ( $r=-0,067$ ;  $p=0,703$  i  $r=-0,187$ ;  $p=0,291$ , respektivno).





**Slika 21. Korelacija ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM sa tumorskim markerom CEA.** Korelacija ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM sa tumorskim markerom CEA je izražena kroz Spearman-ov koeficijent korelacije ranga ( $r$ ), a predstavljena je tačkastim dijagramom.

#### 4.3.5. Određivanje granične vrednosti ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu ispitanika sa CRLM

Kako bi se odredila granična vrednost ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu ispitanika sa CRLM, i kako bi se ispitanici sa CRLM podelili u grupe sa visokom i niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p, izvedena je analiza ROC krive uz izračunavanje Youden-ovog indeksa. Optimalna granična vrednost ekspresije hsa-miR-93-5p, zasnovana na uzorcima, za CRLM je bila 0,27 (senzitivnost 62,5%, specifičnost 57,9%), a za serum 0,04 (senzitivnost 86,7%, specifičnost 47,4%). Na osnovu ovih graničnih vrednosti, ispitanici sa CRLM su podeljeni u grupu sa visokom ekspresijom hsa-miR-93-5p (ekspresija hsa-miR-93-5p viša od granične vrednosti) i u grupu sa niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p (ekspresija hsa-miR-93-5p niža od granične vrednosti). Ukupno 18 ispitanika (51,4%) je imalo visoku ekspresiju hsa-miR-93-5p u CRLM, a 17 ispitanika (48,6%) je imalo nisku ekspresiju hsa-miR-93-5p u CRLM. Što se tiče ekspresije hsa-miR-93-5p u serumu, 23 ispitanika (67,7%) je imalo visoku ekspresiju hsa-miR-93-5p, dok je 11 ispitanika (32,3%) imalo nisku ekspresiju hsa-miR-93-5p.

#### 4.3.6. Povezanost visoke i niske ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa CRLM

Kako bi se utvrdilo da li je visoka ili niska ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu povezana sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa CRLM, ekspresija hsa-miR-93-5p je upoređena prema starosti i polu ispitanika, broju, maksimalnom prečniku, prisustvu, lobarnoj distribuciji i prezentaciji metastaza, histološkom stepenu diferenciranosti i rezidualnom statusu tumora. Rezultati prikazani u Tabeli 9 ukazuju da nije bilo statistički značajne povezanosti između visoke/niske ekspresije hsa-miR-93-5p i pomenutih karakteristika pacijenata sa CRLM ( $p > 0,050$  za sve).

**Tabela 9. Povezanost visoke i niske ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa CRLM.**

Karakteristike ispitanika sa CRLM	Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM ( $p$ vrednost)	Ekspresija hsa-miR-93-5p u serumu ( $p$ vrednost)
Starost ( $\leq 65$ , $> 65$ )	1,000	0,295
Pol (muškarci, žene)	0,505	0,717
Broj metastaza ( $\leq 3$ , $> 3$ )	0,489	1,000
Maksimalni prečnik metastaza ( $\leq 5$ cm, $> 5$ cm)	1,000	1,000
Prezentacija metastaza (jedna, više)	0,738	0,295
Lobarna distribucija metastaza (unilobarne, bilobarne)	0,315	1,000
Prisustvo metastaza pri dijagnozi (sinhrone, metahrone)	1,000	0,232
Histološka diferenciranost (G1, G2)	1,000	0,151
Rezidualni status (R0, R1)	0,264	0,232

#### 4.3.7. Prediktivni potencijal hsa-miR-93-5p za odgovor na terapiju kod ispitanika sa CRLM

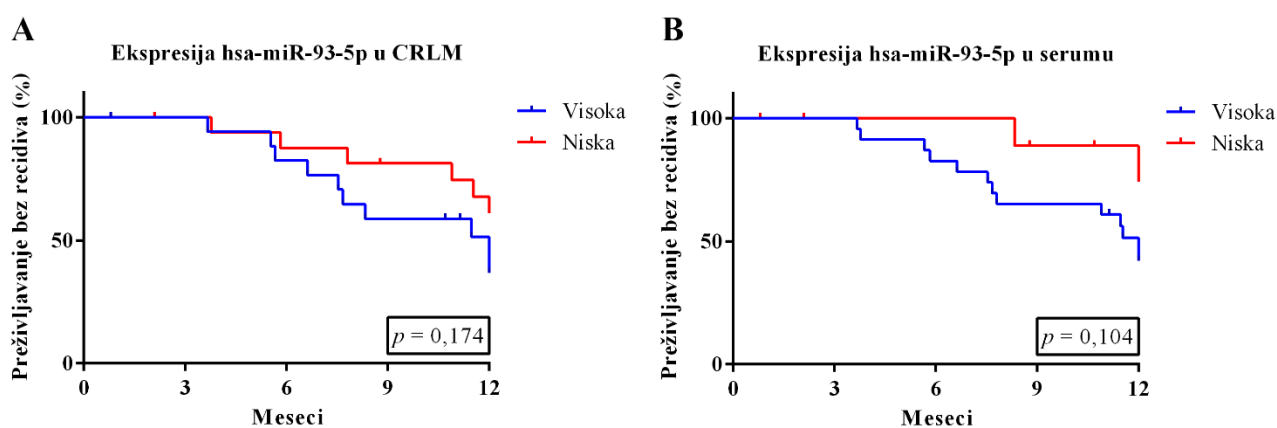
Ispitano je da li primena neoadjuvantne hemioterapije utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p kod ispitanika sa CRLM.

Od 35 ispitanika sa CRLM, ukupno 17 ispitanika (48,6%) je primalo neoadjuvantnu hemioterapiju, a 15/17 ispitanika je primalo terapiju zasnovanu na 5-FU i oksaliplatinu u kombinaciji sa bevacizumabom. Kako bi se ispitalo da li primena neoadjuvantne hemioterapije utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p, upoređena je ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i u serumu kod ispitanika koji su primali neoadjuvantnu hemioterapiju sa onima koji nisu, pri čemu nije uočena statistička značajnost ( $p=0,568$  i  $p=0,971$ , respektivno). Na osnovu ovog nalaza se može zaključiti da neoadjuvantna hemioterapija nije uticala na ekspresiju hsa-miR-93-5p kod ispitanika sa CRLM.

Na osnovu RECIST smernica verzije 1.1, 10 ispitanika (58,8%) je pokazalo parcijalni odgovor, 6 (35,30%) ispitanika je imalo stabilnu bolest, a 1 (5,9%) progresivnu bolest na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju, tako da je bilo 10 ispitanika koji su pokazali odgovor na primenjenu hemioterapiju i 7 ispitanika koji nisu pokazali odgovor na terapiju. Da bi se procenila prediktivna vrednost hsa-miR-93-5p, analizirana je povezanost visoke ili niske ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu i odgovor ispitanika na terapiju. Međutim, nije uočena statistički značajna povezanost između visoke/niske ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM ili serumu i terapijskog odgovora ( $p=1,000$ ).

#### 4.3.8. Prognostički potencijal hsa-miR-93-5p za preživljavanje bez recidiva kod ispitanika sa CRLM

Kaplan-Meier-ova metoda je korišćena za procenu jednogodišnjeg preživljavanja bez recidiva kod pacijenata sa visokom ili niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM ili u serumu. Nije uočena razlika u jednogodišnjem preživljavanju bez recidiva kod pacijenata sa visokom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu u poređenju sa ispitanicima sa niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p ( $p=0,174$  i  $p=0,104$ , respektivno) (Slika 22).



**Slika 22. Kaplan-Meier-ova analiza preživljavanja bez recidiva kod ispitanika sa CRLM.** Kaplan-Meier-ove krive preživljavanja bez recidiva kod ispitanika sa CRLM sa visokom i niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM (A) i u serumu (B). Cenzurisani događaji su predstavljeni tačkama na krivama.

#### 4.3.9. Prognošički potencijal hsa-miR-93-5p i kliničko-patoloških karakteristika ispitanika sa CRLM za pojavu ranog recidiva

Bivarijantna analiza je izvedena kako bi se procenio prognošički značaj hsa-miR-93-5p i kliničko-patoloških karakteristika ispitanika sa CRLM za pojavu ranog recidiva. Kao što je prikazano u Tabeli 10, jedino je nivo hsa-miR-93-5p u serumu bio značajno povezan sa pojavom ranog recidiva, tačnije, veća ekspresija hsa-miR-93-5p bila je povezana sa većim brojem pacijenata sa rekurentnom bolešću,  $p=0,035$ ). S obzirom da je nivo hsa-miR-93-5p u serumu bio jedini prognošički faktor povezan sa recidivom, multivarijantna analiza nije rađena.

**Tabela 10. Bivarijantna analiza potencijalnih prognošičkih faktora za pojavu ranog recidiva.**

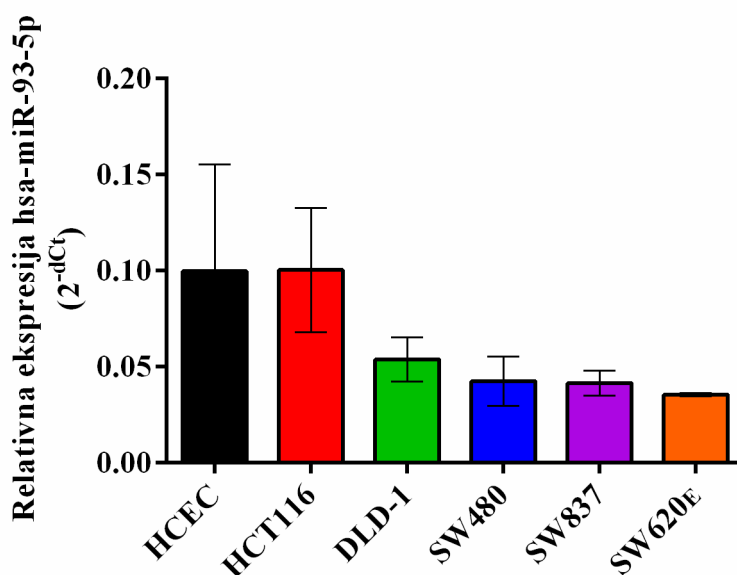
Karakteristike ispitanika sa CRLM	Bez recidiva N=19 (54,3%)	Sa recidivom N=16 (45,7%)*	<i>p</i> vrednost
Starost			
≤65	7 (36,8%)	7 (43,7%)	0,739
>65	12 (63,2%)	9 (56,3%)	
Pol			
muškarci	10 (52,6%)	9 (56,2%)	1,000
žene	9 (47,4%)	7 (43,7%)	
Broj metastaza			
≤3	12 (63,2%)	11 (68,7%)	1,000
>3	7 (36,8%)	5 (31,3%)	
Maksimalni prečnik metastaza			
≤5 cm	14 (73,7%)	13 (81,3%)	0,700
>5 cm	5 (26,3%)	3 (18,7%)	
Prezentacija metastaza			
jedna	9 (47,4%)	6 (37,5%)	0,734
više	10 (52,6%)	10 (62,5%)	
Lobarna distribucija			
unilobarne	11 (57,9%)	9 (56,3%)	1,000
bilobarne	8 (42,1%)	7 (43,7%)	
Prisustvo metastaza pri dijagnozi			
sinhrone	11 (57,9%)	14 (87,5%)	0,071
metahrone	8 (42,1%)	2 (12,5%)	
Histološka diferenciranost			
G1	11 (57,9%)	5 (31,3%)	0,176
G2	8 (42,1%)	11 (68,7%)	
Rezidualni status			
R0	5 (26,3%)	5 (31,3%)	1,000
R1	14 (73,7%)	11 (68,7%)	
Poreklo primarnog tumora			
levi kolon	15 (78,9%)	13 (81,3%)	1,000
desni kolon	4 (21,1%)	3 (18,7%)	
Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM			
niska	11 (57,9%)	6 (37,5%)	0,315
visoka	8 (42,1%)	10 (62,5%)	
Ekspresija hsa-miR-93-5p u serumu			
niska	9 (47,4%)	2 (13,3%)	<b>0,035</b>
visoka	10 (52,6%)	13 (86,7%)	

\*osim ekspresije hsa-miR-93-5p u serumu, gde je u grupi sa recidivom bilo 15 ispitanika.

#### 4.4. Funkcionalna karakterizacija hsa-miR-93-5p u procesima relevantnim za kolorektalnu karcinogenezu i odgovor na terapiju *in vitro* i *in vivo*

##### 4.4.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u neizmenjenim ćelijama kolona i ćelijskim linijama CRC

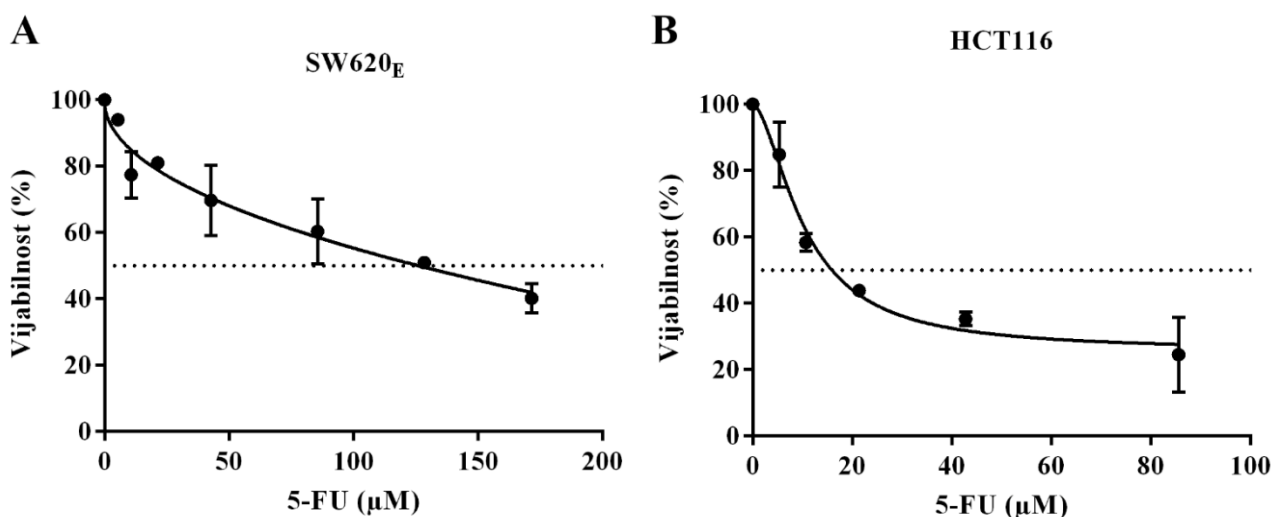
Kako bi se odabrale ćelijske linije CRC za dalju funkcionalnu karakterizaciju hsa-miR-93-5p, najpre je određen profil ekspresije hsa-miR-93-5p u ćelijskim linijama CRC HCT116, DLD-1, SW480, SW837 i SW620<sub>E</sub>, u odnosu na ćelije neizmenjenog epitela kolona HCEC. Iz rezultata prikazanih na Slici 23 se može primetiti da je ekspresija hsa-miR-93-5p u HCT116 ćelijama bila približna ekspresiji hsa-miR-93-5p u HCEC ćelijama, dok je u ostalim ćelijskim linijama CRC ekspresija hsa-miR-93-5p bila niža. Najniža ekspresija hsa-miR-93-5p je bila zapažena u SW620<sub>E</sub> ćelijama. Na osnovu ove analize, za dalju funkcionalnu karakterizaciju hsa-miR-93-5p su odabrane ćelijske linije HCT116 i SW620<sub>E</sub>, zbog najviše i najniže ekspresije hsa-miR-93-5p, respektivno, u testiranim CRC ćelijskim linijama.



**Slika 23. Ekspresija hsa-miR-93-5p u neizmenjenim ćelijama kolona i ćelijskim linijama CRC.** qRT-PCR analiza relativne ekspresije hsa-miR-93-5p (2<sup>-dCt</sup>) u HCEC, HCT116, DLD-1, SW480, SW837 i SW620<sub>E</sub> ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije ± standardna devijacija (SD) iz 3 različita eksperimenta.

##### 4.4.2. Određivanje IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU u SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama

Pre funkcionalnog ispitivanja uloge hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU, kao i efekta povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p u kombinaciji sa 5-FU na vijabilnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, najpre je bilo potrebno odrediti IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU za ove ćelije. Na osnovu krive odgovora na 5-FU prikazanoj na Slici 24, IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU kod SW620<sub>E</sub> ćelija je iznosila 126,27 μM, dok je IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU kod HCT116 ćelija bila 15,96 μM. Na osnovu dobijenih IC<sub>50</sub> vrednosti se može zaključiti da su HCT116 ćelije približno 8 puta osetljivije na 5-FU u odnosu na SW620<sub>E</sub> ćelije. Dobijene koncentracije 5-FU su korišćene u daljim eksperimentima sa SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama.



**Slika 24. Određivanje IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU u SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama.** SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića i narednog dana tretirane sa 0 µM, 5,35 µM, 10,7 µM, 21,4 µM, 42,8 µM, 85,6 µM, 128,5 µM i 171,6 µM 5-FU. 48 h nakon tretmana analizirana je vijabilnost (%) SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija MTT esejem. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost četvorplikata ± SD iz 2 različita eksperimenta.

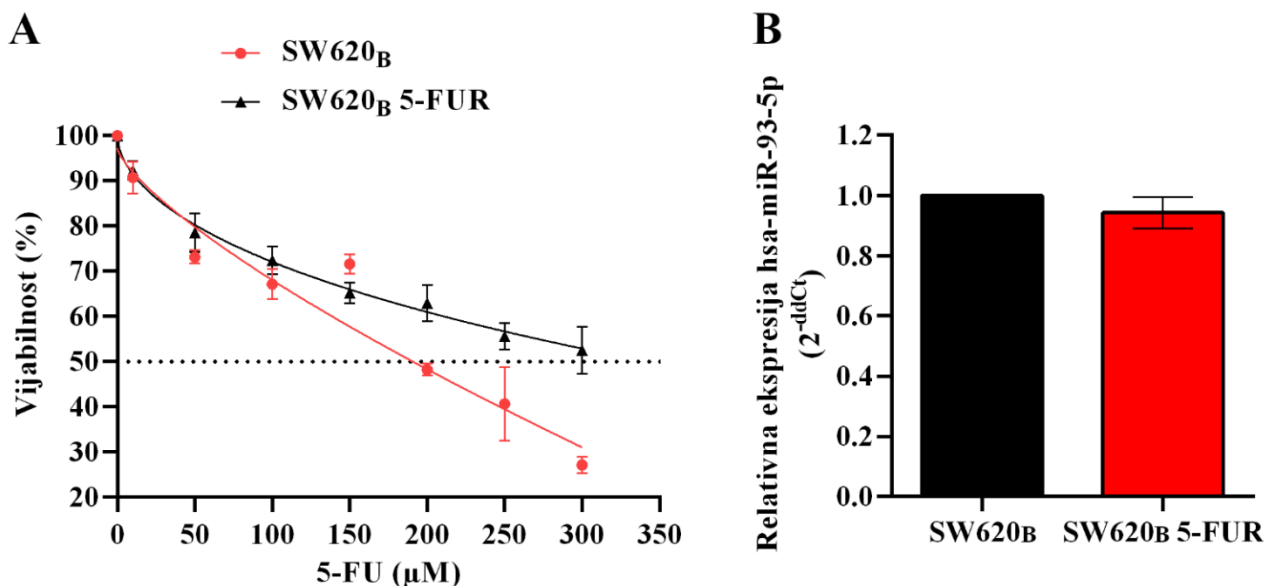
#### 4.4.3. Uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU

Uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU je ispitana tako što je ekspresija hsa-miR-93-5p analizirana u SW620<sub>B</sub> ćelijama rezistentnim na 5-FU (SW620<sub>B</sub> 5-FUR), i u eksperimentu gde je ekspresija hsa-miR-93-5p analizirana u adherentnim i plutajućim ćelijama nakon tretmana sa 5-FU.

##### 4.4.3.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u SW620<sub>B</sub> ćelijama rezistentnim na 5-FU

Da bi se dobile SW620<sub>B</sub> 5-FUR ćelije, originalne SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama 5-FU u rasponu od 5 do 30 µM. Nakon 6 meseci, MTT esejem je proverena senzitivnost dobijenih ćelija i generisane su odgovarajuće krive odgovora na 5-FU (Slika 25 A), a promena u rezistenciji je izračunata na osnovu IC<sub>50</sub> vrednosti originalnih i SW620<sub>B</sub> 5-FUR ćelija. Prosečna IC<sub>50</sub> vrednost originalnih SW620<sub>B</sub> ćelija na 5-FU je iznosila 196,34 µM, dok je prosečna IC<sub>50</sub> vrednost SW620<sub>B</sub> 5-FUR ćelija iznosila 351,11 µM. Promena u rezistenciji je iznosila približno 1,8.

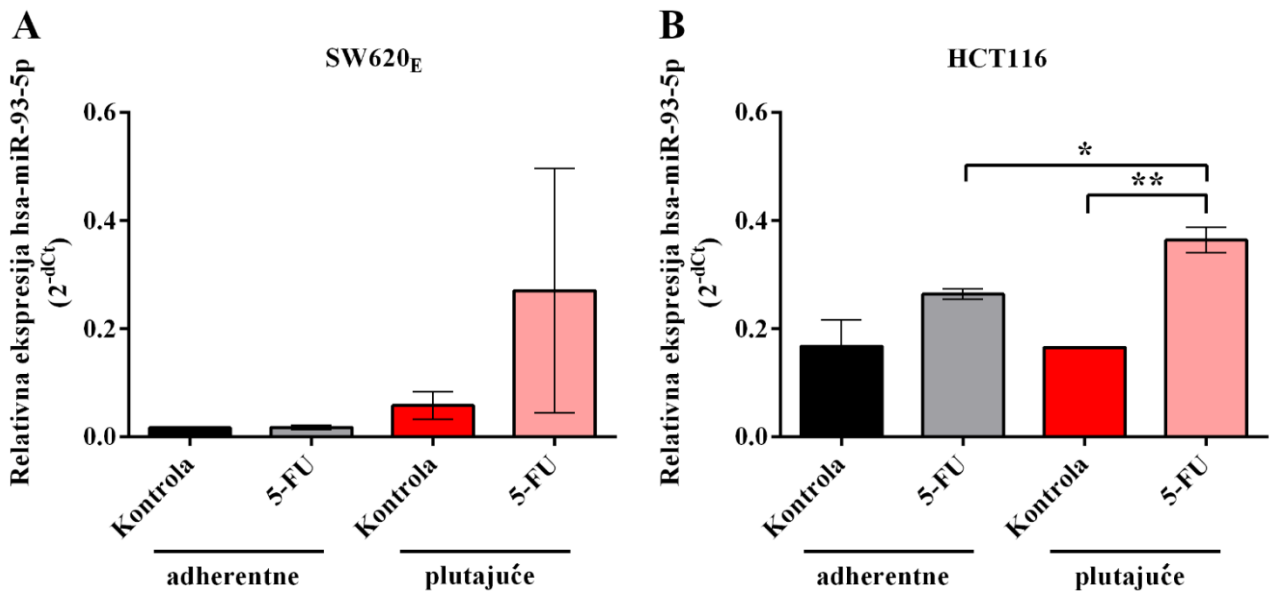
Kako bi se ispitalo da li je ekspresija hsa-miR-93-5p povezana sa rezistencijom na 5-FU, izmerena je ekspresija hsa-miR-93-5p u SW620<sub>B</sub> 5-FUR ćelijama. Kao što se može primetiti na Slici 25 B, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji hsa-miR-93-5p u originalnim SW620<sub>B</sub> ćelijama u poređenju sa SW620<sub>B</sub> 5-FUR ćelijama.



**Slika 25. Senzitivnost originalnih i 5-FU-rezistentnih SW620<sub>B</sub> ćelija na 5-FU.** A) Originalne i 5-FU-rezistentne SW620<sub>B</sub> ćelije su tretirane sa 0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 i 300 μM 5-FU tokom 72 h, nakon čega je analizirana vijabilnost ćelija MTT esejem. B) Relativna ekspresija hsa-miR-93-5p (2<sup>-ddCt</sup>) je određena qRT-PCR analizom u originalnim i 5-FU-rezistentnim SW620<sub>B</sub> ćelijama. SW620<sub>B</sub> 5-FUR, SW620<sub>B</sub> ćelije rezistentne na 5-FU.

#### 4.4.3.2. Ekspresija hsa-miR-93-5p u adherentnim i plutajućim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU

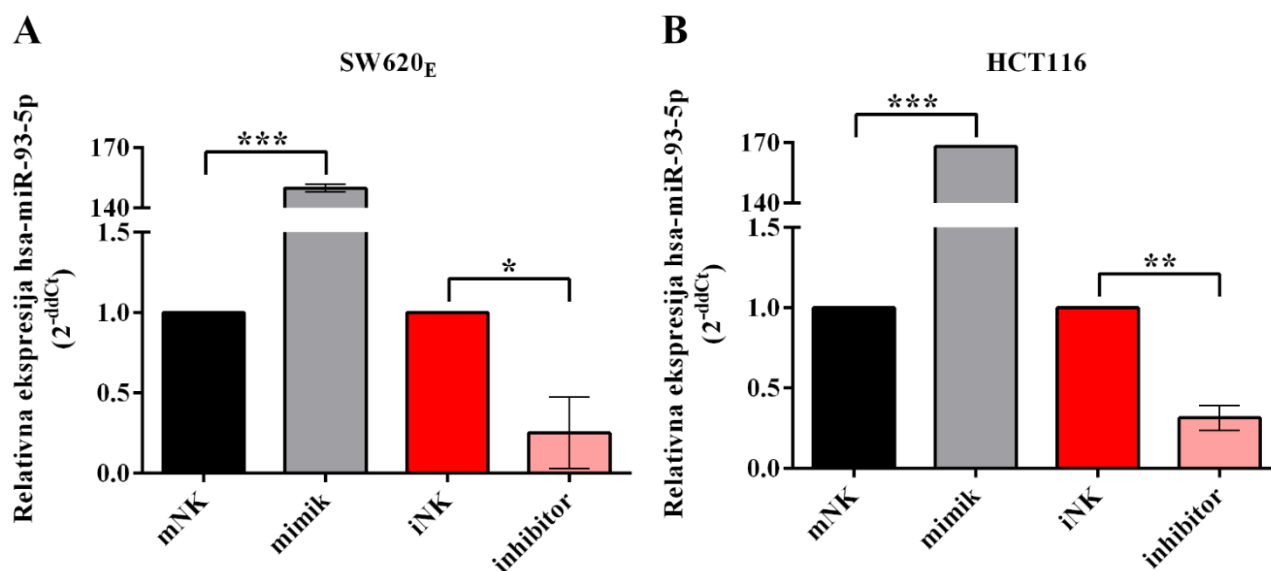
Kako bi se ispitala uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU, ekspresija hsa-miR-93-5p je izmerena u SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU, i to u adherentnim ćelijama (rezistentne na 5-FU) i u plutajućim ćelijama (odlepljene ćelije i mrtve ćelije). Iz rezultata prikazanih na Slici 26 se najpre može primetiti da je ekspresija hsa-miR-93-5p u kontrolnim adherentnim ćelijama neizmenjena u odnosu na odlepljene ćelije kod obe testirane ćelijske linije. Nakon tretmana sa 5-FU, u adherentnim ćelijama nije došlo do promene u ekspresiji hsa-miR-93-5p niti kod SW620<sub>E</sub> niti kod HCT116 ćelija. Međutim, ekspresija hsa-miR-93-5p u plutajućim HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU je bila statistički značajno viša ( $p=0,007$ ) u odnosu na kontrolne plutajuće ćelije. Isti trend je primećen i kod SW620<sub>E</sub> ćelija, međutim statistička značajnost nije uočena ( $p=0,366$ ). Uočena je i statistički značajno viša ekspresija hsa-miR-93-5p plutajućim u odnosu na adherentne HCT116 ćelije nakon tretmana sa 5-FU ( $p=0,030$ ). Ovi rezultati potvrđuju da hsa-miR-93-5p nema ulogu u rezistenciji na 5-FU u živim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama, ali i ukazuju na povišenu ekspresiju hsa-miR-93-5p u odlepljenim/mrtvim HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU.



**Slika 26. Ekspresija hsa-miR-93-5p u adherentnim i plutajućim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU.** SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelije su zasejane u Petri posudu prečnika 10 cm i tretirane narednog dana sa odgovarajućim IC<sub>50</sub> vrednostima 5-FU. 48 h nakon tretmana analizirana je ekspresija hsa-miR-93-5p u adherentnim i plutajućim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije (2<sup>-dCt</sup>) ± standardna devijacija (SD) iz 2 različita eksperimenta.

#### 4.4.4. Analiza uspešnosti transfekcije SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija hsa-miR-93-5p mimikom i inhibitorom

Pre izvođenja eksperimenata koji zahtevaju povišenu ili sniženu ekspresiju hsa-miR-93-5p, bilo je neophodno analizirati uspešnost transfekcije SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija hsa-miR-93-5p mimikom i inhibitorom u odnosu na njihove kontrole mNK i iNK, respektivno. Sa rezultata prikazanih na Slici 27 se može videti da je hsa-miR-93-5p mimik značajno povećao (150,0±1,4 puta ( $p<0,001$ ); 168,2±0,0 puta ( $p<0,001$ )) ekspresiju hsa-miR-93-5p kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, respektivno, a da je hsa-miR-93-5p inhibitor značajno smanjio (za 74,7±18,3% ( $p=0,021$ ); za 68,5±5,5% ( $p=0,006$ )) ekspresiju hsa-miR-93-5p kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, respektivno. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da je transfekcija hsa-miR-93-5p mimikom i hsa-miR-93-5p inhibitorom bila uspešna, zbog čega su ovi uslovi transfekcije korišćeni u narednim eksperimentima.

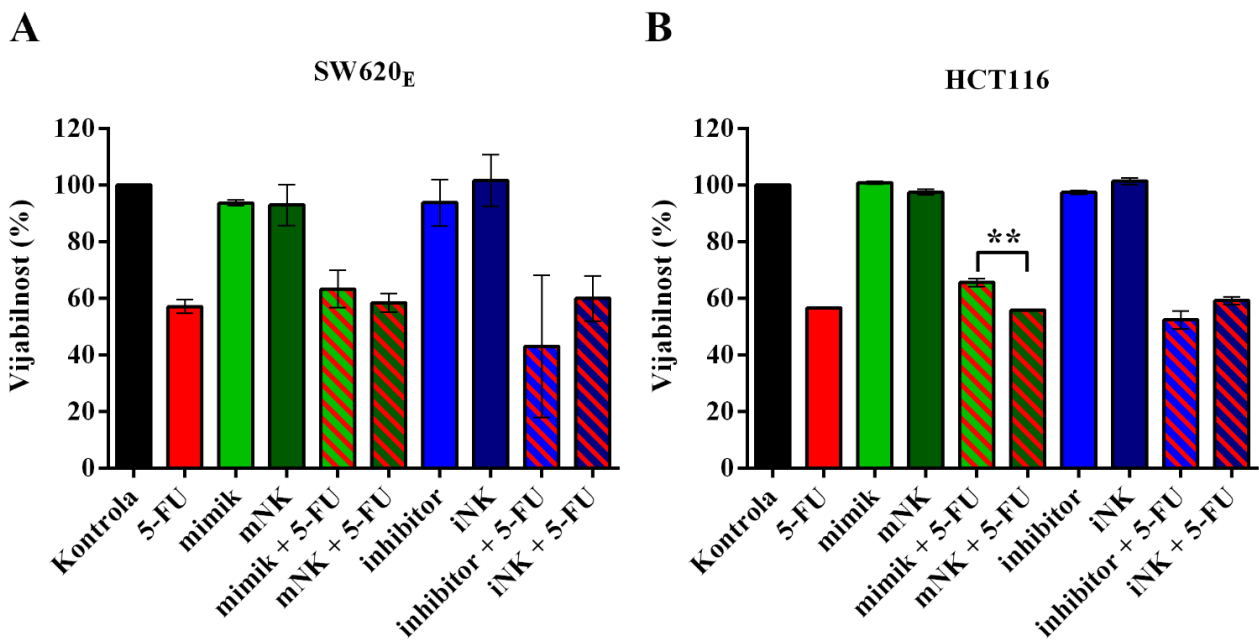


**Slika 27. Analiza uspešnosti transfekcije sa hsa-miR-93-5p mimikom i inhibitorom.** SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelije su zasejane u mikrotitar ploču sa 6 bunarića, a narednog dana su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom, inhibitorom, mNK i iNK. 24 h nakon transfekcije analizirana je ekspresija hsa-miR-93-5p u SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativne ekspresije (2<sup>-ddCt</sup>) ± standardna devijacija (SD) iz 2 različita eksperimenta. mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor; \*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,010$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.4.5. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p, sa ili bez kotretmana sa 5-FU, na vijabilnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija

Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p, sa ili bez tretmana sa 5-FU, na vijabilnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija je ispitan bojenjem kristal violetom (Slika 28). S obzirom da su korišćene IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU, tretman sa 5-FU je očekivano doveo do smanjenja vijabilnosti obe ćelijske linije. Tretman sa hsa-miR-93-5p mimikom ili inhibitorom nije doveo do statistički značajne promene vijabilnosti SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija. Kotretman hsa-miR-93-5p mimikom ili inhibitorom i 5-FU, nije značajno promenio vijabilnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, u poređenju sa 5-FU tretmanom. Međutim, kotretman hsa-miR-93-5p mimikom sa 5-FU je povećao vijabilnost HCT116 ćelija za 9,8% ( $p = 0,009$ ) u odnosu na kotretman mNK i 5-FU. Kotretman hsa-miR-93-5p inhibitorom sa 5-FU nije doveo do promene vijabilnosti SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija u poređenju sa 5-FU tretmanom. Takođe, nije uočena promena u vijabilnosti SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija kada se uporedi kotretman hsa-miR-93-5p inhibitora sa 5-FU i iNK sa 5-FU. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da povišena/snižena ekspresija hsa-miR-93-5p ne utiče na vijabilnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, međutim, povišena ekspresija hsa-miR-93-5p deluje protektivno na vijabilnost HCT116 ćelija pri kotretmanu sa 5-FU.

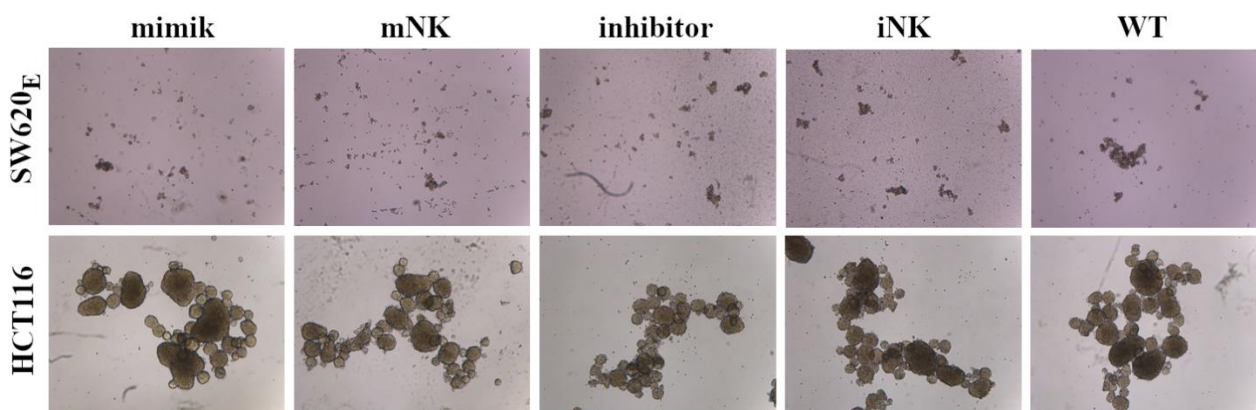




**Slika 28. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p, sa ili bez kotretmana sa 5-FU, na vijabilnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.** SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelije su zasejane u mikrotitar ploču sa 96 bunarića, a narednog dana su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom, inhibitorom, mNK i iNK. 24 h nakon transfekcije, ćelije su tretirane odgovarajućim IC<sub>50</sub> vrednostima 5-FU, a 48 h nakon tretmana sa 5-FU analizirana je vijabilnost (%) SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost četvoroplikata ± standardna devijacija (SD) iz 2 različita eksperimenta. Statističkom analizom je ispitano da li postoji statistička značajnost između vijabilnosti ćelija nakon tretmana mimik i mNK, inhibitor i iNK, mimik+5-FU i 5-FU, inhibitor+5-FU i 5-FU, mimik+5-FU i mNK+5-FU, inhibitor+5-FU i iNK+5-FU, dok su samo statistički značajne veze prikazane. mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor; \*\*  $p < 0,010$ .

#### 4.4.6. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijsku smrt po tipu anoikis kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija

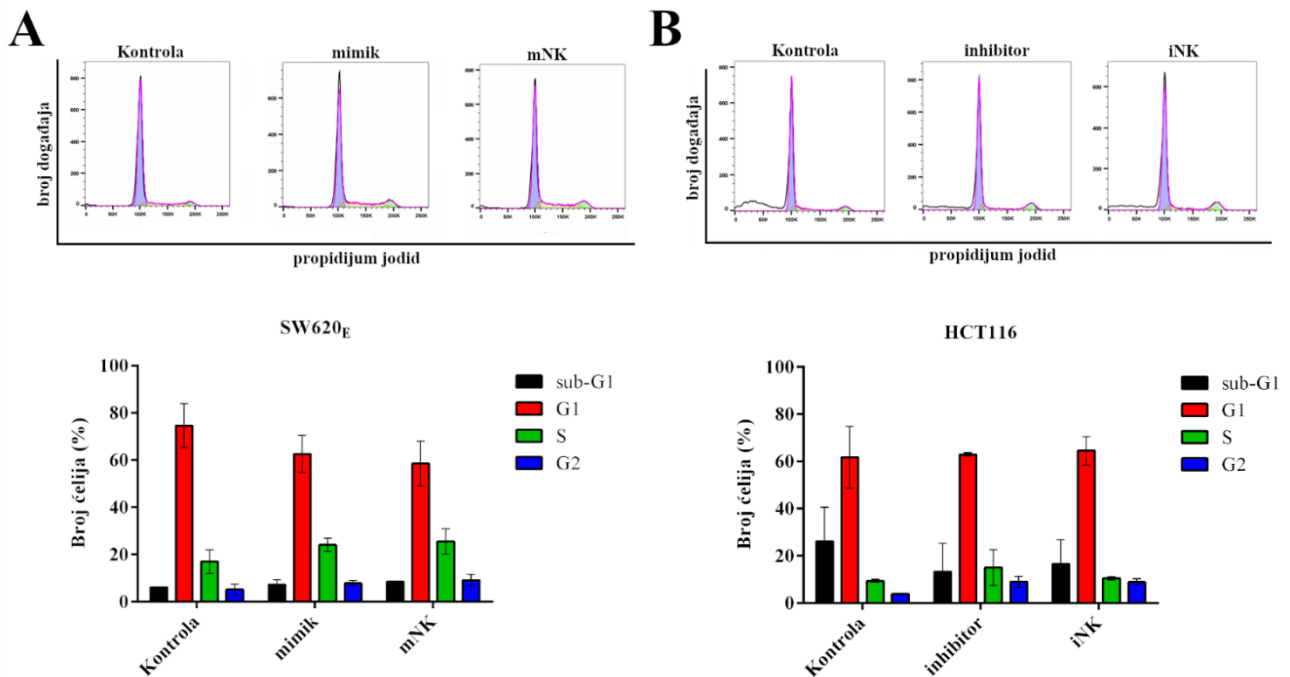
Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijsku smrt po tipu anoikis kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija je ispitan testom onemogućavanja ćelijama da se zalepe za podlogu. Sa Slike 29 se najpre može primetiti da SW620<sub>E</sub> ćelije formiraju izrazito manje klustere/sfere u poređenju sa HCT116 ćelijama. Poređenjem tretmana hsa-miR-93-5p mimik sa mNK, i hsa-miR-93-5p inhibitor sa iNK, se uočava da i SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije uspešno preživljavaju uslove usled kojih ne mogu da se zalepe za podlogu formirajući sferoide. Iz ovih rezultata proizilazi zaključak da hsa-miR-93-5p nije uticala na sposobnost ćelija da se odupru ćelijskoj smrti po tipu anoikis usled nemogućnosti da se zalepe za podlogu.



**Slika 29. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijsku smrt po tipu anoikis kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.** SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije su zasejane u mikrotitar ploču sa 6 bunarića, a narednog dana su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom, mNK, inhibitorom i iNK. 24 h nakon transfekcije, ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa 6 bunarića obložene PolyHEMA hidrogelom u triplicatu. Na slici su predstavljene reprezentativne fotografije nakon 96 h iz 2 različita eksperimenta. WT, netransfekovane SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije; mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor.

#### 4.4.7. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijski ciklus SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija

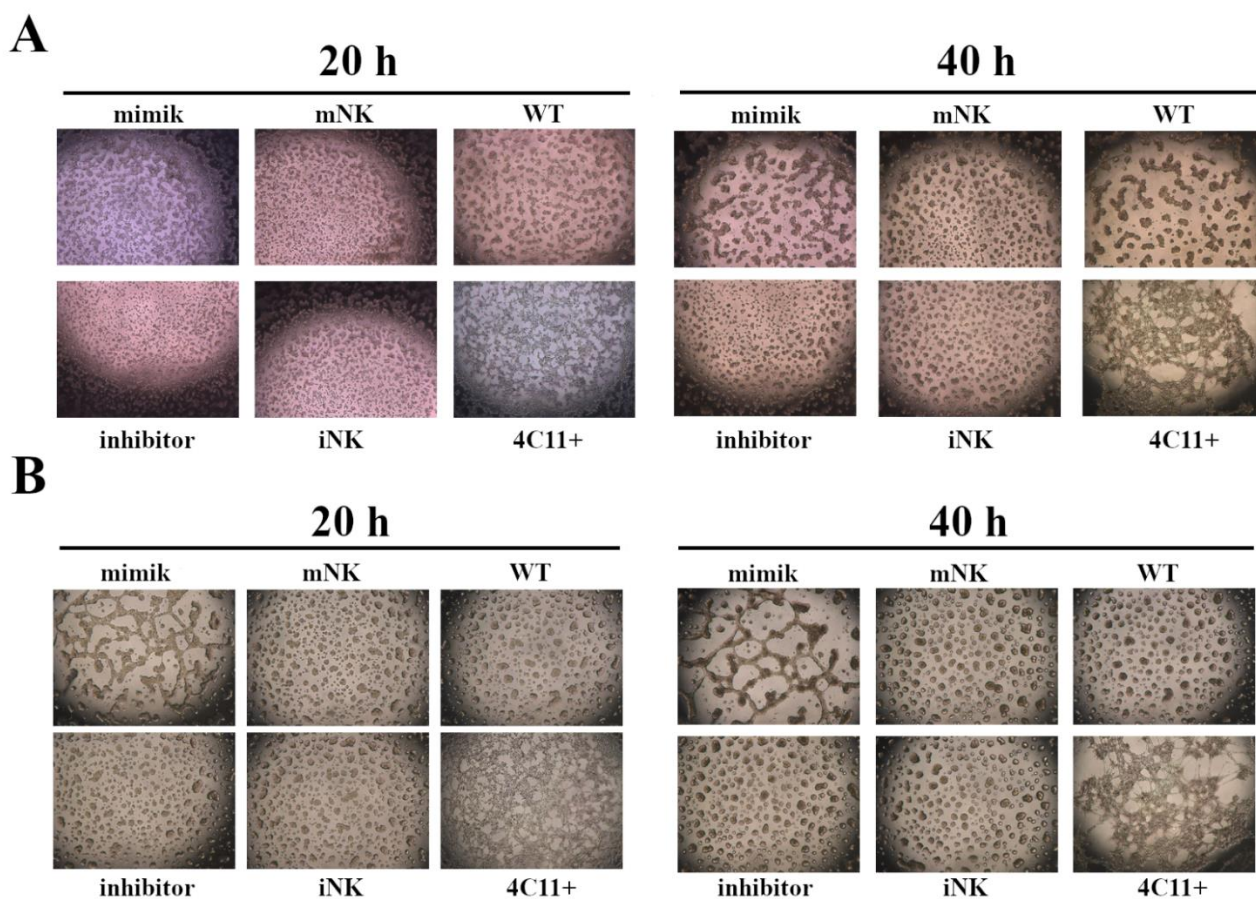
Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na distribuciju faza ćelijskog ciklusa SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija je ispitano pomoću protočne citofluorimetrije. Transfekcija SW620<sub>E</sub> ćelija je urađena samo sa hsa-miR-93-5p mimikom i mNK, dok su HCT116 ćelije transfekovane samo sa inhibitorom i iNK, zato što je ranije pokazano da SW620<sub>E</sub> ćelije imaju niži nivo ekspresije hsa-miR-93-5p u poređenju sa HCT116 ćelijama (Slika 23). Zbog toga, očekuje se da povećanje ekspresije hsa-miR-93-5p ima efekat u ćelijama sa nižom ekspresijom hsa-miR-93-5p (SW620<sub>E</sub>), a sniženje ekspresije hsa-miR-93-5p u ćelijama sa višom ekspresijom (HCT116). Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 30 A se može primetiti da kod transfekovanih SW620<sub>E</sub> ćelija dolazi do zastoja u S/G2 fazi. Međutim, ovaj zastoj je zapažen i nakon tretmana sa hsa-miR-93-5p mimikom i nakon tretmana sa mNK, na osnovu čega se može zaključiti da ovaj efekat nije posledica dejstva povećane ekspresije hsa-miR-93-5p, već posledica samog procesa transfekcije. Što se tiče HCT116 ćelija (Slici 30 B), zapaženo je da je oko 20% ćelija bilo u sub-G1 fazi, kako u kontrolnim ćelijama, tako i u transfekovanim ćelijama, što govori o velikom procentu ćelija u apoptozi, zbog čega se rezultati za HCT116 ćelije ne mogu uzeti u razmatranje. Ovi rezultati ukazuju da hsa-miR-93-5p ne utiče na distribuciju faza ćelijskog ciklusa kod SW620<sub>E</sub> ćelija.



**Slika 30. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na ćelijski ciklus SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.** Distribucija SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije su zasejane u mikrotitar ploču sa 6 bunarića, a narednog dana SW620<sub>E</sub> ćelije su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom i mNK, dok su HCT116 ćelije transfekovane sa inhibitorom i iNK. 24 h nakon transfekcije, ćelije su fiksirane, obojene sa PI-om, i analizirane na protočnom citometru. Na gornjem delu grafika su predstavljeni reprezentativni histogram plotovi sa naznačenim procentom ćelija u određenoj fazi ćelijskog ciklusa. Na donjem delu grafika je dat kvantitativni prikaz rezultata. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost procenta ćelija u apoptozi ± SD iz 2 različita eksperimenta. Kontrola, netransfekovane SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije; mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor.

#### 4.4.8. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na sposobnost formiranja tuba SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija

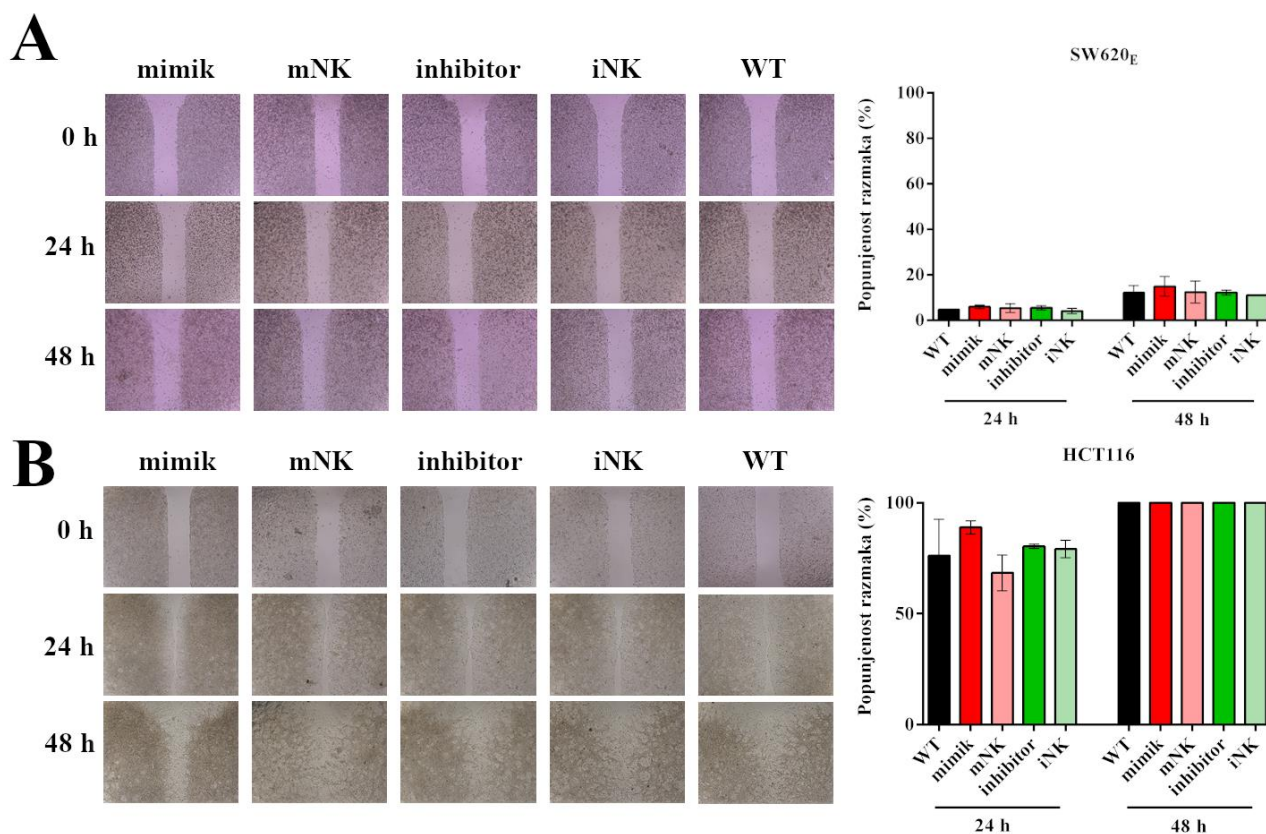
Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na sposobnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija da se umrežavaju *in vitro* analiziran je testom formiranja tuba. Netransfekovane HCT116 ćelije su korišćene kao negativna kontrola, dok su 4C11+ ćelije korišćene kao pozitivna kontrola spontanog formiranja tuba. Netransfekovane SW620<sub>E</sub>, kao i HCT116 ćelije, ne formiraju spontano tube (Slika 31). Međutim, na Slici 31 se jasno može videti da je hsa-miR-93-5p mimik doveo do formiranja tuba kod SW620<sub>E</sub> (posebno obratiti pažnju na obode bunarića) i HCT116 ćelija, nakon 20 h i 40 h od zasejavanja na Matrigel matriks, u poređenju sa mNK. Tretman sa hsa-miR-93-5p inhibitorom nije doveo do formiranja tuba kod ovih ćelijskih linija. Na osnovu ovog rezultata se može izvesti zaključak da povećana ekspresija hsa-miR-93-5p utiče na *in vitro* formiranje tuba kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.



**Slika 31. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na sposobnost formiranja tuba SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.** SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelije su zasejane u mikrotitar ploču sa 6 bunarića, a narednog dana su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom, inhibitorom, mNK i iNK. 24 h nakon transfekcije, ćelije su odlepljene od podloge i zasejane u mikrotitar ploču sa 96 bunarića preko Matrigel matriksa. Nakon 20 h i 40 h analizirana je sposobnost SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija da formiraju tube. Na slikama su predstavljene reprezentativne fotografije iz 2 različita eksperimenta. WT, eng. *wild type*, netransfektovane SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije; mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor.

#### 4.4.9. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na migraciju SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija

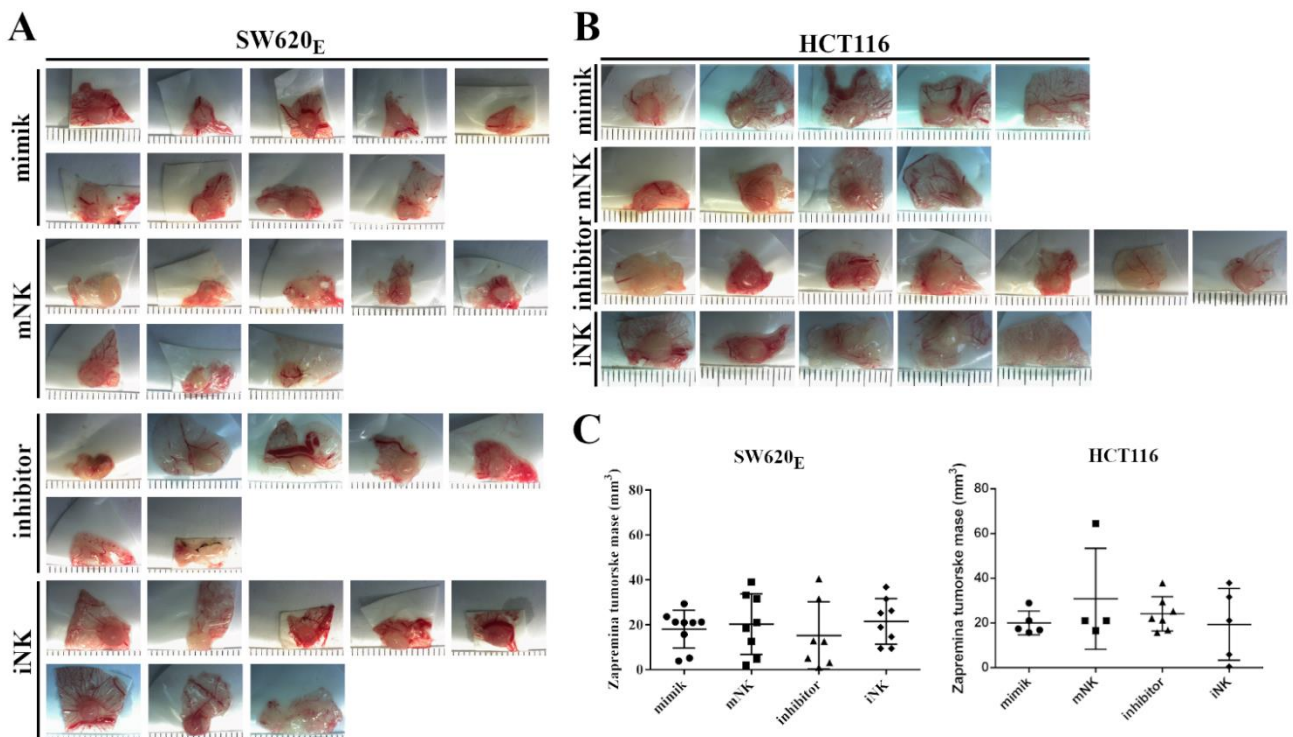
Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na migraciju SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija je ispitan testom zarastanja povrede. Rezultati prikazani na Slici 32 pokazuju da HCT116 ćelije brže zatvaraju slobodni prostor u odnosu na SW620<sub>E</sub> ćelije. Naime, HCT116 ćelije su nakon 48 h u potpunosti zatvorile slobodni prostor, za razliku od SW620<sub>E</sub> ćelija koje su za isto vreme popunile tek približno 15%. Nakon tretmana sa hsa-miR-93-5p mimikom i inhibitorom, nije uočena statistički značajna razlika u procentu ćelija koje su nastanile slobodni prostor u odnosu na ćelije tretirane mNK i iNK, respektivno, kod obe testirane ćelijske linije, niti nakon 24 h, niti nakon 48 h od početka testa. Ovi rezultati ukazuju da hsa-miR-93-5p ne utiče na migraciju SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.



**Slika 32. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na migraciju SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija.** SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelije su zasejane u mikrotitar ploču sa 6 bunarića, a narednog dana su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom, inhibitorom, mNK i iNK. 24 h nakon transfekcije, ćelije su odlepljene od podloge i zasejane u 2 komore silikonskog inserta između kojih se nalazi definisani prostor koji ćelije ne mogu da nastane. Nakon 24 h i 48 h analizirana je migracija SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija u prisustvu inhibitora proliferacije mitomicina C. Na grafiku levo su predstavljene reprezentativne fotografije iz 2 različita eksperimenta, dok je sa desne strane dat kvantitativni prikaz rezultata. WT, eng. *wild type*, netransfekovane SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije; mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor.

#### 4.4.10. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na rast tumora *in vivo*

Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na rast tumora *in vivo* je ispitan koristeći CAM esej. Na Slici 33 A i B su predstavljene fotografije tumorske mase sa okolnim CAM-om iz svakog preživelog embriona pileta na čiji su CAM stavljene SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelije, respektivno. Broj preživelih embriona pileta sa SW620<sub>E</sub> ćelijama za mimik grupu je iznosio 9, za mNK 8, za inhibitor 7, i za iNK 8. Broj preživelih embriona pileta sa HCT116 ćelijama bio 5, 4, 7 i 5 za mimik, mNK, inhibitor i iNK grupu, respektivno. Na osnovu grafika C na Slici 33 se može uočiti da tretman sa hsa-miR-93-5p mimikom, niti sa hsa-miR-93-5p inhibitorom nije doveo do promene u zapremini tumorske mase u odnosu na njihove odgovarajuće kontrole. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da hsa-miR-93-5p ne utiče na rast tumora kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija u *in vivo* model sistemu embriona pileta.



**Slika 33. Uticaj povišene/snižene ekspresije hsa-miR-93-5p na rast tumora *in vivo* koristeći CAM esej.** SW620<sub>E</sub> (A) i HCT116 (B) ćelije su zasejane u Petri posudu prečnika 10 cm, a narednog dana su transfektovane sa hsa-miR-93-5p mimikom, inhibitorom, mNK i iNK. 24 h nakon transfekcije,  $1 \times 10^6$  ćelija je pomešano sa Matrigel matriksom, a zatim su nanese na CAM. Petog dana nakon nanošenja ćelija, tumorska masa je uklonjena sa CAM-a. Na grafiku A i B su predstavljene fotografije tumorske mase sa okolnim CAM-om iz svakog preživelog embriona pileta, dok je na grafiku C dat kvantitativni prikaz rezultata. mimik, hsa-miR-93-5p mimik; mNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p mimik; inhibitor, hsa-miR-93-5p inhibitor; iNK, negativna kontrola za hsa-miR-93-5p inhibitor.

## 5. DISKUSIJA

Svrha ovog istraživanja je bilo ispitivanje uloge miRNK koje učestvuju u regulaciji TGF $\beta$  signalnog puta u mCRC u odgovoru na terapiju, i njihove funkcionalne uloge u procesima relevantnim za CRC karcinogenezu i progresiju. Istraživanje je obuhvatilo *in silico* pretragu miRNK koje regulišu članove TGF $\beta$  signalnog puta i ispitivanje odgovora 3 odabrane miRNK hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p i hsa-miR-93-5p na tretmane pojedinačnim i kombinovanim standardnim hemioterapeutcima za lečenje mCRC *in vitro* uz korelaciju sa odgovorom ćelija na primenjenu terapiju. MiRNK hsa-miR-93-5p koja je pokazala najstabilniji odgovor na primenjene hemioterapeutske lekove je dalje izučavana u okviru prospektivne kliničke studije kako bi se ispitao njen translacioni potencijal kao prediktivnog i prognostičkog biomarkera za pacijente sa CRLM. Takođe, ova miRNK je i funkcionalno okarakterisana nizom testova koji su ispitali uticaj njene izmenjene ekspresije na vijabilnost, ćelijsku smrt, ćelijski ciklus, migraciju, angiogenezu i rezistenciju na terapiju *in vitro*, kao i njen uticaj na rast tumora *in vivo*.

### 5.1. *In silico* analiza

Bioinformatičke predikcije ukazuju da miRNK sisara mogu da regulišu 30% svih protein-kodirajućih gena [112], tako su i članovi kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta direktno regulisani preko miRNK. Budući da je TGF $\beta$  signalizacija povezana sa odgovorom na terapiju, pretpostavljeno je da se miRNK koje regulišu TGF $\beta$  signalni put mogu koristiti za praćenje terapijskog odgovora kod mCRC. Za identifikaciju miRNK molekula koji regulišu 10 članova kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta, pretražen je modul miRWalk2.0 baze podataka koji sadrži informacije o eksperimentalno potvrđenim interakcijama miRNK sa iRNK. Identifikovano je ukupno 316 jedinstvenih miRNK koje regulišu članove kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta, i utvrđeno je da je svaki član kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta regulisan sa najmanje tri miRNK. Od 10 analiziranih gena, *TGFBR2* je regulisan sa najvećim brojem miRNK (ukupno 101), što naglašava složenost mreže i interakcija članova TGF $\beta$  signalnog puta i miRNK. Potvrđujući prethodna otkrića, primećeno je da pojedinačna miRNK može regulisati nekoliko članova TGF $\beta$  signalnog puta [184]. Molekulima miRNK koje regulišu najveći broj članova kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta pripadaju hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p koje regulišu po 5 članova, dok grupa miRNK koja uključuje hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p i hsa-miR-92a-3p regulišu po 4 člana kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta. Zanimljivo je da miRNK u ove dve grupe (sa izuzetkom hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-204-5p i hsa-miR-21-5p) pripadaju miR-106b-25/miR-17-92 paralognim klasterima koji su povezani sa TGF $\beta$  signalnim putem u gastrointestinalnim i drugim tumorima [200-202]. Za dalju analizu u ovoj studiji su odabrane hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p, zato što ove miRNK regulišu najviše članova TGF $\beta$  signalnog puta (po 5 članova), pa se očekuje da promene u ovim miRNK imaju najveći uticaj na ukupnu aktivnost TGF $\beta$  signalnog puta. Dodatno, iz grupe miRNK koje regulišu po 4 člana TGF $\beta$  signalnog puta, u analizu je uključena i hsa-miR-21-5p jer je ova miRNK najviše proučavana u CRC. Dodatni razlog za odabir ove tri miRNK je što je nekoliko studija pokazalo njihovu udruženu povišenu ekspresiju u CRC, u poređenju sa normalnom kolorektalnom sluznicom, što ukazuje na potencijalnu ulogu ove tri miRNK u CRC [203-206].

## 5.2. Odgovor odabranih miRNK na hemioterapiju za lečenje mCRC *in vitro* i korelacija sa ćelijskim odgovorom

CRC je izuzetno heterogena bolest, kako sa molekularnog, tako i sa kliničkog aspekta. Međutim, pokazano je da se svi CRC tumori mogu klasifikovati u 4 konsenzusna molekularna podtipa (eng. *Consensus Molecular Subtype*, CMS) CMS1-4, pri čemu se svaki podtip razlikuje po specifičnoj biologiji i genskoj ekspresiji. Tako podtip CMS1 odlikuje MSI, imunogenost i hipermutagenost, podtip CMS2 se naziva kanonski i karakteriše ga epitelna genska ekspresija i izražena WNT i MYC signalizacija, podtip CMS3 je takođe epitelni sa prisutnom metaboličkom deregulacijom, dok je podtip CMS4 mezenhimalni sa izrazitom aktivacijom TGF $\beta$  signalnog puta, stromalnom invazijom i angiogenezom [207]. Ćelijske linije poreklom od humanih karcinoma su najčešće korišćeni modeli za *in vitro* proučavanje biologije tumora i testiranja hipoteza kako bi se poboljšala efikasnost tretmana za lečenje pacijenata. U cilju proučavanja uticaja hemioterapije za lečenje mCRC na ekspresiju odabranih miRNK, u *in vitro* eksperimentima u ovoj studiji je korišćena humana metastatska ćelijska linija adenokarcinoma kolona SW620 poreklom od metastaze u mezenteričnom limfnom čvoru pacijenta sa Duke C stadijumom CRC [208], i nemaligna ćelijska linija epitela kolona HCEC. Ćelijske linije CRC su takođe molekularno profilirane i kategorisane u CMS podtipove koje verno odlikavaju i rekapituliraju karakteristike CRC [209,210]. Tako je pokazano da ćelijska linija SW620 pripada mezenhimalnom podtipu CMS4 [209]. Kako bi se evaluirao odgovor odabranih miRNK na tretman hemioterapeuticima, krajnji odgovor ćelija na ove tretmane je takođe određen. Na taj način je dobijen uvid kako pomenuti hemioterapeutici deluju na ćelijsku vijabilnost, smrt i ekspresiju gena EMT za koje je pokazano da su povezani sa odgovorom i rezistencijom na hemioterapiju [211].

Ovo je prva studija koja je istražila efekte 5-FU, oksaliplatina, irinotekana i njihovih kombinacija FOX i FIRI na vremenski profil ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p u ćelijskoj liniji poreklom od mCRC. Profili ekspresije odabranih miRNK koje regulišu TGF $\beta$  signalni put su bili izmenjeni nakon 72 h izloženosti pojedinačnim i kombinovanim hemioterapeuticima za lečenje mCRC u SW620 ćelijama. Vremenska tačka od 72 h je izabrana kao najčešća dužina trajanja tretmana hemioterapeutskih lekova u literaturnim podacima, s obzirom da je pokazano da će pomenuti lekovi ispoljiti svoje dejstvo do 72 h. Za razliku od ove studije gde je ekspresija hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p bila stabilna nakon 24 h tretmana, Zhou i saradnici su pokazali da je ekspresija miR-17 i miR-93 bila snižena nakon 24 h tretmana sa 10 mM 5-FU, kao i ekspresija miR-93 nakon 4,25 mM tretmana oksaliplatinom u HCT-8 ćelijama CRC [156]. Iako 5-FU, oksaliplatin i irinotekan imaju različite načine delovanja (inhibicija timidilat sintaze, indukcija oštećenja DNK i inhibicija topoizomerase I, respektivno) [28], efekat nabrojanih tretmana na odabranu miRNK je bio sličan.

Kako bi se ispitalo da li je modulatorni efekat hemioterapeutskih lekova na odabrane miRNK tranzijentan ili stabilan, ekspresija odabranih miRNK je izmerena 24, 72 i 144 h nakon tretmana sa kombinovanim režimima FOX i FIRI, s obzirom da su odabrane miRNK pokazale sličan obrazac ekspresije nakon tretmana sa pojedinačnim ili kombinovanim hemioterapeuticima, i zato što su kombinovani tretmani klinički relevantniji. Nakon 144 h od tretmana, ekspresija hsa-miR-93-5p i hsa-miR-17-5p je i dalje bila smanjena usled FOX i FIRI tretmana. Iako je relativna ekspresija hsa-miR-93-5p i hsa-miR-17-5p pod FOX tretmanom bila slična, nije uočena statistički značajna razlika za nivo ekspresije hsa-miR-17-5p. Na osnovu toga se može predložiti da su hsa-miR-93-5p i hsa-miR-17-5p vredni daljeg testiranja kao potencijalni kandidati za praćenje odgovora na terapiju hemioterapeutskim agensima kod mCRC. Zapravo, postoji sve više dokaza koji impliciraju da



modifikacije profila ekspresije miRNK mogu da predvide uspeh hemioterapije zasnovane na 5-FU-, oksaliplatinu i irinotekanu kod pacijanata sa CRC [154,212].

U pomenutom eksperimentu ćelije su gajene 144 h, zbog čega je provereno da li ćelijska konfluentnost ima uticaj na tranzijentne promene u ekspresiji miRNK, čak iako je gustina zasejanih SW620<sub>B</sub> ćelija prethodno optimizovana tako da do 144 h ne dostignu potpunu konfluentnost. Poređenjem srednjih vrednosti triplikata Ct vrednosti za kontrolne tretmane nakon 24, 72 i 144 h za sve 3 testirane miRNK i endogenu kontrolu RNU6B, uočeno je da je standardna devijacija bila u opsegu od 0,068 do 0,597 ciklusa (rezultati nisu prikazani), na osnovu čega je potvrđeno da nije postojao uticaj konfluentnosti ćelija na ekspresiju testiranih miRNK.

U ovoj studiji, ekspresija onkogene hsa-miR-21-5p u ćelijskoj liniji SW620<sub>B</sub> je bila povišena 72 h nakon svih testiranih tretmana, dok je nakon 144 h njena ekspresija bila snižena blizu bazalnog nivoa. Druge studije su takođe ukazale na povišenu ekspresiju miR-21-5p kao odgovor na 5-FU [155]. Međutim, suprotno rezultatima prikazanim u ovoj studiji, korišćenjem dva CRC klona (C22.20 izveden iz linije HT-29 i klon HC.21 izveden iz linije HCT-116), Rossi i saradnici su pokazali da je ekspresija miR-21 bila povišena 144 h nakon tretmana sa 10 mM 5-FU [155]. Prilikom upoređivanja rezultata ovih studija treba imati na umu korišćenje različitih ćelijskih linija CRC (nastalih od primarnog tumora naspram metastatskog mesta), različite koncentracije primenjenih lekova, pojedinačni naspram kombinovanih tretmana i različito vreme izlaganja ćelija datom leku.

Povišena ekspresija hsa-miR-21-5p u odgovoru na 5-FU, oksaliplatin i irinotekan, naizgled nije u skladu sa anti-tumorskim svojstvima ovih lekova. Međutim, povišena ekspresija nekoliko onkogenih miRNK, uključujući hsa-miR-21-5p, kao odgovor na hemioterapeutske lekove, povezana je sa adaptacijom ćelija karcinoma na hemioterapiju [213]. Štaviše, pokazano je da snižena ekspresija hsa-miR-21-5p povećava osetljivost na 5-FU, oksaliplatin i irinotekan [214,215]. Pored toga, utvrđeno je da je hsa-miR-21-5p prekomerno eksprimirana u CRC ćelijama rezistentnim na 5-FU [216].

Prethodne studije su ukazale na ulogu TGFβ signalnog puta u rezistenciji na lekove kod CRC [107-109], dok modulacija ovog signalnog puta pomoću miRNK može biti izuzetno važna u kontekstu odgovora na terapiju. Kao što je pokazano pri *in silico* analizi, odabrani ciljni geni miRNK u okviru TGFβ signalnog puta se preklapaju. Konkretno, hsa-miR-17-5p reguliše *TGFB1*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *SMAD4* i *SMAD6*, hsa-miR-93-5p reguliše *TGFB1*, *TGFBR2*, *SMAD4*, *SMAD6* i *SMAD7*, a hsa-miR-21-5p reguliše gene *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFBR2* i *SMAD7*. Pored toga, među odabranim ciljnim genima miRNK, neki su pozitivni, a neki su negativni regulatori TGFβ signalnog puta. Zbog finog načina regulacije pomoću miRNK, i brojnih interakcija miRNK i TGFβ signalnog puta sa raznim drugim molekulima, zaključeno je da bi za ispitivanje uticaja kombinovanih režima za lečenje mCRC na aktivaciju TGFβ signalnog puta, analiziranjem nivoa ekspresije jednog od glavnih nishodnih gena TGFβ signalizacije *PAI-1*, bilo informativnije umesto merenja ekspresije pojedinačnih gena koje ove miRNK regulišu. U ovoj studiji je pokazano da su i FOX i FIRI tretmani brzo (nakon 24 h) indukovali aktivaciju TGFβ signalnog puta. Ovaj efekat je bio još izraženiji nakon 72 h od tretmana FOX-om, dok je nakon 144 h, ekspresija *PAI-1* potpuno vraćena na bazalni nivo. Romano i saradnici su pokazali da 5-FU može da aktivira TGFβ signalni put i transkripciju *ACVRL1*, *FNI* i *TGFB1* u ćelijama kolorektalnog karcinoma rezistentnim na lekove [109]. U skladu sa rezultatima prikazanim u ovoj studiji, nedavna publikacija je pokazala da je ekspresija *PAI-1* bila povišena u biopsijama CRC tkiva nakon primene 5-FU hemioterapije [217]. Takođe, Robinson i saradnici su ustanovili povišenu ekspresiju *PAI-1* u jetri miševa koji su imali CRLM, a bili su tretirani FOLFOX-om, u poređenju sa kontrolnim miševima [218].

Povišena ekspresija hsa-miR-21-5p indukovana sa TGF $\beta$  već je primećena kod CRC [219]. Iako SW620<sub>B</sub> ćelije korišćene u ovim eksperimentima nisu bile tretirane sa TGF $\beta$  kako bi se indukovala TGF $\beta$  signalizacija kao u slučaju gorepomenute studije, već hemioterapijskim lekovima, primećena je povišena ekspresija *PAI-1* koja ukazuje na aktivaciju TGF $\beta$  signalnog puta i istovremeno povišena ekspresija hsa-miR-21-5p. Međutim, ostaje nerazjašnjeno da li je povišena ekspresija hsa-miR-21-5p direktna posledica aktivacije TGF $\beta$  signalnog puta, hemioterapeutskog tretmana ili nekog drugog mehanizma.

U ovoj studiji je pokazano da je ekspresija odabranih miRNK koje regulišu TGF $\beta$  signalni put bila stabilna 24 h nakon tretmana, dok je njihova ekspresija bila izmenjena nakon 72 h. Na osnovu ovog nalaza se može zaključiti da uočena brza aktivacija TGF $\beta$  signalnog puta nije posredovana odabranim miRNK. Zatim je pretpostavljeno da bi povišena ekspresija *PAI-1* nakon 72 h u poređenju sa 24 h nakon tretmana sa FOX-om mogla biti povezana sa ukupnom promenom u ekspresiji miRNK povezanih sa TGF $\beta$  signalnim putem, s obzirom da je uočena njihova promena u ekspresiji nakon 72 h u odnosu na 24 h. Kako bi se to ispitalo, izvršena je analiza višestruke regresije. Međutim, nije uočena statistički značajna povezanost, što znači da su u aktivaciju TGF $\beta$  signalnog puta verovatno uključeni neki drugi mehanizmi. Kako bi se brzo odgovorilo na izmenjene sredinske uslove kao što je delovanje citotoksičnih lekova, u aktivaciji TGF $\beta$  signalnog puta bi mogli biti uključeni drugi epigenetički mehanizmi, poput remodelovanja hromatina i aktivacije promotora ciljnih gena čija će ekspresija za posledicu aktivirati oslobađanje TGF $\beta$ . Takođe, kao što je prethodno napomenuto, i drugi molekuli poput Aktivin i Nodal proteina mogu se vezati za TGF $\beta$  receptore i tako aktivirati TGF $\beta$  signalni put.

Efekti citotoksičnih hemioterapeutskih lekova na krajni biološki odgovor ćelija je ispitan analizom ćelijske smrti po tipu apoptoze i merenjem ekspresije markera EMT. U skladu sa prethodnim nalazima, pokazano je da su testirani hemioterapeutski lekovi povećali procenat apoptotičnih ćelija [220-222]. Tretmani irinotekanom i FIRI-jem su imali najizraženiji efekat na apoptozu SW620<sub>B</sub> ćelija. Ranije je pokazano da je irinotekan snažniji aktivator apoptoze od oksaliplatinu [222]. Druga studija je pokazala da kombinacija folne kiseline i FOX-a indukuje apoptotsku ćelijsku smrt efikasnije od kombinacije folne kiseline i FIRI tretmana u CRC ćelijama HT-29 i LoVo [221].

Nedavno objavljena studija je pokazala da se SW620 ćelije sastoje iz tri različite subpopulacije ćelija koje čine epitelne ćelije (visoka ekspresija *CDH1*, niska ekspresija *VIM*), hibridno epitelno-mezenhimalne ćelije (visoka ekspresija i *CDH1* i *VIM*) i dominantno mezenhimalne ćelije (niska ekspresija *CDH1*, visoka ekspresija *VIM*) [223] koje doprinose mezenhimalnom fenotipu ovih ćelija [224]. Skor EMT (odnos ekspresije *CDH1/VIM*) je iskorišćen za procenu EMT statusa u ćelijskoj liniji SW620<sub>B</sub>. Pokazalo se da je odnos *CDH1/VIM* najpodobniji da se okarakterišu različita stanja EMT [223]. Takođe, EMT skor je prethodno korišćen za ispitivanje odgovora na terapiju kod CRC [225]. U ovoj studiji je pokazano da kombinovani hemioterapeutski tretmani FOX i FIRI deluju na SW620<sub>B</sub> ćelije tako što dovode do blagog smanjenja mezenhimalnih karakteristika 72 h nakon tretmana, usled izraženijeg povećanja *CDH1* u odnosu na *VIM*. Međutim, 144 h nakon tretmana ovaj efekat više nije bio uočljiv, jer su se nivoi *CDH1* i *VIM* vratili na bazalnu ekspresiju. Indukcija EMT i posledično mezenhimalnog fenotipa je povezana sa hemiovezivnošću [211]. Takođe, SW620 ćelije pripadaju CMS tipu 4, koji je mezenhimalni i karakteriše ga najlošija prognoza [226]. Na osnovu svega navedenog se može zaključiti da su SW620<sub>B</sub> ćelije inicijalno pokazale relativno dobar odgovor na tretman hemioterapeutima za lečenje mCRC 72 h nakon tretmana. Međutim, 144 h nakon tretmana obrazac ekspresije gena uključenih u EMT ukazuje na povratak na bazalno mezenhimalno stanje. Zanimljivo je da je ekspresija hsa-miR-93-5p i hsa-miR-17-5p za isto vreme ostala snižena pod kombinovanim hemioterapeutskim tretmanima FOX i FIRI, ili samo pod FIRI tretmanom, respektivno. Na osnovu toga što su se SW620<sub>B</sub> ćelije vratile na bazalno mezenhimalno

stanje 144 h nakon tretmana nakon inicijalnog relativno dobrog odgovora na tretman hemioterapeutcima za lečenje mCRC, a da je ekspresija hsa-miR-93-5p i hsa-miR-17-5p za to vreme dugoročno ostala snižena pod kombinovanim hemioterapeutskim tretmanima, ekspresija hsa-miR-93-5p i hsa-miR-17-5p se može smatrati kandidatima vrednim daljeg testiranja kao biomarkera odgovora na terapiju kod mCRC pacijenata tretiranih sa FOX i FIRI režimima, ili samo sa FIRI režimom, respektivno. S obzirom da je jedino hsa-miR-93-5p pokazala najstabilniji odgovor na oba kombinovana režima, ova miRNK je izabrana za analizu u kliničkoj studiji koja uključuje ispitanike sa CRLM i njenu dalju funkcionalnu karakterizaciju u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima.

Poslednjih 15 godina u klinici se sve češće koriste ciljani molekularno-biološki agensi (poput bevacizumaba) u kombinaciji sa sistemskom hemioterapijom [17]. Da bi se proučili efekti sistemske (FOX), ciljane (bevacizumab) i kombinovane terapije (FOX + bevacizumab) koja se koristi za lečenje mCRC, ispitana je vijabilnost neizmenjenih i metastatskih ćelija CRC, kao i ekspresija hsa-miR-93-5p nakon ovih tretmana *in vitro*. Očekivano, tretman FOX-om je smanjio vijabilnost SW620<sub>B</sub> i HCEC-1CT ćelija. Tretman bevacizumabom i kombinacija FOX + bevacizumab je dozno-zavisno smanjila vijabilnost HCEC-1CT ćelija, dok je samo najviša ispitana koncentracija bevacizumaba u kombinaciji sa FOX-om značajno smanjila vijabilnost SW620<sub>B</sub> ćelija. Vuletić i saradnici su pokazali da je tretman 25 i 50 µg/mL bevacizumabom značajno smanjio vijabilnost SW620 ćelija na približno 90% [227], dok rezultati prikazani u ovoj studiji ne ukazuju na citotoksične efekte bevacizumaba ni pri koncentraciji od 250 µg/mL. Druga studija je pokazala da je tretman 250 mg/mL bevacizumabom povećao vijabilnost SW620 ćelija, međutim, te ćelije su gajane u hipoksičnim (1% O<sub>2</sub>) uslovima sa sniženim procentom seruma u medijumu (1% FBS) [228]. Uopšteno, HCEC-1CT ćelije su bile osetljivije na testirane lekove u poređenju sa SW620<sub>B</sub> ćelijama. Nije neuobičajeno da anti-tumorski lekovi ubijaju normalne ćelije, jer je poznato da 5-FU deluje tako što ometa sintezu DNK i RNK i u normalnim, i u tumorskim ćelijama [229]. Iako ne postoje literaturni podaci o vijabilnosti HCEC-1CT ćelija nakon tretmana sa 5-FU, oksaliplatinom i bevacizumabom, pokazano je da 5-FU ima snažan citotoksični efekat na CCD112 ćelije, ćelijsku liniju takođe poreklom od neizmenjenog epitela kolona [230].

Rezultati su pokazali da je ekspresija hsa-miR-93-5p bila viša u ćelijama SW620<sub>B</sub> u poređenju sa neizmenjenim ćelijama epitela kolona HCEC-1CT. Nasuprot ovim nalazima, Tang i saradnici su primetili nižu ekspresiju hsa-miR-93-5p u SW620 ćelijama, ali u poređenju sa srednjom vrednošću nivoa ekspresije hsa-miR-93-5p u normalnoj sluzokoži debelog creva kod 45 ispitanika [231].

Literaturni podaci su pokazali da ciljani terapijski agens bevacizumab utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p kod karcinoma pluća i karcinoma dojke. Naime, bevacizumab u koncentraciji 50 µg/mL je nakon 72 h uticao na povećanje ekspresije hsa-miR-93-5p za približno 2,4 puta kod ćelija karcinoma pluća NCI-H460 [232], dok je ekspresija hsa-miR-93-5p bila snižena za približno 30% kod pacijenata sa karcinomom dojke koje su primale bevacizumab [233]. Efekat ciljanog terapijskog sredstva bevacizumaba na ekspresiju hsa-miR-93-5p još uvek nije proučavan na *in vitro* modelu mCRC. U ovoj studiji je pokazano da tretman 250 µg/mL bevacizumabom, ili bevacizumab u kombinaciji sa FOX-om ne utiču na ekspresiju hsa-miR-93-5p u SW620<sub>B</sub> ćelijama. U ovom eksperimentu je pokazano da je ekspresija hsa-miR-93-5p nakon tretmana FOX-om bila stabilna, što je u suprotnosti sa prethodno prikazanim rezultatima gde je ekspresija hsa-miR-93-5p bila snižena nakon 72 h tretmana sa FOX-om, u istoj ćelijskoj liniji [234]. Jedina razlika u postavci ova dva eksperimenta je bilo korišćenje različitih endogenih kontrola, RNU6B je korišćena u prvom eksperimentu, dok je u drugom korišćena hsa-miR-16-5p. Bitno je istaći da je za obe endogene kontrole pokazano da imaju stabilnu ekspresiju i korišćene su ranije u SW620 ćelijama za normalizaciju ekspresije miRNK [235,236]. Kao i u SW620<sub>B</sub> ćelijama, bevacizumab nije pokazao uticaj na ekspresiju hsa-miR-93-5p u HCEC-1CT ćelijama.

### **5.3. Klinički značaj nivoa ekspresije hsa-miR-93-5p u mCRC**

#### **5.3.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u tumorskom tkivu i serumu ispitanika sa CRLM**

Kako bi se ispitalo klinički značaj hsa-miR-93-5p u mCRC, ekspresija hsa-miR-93-5p je analizirana kod 35 ispitanika sa CRLM pri čemu je prikupljeni biološki materijal bio u vidu tkiva (CRLM i okolno netumorsko tkivo jetre) i seruma svakog od njih. Relativna ekspresija hsa-miR-93-5p je bila značajno viša u CRLM u poređenju sa nemetastatskim tkivom jetre. Za interpretaciju ovog rezultata potrebno je uporediti ekspresiju hsa-miR-93-5p između neizmenjenog tkiva debelog creva i neizmenjenog tkiva jetre [237]. Pokazano je da je ekspresija hsa-miR-93-5p viša u neizmenjenom tkivu debelog creva u poređenju sa neizmenjenim tkivom jetre [238], stoga se može zaključiti da merenjem ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i okolnom neizmenjenom tkivu jetre nisu dobijeni novi podaci o ulozi hsa-miR-93-5p u metastatskom procesu. Druga studija je takođe pokazala povišen nivo hsa-miR-93-5p u CRLM, ali u odnosu na neizmenjeno tkivo debelog creva [239]. U ovom radu je analizirana i povezanost ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa CRLM, ali ona nije pronađena. Međutim, literaturni podaci ukazuju da snižena ekspresija miR-93 značajno korelira sa uznapredovalim stadijumom tumora, i nodalnim i udaljenim metastazama [240], ali i sa slabijom diferencijacijom tumora, prisustvom limfnih metastaza i višim TNM i Duke stadijumima, međutim samo kod ispitanika sa primarnim CRC [241].

MiRNK se oslobađaju iz ćelija u telesne tečnosti, i moguće ih je detektovati kao stabilne cirkulišuće molekule u krvi [242]. Brojne studije su istakle važnost cirkulišućih miRNK kao obećavajućih neinvazivnih biomarkera za ranu detekciju, prognozu bolesti i odabir terapije kod pacijenata sa CRC [175]. Do sada je ograničeni broj studija analizirao korelaciju ekspresije miRNK u CRLM i serumu kod istih pacijenata [243], iako bi ovaj pristup mogao ukazati da li su promene u obrascima ekspresije cirkulišućih miRNK poreklom iz tumorske mase ili nekog drugog izvora [244]. Kako bi se ovo ispitalo, nivoi hsa-miR-93-5p u CRLM su korelirani sa ekspresijom ove miRNK u serumu, međutim, značajna korelacija nije pronađena. CEA i CA 19-9 su ustanovljeni tumorski markeri za otkrivanje recidiva bolesti, dok kombinacija ovih tumorskih markera sa miRNK molekulima može poboljšati diskriminaciju pacijenata koji će imati povoljan ili nepovoljan ishod bolesti [242]. Stoga, ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu je analizirana na prisustvo korelacija sa tumorskim markerima, pri čemu je primećena samo umerena negativna korelacija između ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i nivoa CEA. Dalja istraživanja bi trebalo da razjasne potencijalnu korist kombinovanja standardnih tumorskih markera, kao što je CEA, sa hsa-miR-93-5p za bolju procenu prognoze bolesti kod pacijenata sa CRLM.

#### **5.3.2. Translacioni potencijal hsa-miR-93-5p kao prediktivnog biomarkera kod ispitanika sa CRLM**

MiRNK poreklom iz tkiva i krvi su predložene kao obećavajući biomarkeri za predikciju odgovora na sistemsku i ciljanu terapiju kod pacijenata sa CRC [245]. *In vitro* rezultati prikazani u našoj studiji su pokazali da je ekspresija hsa-miR-93-5p bila dugoročno snižena nakon kombinovanih tretmana 5-FU + oksaliplatin, i 5-FU + irinotekan u SW620<sub>B</sub> ćelijama [234]. Stoga je ispitano da li je ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu izmenjena kod ispitanika koji su primali neoadjuvantnu hemioterapiju zasnovanu na 5-FU u odnosu na one koji nisu primali neoadjuvantnu

hemioterapiju. Budući da nije primećena značajna razlika u ekspresiji hsa-miR-93-5p nakon neoadjuvantne hemioterapije, može se zaključiti da neoadjuvantna hemioterapija zasnovana na 5-FU ne utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p u CRLM i u serumu kod ispitanika sa CRLM. Zatim je ispitana prediktivna vrednost hsa-miR-93-5p kod ispitanika sa CRLM. Međutim, nije primećena značajna povezanost između visoke/niske ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM ili serumu između ispitanika koji su pokazali odgovor na terapiju i onih koji nisu. Ovaj nalaz je u skladu sa studijom Rasmussena i saradnika koja je obuhvatila ispitanike sa mCRC koji su kao prvu liniju lečenja primali XELOX/FOLFOX [246]. Ovi rezultati idu u prilog tome da hsa-miR-93-5p nema prediktivnu vrednost kod pacijenata sa CRLM lečenim hemioterapijom zasnovanom na 5-FU ili oksaliplatinu.

### **5.3.3. Translacioni potencijal hsa-miR-93-5p kao prognostičkog biomarkera kod ispitanika sa CRLM**

MiRNK su takođe povezane sa prognozom i recidivom bolesti kod pacijenata sa CRC [245,247]. Snižena ekspresija hsa-miR-93-5p je prethodno povezana sa ranim recidivom i lošijim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez bolesti kod pacijenata sa CRC [241,248,249]. Kaplan-Meierova analiza je pokazala da nije bilo razlika u jednogodišnjem preživljavanju bez recidiva kod ispitanika sa visokom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM ili u serumu u odnosu na ispitanike sa niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p, međutim, visoki nivoi hsa-miR-93-5p u serumu bili su značajno povezani sa recidivom bolesti kod ispitanika sa CRLM. Stoga se zaključuje da se serumska ekspresija hsa-miR-93-5p potencijalno može koristiti kao prognostički faktor za ranu detekciju recidiva bolesti, ali ne i za procenu preživljavanja bez recidiva bolesti. Za procenu potencijalne uloge hsa-miR-93-5p u detekciji kasnog recidiva, bilo bi neophodno pratiti ispitanike duže od jedne godine.

## **5.4. Funkcionalna karakterizacija hsa-miR-93-5p u CRC**

### **5.4.1. Ekspresija hsa-miR-93-5p u ćelijskim linijama CRC**

Kako bi se funkcionalno okarakterisala hsa-miR-93-5p u procesima relevantnim za kolorektalnu karcinogenezu i odgovor na terapiju *in vitro* i *in vivo*, ekspresija hsa-miR-93-5p je najpre određena u neizmenjenim ćelijama kolona i nekoliko ćelijskih linija CRC. Uočeno je da je ekspresija hsa-miR-93-5p bila niža u svim ćelijskim linijama CRC, osim u HCT116 ćelijama koje su imale približno istu ekspresiju kao i neizmenjene ćelije kolona HCEC. Bitno je napomenuti da je ekspresija hsa-miR-93-5p bila najniža upravo u ćelijskoj liniji mCRC SW620<sub>E</sub>. Ovde se uočava diskrepanca u odnosu na prethodne rezultate ekspresije hsa-miR-93-5p. Naime, prethodno je pokazano da je ekspresija hsa-miR-93-5p bila viša u SW620<sub>B</sub> u odnosu na HCEC-1CT ćelije, a u ovom eksperimentu da je ekspresija hsa-miR-93-5p niža u SW620<sub>E</sub> u odnosu na HCEC ćelije. Potencijalni razlog ovog nalaza može biti detekcija hsa-miR-93-5p u metastatskim i neizmenjenim ćelijama kolona poreklom iz različitih laboratorija, i različitog uslova gajenja HCEC-1CT i HCEC ćelija.

Za dalju funkcionalnu karakterizaciju hsa-miR-93-5p su odabrane ćelijske linije sa najnižom i najvišom ekspresijom hsa-miR-93-5p, odnosno HCT116 i SW620<sub>E</sub> ćelije, respektivno. Studija Tang

i saradnika je takođe pokazala sniženu ekspresiju hsa-miR-93-5p u ćelijskim linijama CRC, međutim u toj studiji, kao kalibrator je korišćena normalna mukoza kolona poreklom od 45 ispitanika [231]. Suprotno rezultatima prikazanim u ovoj studiji, Tang i saradnici su pokazali da je ekspresija hsa-miR-93-5p bila slična u HCT116 i SW620 ćelijama, dok su SW480 ćelije imale nešto višu ekspresiju hsa-miR-93-5p.

#### 5.4.2. Uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU

Ekspresija miRNK je često izmenjena u rezistentnim tumorskim ćelijama [250]. MiRNK hsa-miR-93-5p je povezana sa rezistencijom na hemioterapeutske lekove u nekoliko tipova tumora, uključujući CRC. Naime, povišena ekspresija hsa-miR-93-5p uočena je u ćelijama karcinoma dojke MCF-7 rezistentnim na doksorubicin [251], dok je snižena ekspresija hsa-miR-93-5p primećena u ćelijama karcinoma dojke Bats-72 i Bads-200 rezistentnim na paklitaksel u poređenju sa parentalnom ćelijskom linijom BCap-37 [252], i u ćelijama karcinoma dojke MCF-7 rezistentnim na adriamicin [253]. Povišena ekspresija hsa-miR-93-5p uočena je i u ćelijskim linijama karcinoma jajnika A2780 [254], OVCAR3 i SKOV3 [255] rezistentnim na cisplatinu, u odnosu na njihove originalne ćelijske linije. Takođe, u grupi nefibroznih tkiva prolaktinoma (jednom od podtipova tumora hipofize) rezistentnim na bromokriptin, detektovana je povišena ekspresija hsa-miR-93-5p, u odnosu na grupu senzitivnu na bromokriptin [256]. U ćelijskoj liniji karcinoma pankreasa Bxpc-3 rezistentnoj na gemcitabin je takođe detektovana povišena ekspresija hsa-miR-93-5p, u poređenju sa parentalnim ćelijama [257]. U CRC, ekspresija hsa-miR-93-5p je bila povišena u ćelijama HCT-8/vinkristin, koje su okarakterisane kao ćelije koje su rezistentne na više lekova, u odnosu na izvorne HCT-8 ćelije [258].

Tokom protekle decenije pokazano je da miRNK nemaju samo izmenjenu ekspresiju pri hemiorezistenciji, već imaju važnu ulogu u samoj regulaciji rezistencije na lekove, uključujući 5-FU [250]. Mehanizmi kojima miRNK utiču na rezistenciju ili senzitivnost na 5-FU uključuju regulaciju ključnih molekularnih signalnih puteva povezanih sa CRC uključujući PI3K/AKT i Wnt/ $\beta$ -katenin signalne puteve, regulaciju enzima koji učestvuju u metabolizmu 5-FU poput timidilat sintaze i dihidropirimidin dehidrogenaze, zatim metabolizam glukoze, regulaciju aktivnosti transportera koji sadrže ATP-vezujuću kasetu, regulaciju mehanizama za popravku oštećenja DNK, kao i regulaciju autofagije, apoptoze i proliferacije matičnih ćelija karcinoma [259].

U ovoj studiji je ispitana uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU. Najpre je bilo potrebno odrediti IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU u korišćenim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama. Poznato je da su SW620 ćelije tolerantnije na 5-FU u poređenju sa drugim CRC ćelijskim linijama poput SW480, HCT116, HCT15, HCT8, HT-29 i LOVO ćelija [260]. Širok opseg IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU je prijavljen za SW620 ćelije, od samo 0,5  $\mu$ M [261], preko 8-25  $\mu$ M [262-265] do 100  $\mu$ M [266,267]. U eksperimentu određivanja IC<sub>50</sub> vrednosti 5-FU, IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU kod SW620<sub>E</sub> ćelija je iznosila 126,27  $\mu$ M, dok je IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU kod HCT116 ćelija bila 15,96  $\mu$ M. Uočena izrazita senzitivnost na 5-FU kod HCT116 ćelija u odnosu na SW620<sub>E</sub> ćelije je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima, gde je pokazano da su HCT116 ćelije bile najosetljivije na 5-FU, a SW620 ćelije najotpornije od svih testiranih ćelijskih linija CRC [260]. Dobijena IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU kod SW620<sub>E</sub> ćelija je viša u poređenju sa literaturnim podacima, međutim treba napomenuti da se ove studije značajno razlikuju u trajanju primene leka (od 24 h do 120 h) i tipu testa koji se koristi za merenje vijabilnosti ćelija (MTT, Kit za brojanje ćelija-8 i sulforodaminski test).

Zanimljivo je da je upravo ekspresija hsa-miR-93-5p bila viša u HCT116 ćelijama koje su senzitivnije na 5-FU, a niža u SW620<sub>E</sub> ćelijama koje su rezistentije na 5-FU. Na osnovu ovih nalaza, uočava se da hsa-miR-93-5p negativno korelira sa rezistencijom na 5-FU, na osnovu čega je pretpostavljena uloga hsa-miR-93-5p u hemiorezistenciji kod CRC. Međutim, klinički podaci su ukazali na suprotno, odnosno nije bila uočena povezanost između ekspresije hsa-miR-93-5p i odgovora na terapiju kod osoba koje su primale terapiju zasnovanu na 5-FU. Kako bi se nalaz dobijen sa ispitanicima sa CRLM potvrdio i razjasnila uloga hsa-miR-93-5p u rezistenciji na 5-FU, ekspresija hsa-miR-93-5p je izmerena u originalnim SW620<sub>B</sub> ćelijama (IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU približno oko 196 μM) i SW620<sub>B</sub> ćelijama rezistentnim na 5-FU (SW620<sub>B</sub> 5-FUR) (IC<sub>50</sub> vrednost 5-FU približno oko 351 μM) dobijenim imitirajući uslove pod kojima ispitanici sa mCRC primaju hemioterapiju kako bi se dobio klinički relevantan *in vitro* mCRC model rezistencije na 5-FU. Ovako dobijene 5-FU rezistentne ćelije su imale faktor promene rezistencije od 1,8 u poređenju sa originalnim SW620<sub>B</sub> ćelijama, što se nalazi blizu donje granice za klinički relevantnu rezistenciju sa opsegom faktora promene od 2-8 [268]. Merenjem ekspresije hsa-miR-93-5p u originalnim i 5-FU-rezistentnim SW620<sub>B</sub> ćelijama nije uočena razlika u ekspresiji hsa-miR-93-5p, što potvrđuje odsustvo uloge hsa-miR-93-5p u hemiorezistenciji na 5-FU. Drugi eksperiment koji je za cilj imao razjašnjavanje uloge hsa-miR-93-5p u hemiorezistenciji na 5-FU, je podrazumevao analizu ekspresije hsa-miR-93-5p u adherentnim ćelijama (rezistentne na 5-FU) i u plutajućim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama (odlepljene i mrtve ćelije) nakon tretmana sa 5-FU. Rezultati su pokazali da nije bilo razlike u ekspresiji hsa-miR-93-5p u kontrolnim adherentnim i kontrolnim odlepljenim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama. Neočekivano, nije bilo razlike u ekspresiji hsa-miR-93-5p ni u adherentnim ćelijama nakon tretmana sa 5-FU, u poređenju sa netretiranim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama. Moguće objašnjenje zašto nije detektovana snižena ekspresija hsa-miR-93-5p u adherentnim SW620<sub>E</sub> ćelijama nakon tretmana sa 5-FU je to što je ovaj eksperiment trajao 48 h, za razliku od prethodno opisanog eksperimenta gde je detektovana snižena ekspresija hsa-miR-93-5p nakon 72 h. Iz pomenutog eksperimenta je poznato da se ekspresija hsa-miR-93-5p nakon tretmana sa 5-FU ne menja nakon 24 h, a da se promena ekspresije hsa-miR-93-5p uočava nakon 72 h, tako da je moguće da se uočena promena odvija upravo između 48 h i 72 h, odnosno rezultati eksperimenta sa adherentnim i plutajućim ćelijama govore u prilog tom objašnjenju. Sa druge strane, u ova dva eksperimenta je korišćena ista ćelijska linija SW620, ali poreklom iz dve različite laboratorije (SW620<sub>E</sub> i SW620<sub>B</sub>), gde je bitno napomenuti da je kod određenih ćelijskih linija gajenih u različitim laboratorijama uočena izuzetna genomska, transkriptomaska i proteomska heterogenost, koja može uticati na reproducibilnost rezultata [269]. Takođe, u prilog heterogenosti SW620<sub>E</sub> i SW620<sub>B</sub> ćelija ukazuju i različite IC<sub>50</sub> vrednosti za 5-FU (126,27 μM i 196 μM, respektivno).

Ekspresija hsa-miR-93-5p u plutajućim HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU je bila viša u odnosu na kontrolne plutajuće ćelije. Uočena je i značajno viša ekspresija hsa-miR-93-5p plutajućim u odnosu na adherentne HCT116 ćelije nakon tretmana sa 5-FU. Ovi rezultati potvrđuju da hsa-miR-93-5p nema ulogu u rezistenciji na 5-FU u živim SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelijama, ali i ukazuju na povišenu ekspresiju hsa-miR-93-5p u odlepljenim/mrtvim HCT116 ćelijama nakon tretmana sa 5-FU, što potencijalno ukazuje na ulogu hsa-miR-93-5p u procesima odlepljivanja ćelija od podloge i uticaja na ćelijsku smrt. Nedavno objavljena studija je pokazala da SW620 ćelije proizvode znatan broj odlepljenih ćelija od podloge, čak i pri niskoj gustini zasejavanja, kao i da je do 94% ovih plutajućih ćelija živo i da imaju sposobnost deobe i ponovnog učvršćivanja za podlogu imitirajući, iako izuzetno uprošćen, proces metastaziranja [270]. Ova studija je takođe pokazala da postoji 1227 gena koji pokazuju minimalno dvostruku diferencijalnu ekspresiju kod plutajućih SW620 ćelija u poređenju sa adherentnim. Međutim, nije identifikovana diferencijalna ekspresija gena koji kodira za miR-93 između adherentnih i plutajućih SW620 ćelija, što je u skladu sa

nalazima ove disertacije. Iako je diferencijalna ekspresija hsa-miR-93-5p uočena samo kod HCT116 ćelija, zbog sposobnosti SW620 ćelija da proizvode veliki broj odlepljenih ćelija koje se spontano mogu ponovo pričvrstiti za podlogu, obe ćelijske linije su dalje korišćene pri analizi uloge hsa-miR-93-5p u testovima koji opisuju proces metastaziranja.

#### **5.4.3. Hsa-miR-93-5p i uticaj na vijabilnost i proliferaciju ćelija**

Onkogeni uloga hsa-miR-93-5p je pokazana u regulaciji proliferacije i vijabilnosti ćelija kod nekoliko tipova tumora, poput karcinoma jajnika [271], glioblastoma [271], nazofaringealnog karcinoma [272], nesitnoćelijskog karcinoma pluća [273], karcinoma jednjaka [274], karcinoma grlića materice [275,276] i karcinoma želuca [277], dok je tumor-supresorska uloga hsa-miR-93-5p dokazana u U87-MG ćelijama glioma [278], i CRC, regulišući proliferaciju ćelija različitim mehanizmima. Naime, pokazano je da je povišena ekspresija hsa-miR-93-5p inhibirala proliferaciju i formiranje kolonija kod SW1116 ćelija gajenih u medijumu bez seruma sa karakteristikama matičnih ćelija [279], zatim SW480 i HCT116 ćelija regulacijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta [231,280], kao i LOVO i SW480 ćelija kroz uticaj na hsa-miR-93-5p/HMGB3 regulatornu osu [281]. Takođe, Caco2 ćelije sa stabilno povišenom ekspresijom hsa-miR-93-5p su imale smanjenu stopu proliferacije za 40%, u poređenju sa originalnim Caco2 ćelijama, a predloženi mehanizam regulacije ćelijske proliferacije je uključio gene *ERBB2*, *p21* i *VEGF*, jer je pokazano da hsa-miR-93-5p inhibira ekspresiju ovih gena, koji su inače i povezani sa proliferacijom ćelija [248]. Rezultati prikazani u ovoj studiji su pokazali da ni povišena, ni snižena ekspresija hsa-miR-93-5p nije dovela do promene vijabilnosti SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, što je u suprotnosti sa prethodno navedenim studijama koje su uključivale HCT116 ćelije, gde je dokazano anti-tumorsko dejstvo hsa-miR-93-5p [231,280]. Međutim, zapaženo je da je kotretman hsa-miR-93-5p mimikom sa 5-FU povećao vijabilnost HCT116 ćelija, odnosno da je delovao protektivno na vijabilnost HCT116 ćelija, tj. ublažio citotoksično dejstvo 5-FU, i na taj način je ispoljena onkogeni uloga hsa-miR-93-5p uz kotretman sa 5-FU. Studija Li i saradnika, je takođe pokazala onkogeni ulogu hsa-miR-93-5p testom formiranja kolonija, gde je broj kolonija drastično porastao nakon transfekcije sa hsa-miR-93-5p mimikom u prisustvu 5-FU, ali u ćelijama karcinoma želuca SGC-7901 [277]. Međutim, hsa-miR-93-5p može delovati i hemiosenzitivno nakon kotretmana sa drugim hemioterapeutskim lekovima poput oksaliplatina, jer je smanjenjem ekspresije hsa-miR-93-5p pomoću antisens oligonukleotida inhibirana citotoksičnost izazvana oksaliplatinom, i to dozno-zavisno, kod SW480 i HCT-15 ćelija [282]. Sumirano, rezultati ove teze nisu ukazali na ulogu hsa-miR-93-5p u vijabilnosti SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, ali zato hsa-miR-93-5p može delovati protektivno i povećati vijabilnost HCT116 ćelija pri kotretmanu sa 5-FU.

#### **5.4.4. Hsa-miR-93-5p i uticaj na ćelijski ciklus i ćelijsku smrt**

Kao i u regulaciji ćelijske proliferacije i vijabilnosti, dvojaka uloga hsa-miR-93-5p (onkogeni i tumor-supresorska) je pokazana u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze u različitim tipovima karcinoma. Tako je u ćelijama karcinoma jajnika OVCAR3 i SKOV3, stopa apoptoze bila smanjena za 60% i 48%, respektivno, nakon tretmana hsa-miR-93-5p mimikom [255]. Onkogeni uloga hsa-miR-93-5p je primećena i u karcinomu jajnika gde je inhibicija ove miRNK dovela do povećanja stope umiranja CaSki i HeLa ćelija po tipu apoptoze [275]. U ćelijama nazofaringealnog karcinoma, povišena ekspresija hsa-miR-93-5p je značajno smanjila procenat ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa i



povećala procenat ćelija u S fazi [272], dok je u U87-MG ćelijama glioma tretman hsa-miR-93-5p mimikom doveo do zaustavljanja ćelija u G0/G1 fazi [278]. Korišćenjem konstrukta koji smanjuje ekspresiju hsa-miR-93-5p inhibirana je proliferacija ćelija blokiranjem progresije ćelijskog ciklusa kroz G2/M fazu i indukovana je apoptoza kod ćelija adenokarcinoma pluća A549 i ćelija skvamocelularnog karcinoma SK-MES-1 [273]. Kod CRC, pokazana je tumor-supresorska uloga hsa-miR-93-5p u regulaciji ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti po tipu apoptoze [248,280,281]. Tako su funkcionalne studije pokazale da povišena ekspresija hsa-miR-93-5p promovira apoptozu SW480 i HCT116 ćelija [280], kao i SW480 i LOVO ćelija [281]. Analiza ćelijskog ciklusa u Caco2 ćelijama je pokazala da je povišena ekspresija hsa-miR-93-5p dovela do akumulacije ćelija u G2 fazi, dok su dalje funkcionalne studije pokazale da hsa-miR-93-5p može da suprimira ekspresiju CCNB1 proteina dovodeći do zastoja u G2 fazi [248]. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da hsa-miR-93-5p ne utiče na distribuciju faza ćelijskog ciklusa kod SW620<sub>E</sub> ćelija, kao ni na ćelijsku smrt, što nije u skladu sa prethodno objavljenim studijama na ćelijama primarnog CRC, ili mCRC. Međutim, neki literaturni podaci takođe ukazuju na odsustvo uloge hsa-miR-93-5p u regulaciji ćelijskog ciklusa i smrti ali u drugim tumorima, kao na primer u karcinomu jednjaka [274] i neuroblastomu [283].

#### **5.4.5. Hsa-miR-93-5p i uticaj na invaziju i migraciju**

Invazija i migracija su neke od osnovnih karakteristika malignih tumora, uključujući CRC. Rezultati predstavljeni u ovoj studiji su pokazali da hsa-miR-93-5p ne utiče na migraciju SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija. Studija Liu i saradnika na karcinomu jednjaka je takođe došla do istog nalaza, pokazujući da hsa-miR-93-5p transportovana egzozomima ne utiče ni na migraciju, ni na invaziju ovih ćelija [274]. Suprotno tome, nekoliko studija na CRC su pokazale da hsa-miR-93-5p ima tumor-supresorsku ulogu u regulaciji invazije i migracije. Naime, pokazano je da je povišena ekspresija hsa-miR-93-5p inhibirala migraciju, ali ne i invaziju Caco2 ćelija [248], zatim suprimirala migraciju HCT116 ćelija [231], suprimirala migraciju i invaziju SW480 i HCT116 ćelija [241], kao i LOVO i SW480 [281]. Za razliku od CRC, većina literaturnih podataka ukazuje na onkogeni ulogu hsa-miR-93-5p u regulaciji invazije i migracije kod karcinoma poput: glioma [271], nazofaringealnog karcinoma [272], nesitnoćelijskog karcinoma pluća [273], karcinoma grlića materice [275,276], karcinoma želuca [277,284], skvamocelularnog karcinoma glave i vrata [285], hepatocelularnog karcinoma [286], i karcinoma jednjaka [287].

#### **5.4.6. Hsa-miR-93-5p i uticaj na angiogenezu**

Poznato je da su miRNK uključene u proces angiogeneze, kroz regulaciju pro- ili anti-angiogenih faktora [288]. Štaviše, uloga hsa-miR-93-5p u regulaciji angiogeneze je pokazana u različitim tipovima karcinoma. Naime, kada su U87 ćelije glioma koje imaju povišenu ekspresiju hsa-miR-93-5p gajene u ko-kulturi sa endotelnim ćelijama, one su uspele da potpomognu širenje, rast, migraciju i formiranje tuba endotelnih ćelija, dok su *in vivo* eksperimenti pokazali da ćelije koje eksprimiraju povišen nivo hsa-miR-93-5p indukuju formiranje krvnih sudova kroz regulaciju integrina-β8 [271]. Takođe, MT-1 ćelije karcinoma dojke sa stabilnom ekspresijom hsa-miR-93-5p formiraju tumore sa više krvnih sudova u poređenju sa ćelijama sa bazalnom ekspresijom hsa-miR-93-5p, a kada se gaje u ko-kulturi sa endogenim ćelijama YPEN dolazi do formiranja kompleksnijih i dužih struktura nalik tubama, u poređenju sa kontrolnim tretmanom [289]. Uloga hsa-miR-93-5p kao promotera

vaskularne mimikrije je pokazana i kod ćelija trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, jer je uočeno da snižena ekspresija hsa-miR-93-5p utiče na smanjenje sposobnosti ovih ćelija da se umrežavaju [290]. Vanćelijske nanovezikule poreklom od osteosarkoma, koje pored drugih miRNK sadrže i hsa-miR-93-5p, su uticale na HUVEC ćelije, poreklom od endotelnih ćelija vene pupčane vrpce, da formiraju strukture nalik tubama *in vitro* i *in vivo* [291]. Povišena ekspresija hsa-miR-93-5p može i direktno stimulirati formiranje lumena HUVEC ćelija kroz inhibiciju ekspresije EPLIN [288]. Nasuprot ovim studijama, studija Qian i saradnika je pokazala da povišena ekspresija hsa-miR-93-5p inhibira angiogenezu kroz regulaciju Ang2 [292]. Rezultati prikazani u ovoj studiji ukazuju da je hsa-miR-93-5p mimik doveo do formiranja tuba kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija, u poređenju sa mNK, čime je pokazana uloga hsa-miR-93-5p u promovisanju vaskularne mimikrije i kod CRC.

#### 5.4.7. Hsa-miR-93-5p i uticaj na rast tumora *in vivo*

Kako bi se potvrdili nalazi dobijeni *in vitro* na ćelijskim linijama, uloga hsa-miR-93-5p je prethodno ispitivana i *in vivo* na mišijim ksenograft modelima. Onkogeni uloga hsa-miR-93-5p je pokazana kod glioma, kada su U87 ćelije transfekovane sa hsa-miR-93-5p mimikom ubačene u CD-1 imuno-kompromitovane miševske formirale znatno veće tumore u poređenju sa kontrolnim tretmanom nakon 6 nedelja [271]. Takođe, miševi kod kojih su ubačene ćelije nazofaringealnog karcinoma CNE1 sa stabilnom ekspresijom hsa-miR-93-5p su razvili veće tumore i imali su veću incidencu razvoja limfnih i plućnih metastaza, u poređenju sa kontrolnom grupom miševa [272]. Na sličan način, onkogeni uloga hsa-miR-93-5p je potvrđena *in vivo* kod karcinoma želuca [284] i hepatocelularnog karcinoma [286]. Saglasno sa *in vitro* studijama, hsa-miR-93-5p je imala tumor-supresorsku ulogu kod CRC. Naime, miševi kod kojih su ubačene Caco2 [248], ili HCT116 ćelije [231] sa povišenom ekspresijom hsa-miR-93-5p su razvili značajno manje tumore u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Tumor-supresorska uloga hsa-miR-93-5p je potvrđena *in vivo* i kod karcinoma jajnika [293], dok kod skvamocelularnog karcinoma glave i vrata nije zapažena uloga hsa-miR-93-5p u regulaciji rasta tumora *in vivo* [285].

Iako je CAM esej dobro ustanovljen model za *in vivo* istraživanja rasta tumora, uloga hsa-miR-93-5p u regulaciji rasta tumora nije prethodno ispitivana ovim esejem. CAM je ekstraembrionalna membrana koja nastaje delimičnim spajanjem horiona i alantoisa tokom embrionalnog razvoja pileta, a po svojoj funkciji se može smatrati ekvivalentom placente sisara. U poređenju sa eksperimentima na glodarima, CAM esej je brži za izvođenje i jeftiniji jer ne zahteva specijalizovane uslove gajenja i parenja jedinki, kao i održavanja imunodeficientnih sojeva usled urođene imunodeficijencije do 14 dana razvoja [294]. Takođe CAM nije inervisan, što omogućava gajenje ksenografta bez nanošenja bola ili povreda embriona pileta. CAM je izuzetno dobro inervisana membrana što je čini idealnim sistemom za rast tumora usled dobrog snabdevanja kiseonikom, nutritivnim i faktorima rasta [195]. Rezultati ove studije su pokazali da ni povećanje, niti smanjenje ekspresije hsa-miR-93-5p kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija i njihove inkubacije na CAM-u nije dovelo do promene u zapremini tumorske mase u odnosu na njihove odgovarajuće kontrole. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da hsa-miR-93-5p ne utiče na rast tumora kod SW620<sub>E</sub> i HCT116 ćelija u *in vivo* model sistema embriona pileta.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

### 1) *In silico* analiza

- *In silico* analizom je identifikovano ukupno 316 jedinstvenih miRNK koje regulišu 10 gena kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBRI*, *TGFBR2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD6* i *SMAD7*.
- Molekulima miRNK koje regulišu najveći broj članova kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta pripadaju hsa-miR-17-5p i hsa-miR-93-5p koje regulišu po 5 članova, dok hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p i hsa-miR-92a-3p regulišu po 4 člana kanonskog TGF $\beta$  signalnog puta.

### 2) Uticaj standardne i ciljane hemioterapije za lečenje mCRC na ekspresiju miRNK koje regulišu članove TGF $\beta$ signalnog puta, aktivnost TGF $\beta$ signalnog puta, vijabilnost i smrt ćelija SW620 *in vitro*

- Standardni hemioterapeutski lekovi 5-FU, oksaliplatin, irinotekan i njihovi kombinovani režimi FOX i FIRI utiču na ekspresiju hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p u SW620 ćelijama. Promena ekspresije hsa-miR-21-5p nakon tretmana kombinovanim hemioterapeutima je bila tranzijentna tokom vremena, dok je hsa-miR-93-5p pokazala najstabilniji odgovor na ove tretmane.
- Kombinovani hemioterapeutski tretmani FOX i FIRI indukuju aktivaciju TGF $\beta$  signalizacije u SW620 ćelijama, koja nije povezana sa promenama ekspresije hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p i hsa-miR-21-5p.
- SW620 su pokazale relativno dobar odgovor na tretman standardnim hemioterapeutskim lekovima jer je došlo do smanjenja vijabilnosti i indukcije smrti ovih ćelija, ali i promene ekspresije gena EMT kojom su poprimile karakteristike slične epitelnim ćelijama.
- Rastuće koncentracije ciljanog hemioterapeutskog agensa bevacizumaba nisu imale efekat na vijabilnost SW620 ćelija, dok je kombinacija FOX tretmana i najviše ispitane koncentracije bevacizumaba značajno smanjila vijabilnost SW620 ćelija. Ćelije HCEC su bile senzitivnije na dejstvo bevacizumaba u odnosu na ćelije SW620.
- Bevacizumab, niti kombinacija FOX + bevacizumab nema efekta na ekspresiju hsa-miR-93-5p u SW620 ćelijama.

### 3) Translacioni potencijal hsa-miR-93-5p kod ispitanika sa CRLM

- Nivo ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu nije povezan sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika sa CRLM.
- Relativna ekspresija hsa-miR-93-5p je viša u CRLM u poređenju sa netumorskim tkivom jetre.
- Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM ne korelira sa ekspresijom hsa-miR-93-5p u serumu.
- Nivo ekspresije hsa-miR-93-5p u CRLM umereno negativno korelira sa nivoom tumorskog markera CEA.
- Neoadjuvantna hemioterapija ne utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu.
- Ekspresija hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu nije povezana sa odgovorom na neoadjuvantnu hemioterapiju.

- Nije uočena razlika u jednogodišnjem preživljavanju bez recidiva kod pacijenata sa visokom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM i serumu u poređenju sa ispitanicima sa niskom ekspresijom hsa-miR-93-5p.
- Visoka ekspresija hsa-miR-93-5p u serumu je povezana sa pojavom ranog recidiva bolesti.

#### 4) Funkcionalna karakterizacija hsa-miR-93-5p

- Ekspresija hsa-miR-93-5p u ćelijskim linijama CRC opada u smeru HCT116→DLD-1→SW480→SW837→SW620 u odnosu na ćelije neizmenjenog epitela kolona HCEC, dok je ekspresija hsa-miR-93-5p u ćelijama HCT116 približna njenoj ekspresiji u ćelijama HCEC.
- Ćelije HCT116 sa višom ekspresijom hsa-miR-93-5p su približno 8 puta osetljivije na 5-FU u odnosu na ćelije SW620 sa nižom ekspresijom hsa-miR-93-5p.
- Ne postoji razlika u ekspresiji hsa-miR-93-5p u originalnim ćelijama SW620 u poređenju sa ćelijama SW620 rezistentnim na 5-FU.
- Nakon tretmana sa 5-FU ne dolazi do promene ekspresije hsa-miR-93-5p u adherentnim rezistentnim ćelijama SW620 i HCT116 u odnosu na netretirane adherentne ćelije, ali je zato ekspresija hsa-miR-93-5p u plutajućim ćelijama HCT116 nakon tretmana sa 5-FU viša u odnosu na kontrolne plutajuće ćelije.
- Povišena/snižena ekspresija hsa-miR-93-5p ne utiče na vijabilnost SW620 i HCT116 ćelija, međutim, povišena ekspresija hsa-miR-93-5p deluje protektivno na vijabilnost HCT116 ćelija pri kotretmanu sa 5-FU.
- Povišena/snižena ekspresija hsa-miR-93-5p ne utiče na sposobnost ćelija SW620 i HCT116 da se odupru ćelijskoj smrti po tipu anoikis usled nemogućnosti da se zalepe za podlogu.
- Povišena/snižena ekspresija hsa-miR-93-5p ne utiče na distribuciju faza ćelijskog ciklusa kod SW620 ćelija.
- Povišena ekspresija hsa-miR-93-5p stimuliše *in vitro* formiranje tuba kod ćelija SW620 i HCT116.
- Povišena/snižena ekspresija hsa-miR-93-5p ne utiče na migraciju ćelija SW620 i HCT116.
- Povišena/snižena ekspresija hsa-miR-93-5p ne utiče na rast tumora kod ćelija SW620 i HCT116 na *in vivo* model sistemu embriona pileta.

Na osnovu iznetih konkretnih zaključaka može se izvesti opšti zaključak da je mreža interakcija miRNK sa članovima TGF $\beta$  signalnog puta veoma kompleksna. Pokazano je da standardni hemioterapeutici koji se koriste za lečenje mCRC utiču na ekspresiju miRNK koje regulišu članove TGF $\beta$  signalnog puta i njegovu aktivaciju *in vitro*. Prospektivna klinička studija je pokazala da hsa-miR-93-5p u serumu ima potencijalni translatorni potencijal kao neinvazivni prognostički biomarker za pojavu ranog recidiva bolesti kod ispitanika sa CRLM. Funkcionalna karakterizacija je pokazala da hsa-miR-93-5p stimuliše *in vitro* formiranje tuba, ali da ne utiče na vijabilnost, ćelijski ciklus, rezistenciju na 5-FU, anoikis i migraciju *in vitro*, kao ni na rast tumora *in vivo*.

## 7. LITERATURA

1. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(9): 1423-1431.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
3. Mclellan EA, Bird RP. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res* 1988; 48(21): 6187-6192.
4. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002; 89(7): 845-860.
5. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int* 2012; 2012(597497).
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-767.
7. Network CGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407): 330-337.
8. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1(15065).
9. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(7): 489-499.
10. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R et al. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 2006; 106(7): 1624-1633.
11. Disibio G, French SW. Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(6): 931-939.
12. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 1986; 150(3): 195-203.
13. Blumgart LH, Fong Y. Surgical options in the treatment of hepatic metastasis from colorectal cancer. *Curr Probl Surg* 1995; 32(5): 333-421.
14. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, Group EGW. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2014; 25 Suppl 3(iii1-9).
15. Helling TS, Martin M. Cause of death from liver metastases in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(2): 501-506.
16. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ* 1993; 306(6880): 752-755.
17. Weinberg BA, Marshall JL, Hartley M, Salem ME. A paradigm shift from one-size-fits-all to tailor-made therapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2016; 14(2): 116-128.
18. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(17): 1609-1618.
19. Advani S, Kopetz S. Ongoing and future directions in the management of metastatic colorectal cancer: Update on clinical trials. *J Surg Oncol* 2019; 119(5): 642-652.
20. Rothbarth J, Van De Velde CJ. Treatment of liver metastases of colorectal cancer. *Ann Oncol* 2005; 16 Suppl 2(ii144-149).
21. Zampino MG, Magni E, Ravenda PS, Cella CA, Bonomo G, Della Vigna P et al. Treatments for colorectal liver metastases: A new focus on a familiar concept. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 108(154-163).

22. Chow FC, Chok KS. Colorectal liver metastases: An update on multidisciplinary approach. *World J Hepatol* 2019; 11(2): 150-172.
23. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh MA, Mowat FS et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol* 2012; 4(283-301).
24. Adam R. Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 2(ii13-16).
25. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsri R, Schulick RD et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 2002; 235(6): 759-766.
26. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240(4): 644-657; discussion 657-648.
27. Adam R, De Gramont A, Figueras J, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E et al. Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev* 2015; 41(9): 729-741.
28. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352(5): 476-487.
29. Thirion P, Michiels S, Pignon JP, Buyse M, Braud AC, Carlson RW et al. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(18): 3766-3775.
30. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355(9209): 1041-1047.
31. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(1): 136-147.
32. De Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(16): 2938-2947.
33. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2001; 19(8): 2282-2292.
34. Sandhu J, Lavingia V, Fakih M. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. *J Surg Oncol* 2019; 119(5): 564-582.
35. Cremolini C, Schirripa M, Antoniotti C, Moretto R, Salvatore L, Masi G et al. First-line chemotherapy for mCRC—a review and evidence-based algorithm. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12(10): 607-619.
36. Falcone A, Masi G, Allegrini G, Danesi R, Pfanner E, Brunetti IM et al. Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional Fluorouracil, and leucovorin: a pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(19): 4006-4014.
37. Souglakos J, Mavroudis D, Kakolyris S, Kourousis C, Vardakis N, Androulakis N et al. Triplet combination with irinotecan plus oxaliplatin plus continuous-infusion fluorouracil and leucovorin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 2002; 20(11): 2651-2657.
38. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25(13): 1670-1676.

39. Atreya CE, Yaeger R, Chu E. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: From Current Standards to Future Molecular Targeted Approaches. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2017; 37(246-256).
40. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol* 2012; 30(28): 3499-3506.
41. Tabernero J, Takayuki Y, Cohn AL. Correction to Lancet Oncol 2015; 16: 499-508. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015; 16(6): e262.
42. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381(9863): 303-312.
43. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-2342.
44. Yu IS, Cheung WY. Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Personalized Medicine: A More Tailored Approach to Systemic Therapy. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; 2018(9450754).
45. Hurwitz HI, Tebbutt NC, Kabbinavar F, Giantonio BJ, Guan ZZ, Mitchell L et al. Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials. *Oncologist* 2013; 18(9): 1004-1012.
46. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28(31): 4697-4705.
47. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29(15): 2011-2019.
48. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, Fornaro L, Cremolini C, Cupini S et al. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(9): 845-852.
49. Gruenberger T, Bridgewater J, Chau I, García Alfonso P, Rivoire M, Mudan S et al. Bevacizumab plus mFOLFOX-6 or FOLFOXIRI in patients with initially unresectable liver metastases from colorectal cancer: the OLIVIA multinational randomised phase II trial. *Ann Oncol* 2015; 26(4): 702-708.
50. Pfeiffer P, Qvortrup C, Eriksen JG. Current role of antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26(25): 3661-3678.
51. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; 96(8): 1166-1169.
52. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26(3): 374-379.
53. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(17): 1757-1765.
54. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(13): 1658-1664.

55. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, Mckinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 2015; 26(1): 13-21.
56. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(24): 5469-5479.
57. Takahashi M, Cuatrecasas M, Balaguer F, Hur K, Toiyama Y, Castells A et al. The clinical significance of MiR-148a as a predictive biomarker in patients with advanced colorectal cancer. *PloS One*, 2012; 7 (10): e46684.
58. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 2009; 136(22): 3699-3714.
59. Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(9): 2078-2093.
60. Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(5): 265-273.
61. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113(6): 685-700.
62. Goumans MJ, Liu Z, Ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009; 19(1): 116-127.
63. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* 2018; 14(2): 111-123.
64. Huang JJ, Blobel GC. Dichotomous roles of TGF- $\beta$  in human cancer. *Biochem Soc Trans* 2016; 44(5): 1441-1454.
65. Tian M, Schiemann WP. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol* 2009; 5(2): 259-271.
66. Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(6): 415-424.
67. Yang Y, Ye WL, Zhang RN, He XS, Wang JR, Liu YX et al. The Role of TGF- $\beta$  Signaling Pathways in Cancer and Its Potential as a Therapeutic Target. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021(6675208).
68. Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem* 1995; 270(45): 26750-26753.
69. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5545-5549.
70. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371(6494): 257-261.
71. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8(1): 9-22.
72. Inman GJ, Allday MJ. Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J Immunol* 2000; 165(5): 2500-2510.
73. Motyl T, Grzelkowska K, Zimowska W, Skierski J, Wareski P, Płoszaj T et al. Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol* 1998; 75(4): 367-374.
74. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 1992; 28(2-3): 641-644.
75. Shim KS, Kim KH, Han WS, Park EB. Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer* 1999; 85(3): 554-561.



76. Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M et al. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86(8): 1455-1462.
77. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 91(5): 964-971.
78. Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 1993; 105(6): 1846-1856.
79. Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(5): 549-554.
80. Wikström P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 1998; 37(1): 19-29.
81. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; 166(1): 21-45.
82. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3): L525-534.
83. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(17): 6020-6024.
84. Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* 1988; 263(16): 7646-7654.
85. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008; 123(10): 2229-2238.
86. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2(3): 213-219.
87. Fang L, Li Y, Wang S, Chang HM, Yi Y, Yan Y et al. TGF- $\beta$ 1 induces VEGF expression in human granulosa-lutein cells: a potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Exp Mol Med* 2020; 52(3): 450-460.
88. Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Sasaki A, Kanyama M et al. Involvement of CTGF, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, in tumor angiogenesis. *Oncology* 2001; 61(4): 315-322.
89. Budi EH, Mamai O, Hoffman S, Akhurst RJ, Derynck R. Enhanced TGF- $\beta$  Signaling Contributes to the Insulin-Induced Angiogenic Responses of Endothelial Cells. *iScience* 2019; 11(474-491).
90. Darland DC, D'amore PA. TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells. *Angiogenesis* 2001; 4(1): 11-20.
91. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 2012; 314(1): 1-7.
92. Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142(3): 775-782.
93. Avery A, Paraskeva C, Hall P, Flanders KC, Sporn M, Moorghen M. TGF-beta expression in the human colon: differential immunostaining along crypt epithelium. *Br J Cancer* 1993; 68(1): 137-139.
94. Hoosein NM, Mcknight MK, Levine AE, Mulder KM, Childress KE, Brattain DE et al. Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta 1. *Exp Cell Res* 1989; 181(2): 442-453.

95. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2017; 152(1): 36-52.
96. Tsushima H, Ito N, Tamura S, Matsuda Y, Inada M, Yabuuchi I et al. Circulating transforming growth factor beta 1 as a predictor of liver metastasis after resection in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(5): 1258-1262.
97. Narai S, Watanabe M, Hasegawa H, Nishibori H, Endo T, Kubota T et al. Significance of transforming growth factor beta 1 as a new tumor marker for colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 97(4): 508-511.
98. Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1(R14-20).
99. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55(23): 5548-5550.
100. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J et al. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58(14): 3101-3104.
101. Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270(37): 22044-22049.
102. Mackay SL, Auffenberg T, Tannahill CL, Ksontini R, Josephs MD, Nowak M et al. Transfection of the type II TGF-beta receptor into colon cancer cells increases receptor expression, inhibits cell growth, and reduces the malignant phenotype. *Ann Surg* 1998; 227(6): 781-789.
103. Xie W, Rimm DL, Lin Y, Shih WJ, Reiss M. Loss of Smad signaling in human colorectal cancer is associated with advanced disease and poor prognosis. *Cancer J* 2003; 9(4): 302-312.
104. Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 2000; 157(4): 1105-1111.
105. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M et al. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999; 18(20): 3098-3103.
106. Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306(4): 799-804.
107. Huang S, Hölzel M, Knijnenburg T, Schlicker A, Roepman P, McDermott U et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF- $\beta$  receptor signaling. *Cell* 2012; 151(5): 937-950.
108. Brunen D, Willems SM, Kellner U, Midgley R, Simon I, Bernards R. TGF- $\beta$ : an emerging player in drug resistance. *Cell Cycle* 2013; 12(18): 2960-2968.
109. Romano G, Santi L, Bianco MR, Giuffrè MR, Pettinato M, Bugarin C et al. The TGF- $\beta$  pathway is activated by 5-fluorouracil treatment in drug resistant colorectal carcinoma cells. *Oncotarget* 2016; 7(16): 22077-22091.
110. Jiang Z, Cao Q, Dai G, Wang J, Liu C, Lv L et al. Celastrol inhibits colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smad signaling. *Onco Targets Ther* 2019; 12(509-518).
111. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5(7): 522-531.
112. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9(2): 102-114.
113. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1): 92-105.
114. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018; 173(1): 20-51.
115. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(6): 321-333.

116. Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1179-1184.
117. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3): 228-234.
118. Suzuki HI, Miyazono K. Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88(11): 1085-1094.
119. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-866.
120. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435(7043): 828-833.
121. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7065-7070.
122. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334(4): 1351-1358.
123. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25(17): 2537-2545.
124. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9(3): 189-198.
125. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006; 24(29): 4677-4684.
126. Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68(11): 1152-1164.
127. Michael MZ, O' Connor SM, Van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(12): 882-891.
128. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Sjoblom T et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(10): 3687-3692.
129. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 2012; 6(6): 590-610.
130. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-838.
131. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul* 2015; 57(1-9).
132. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006; 94(6): 776-780.
133. Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 2006; 25(46): 6176-6187.
134. Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2010; 126(6): 1283-1290.
135. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5848-5856.
136. Luo X, Burwinkel B, Tao S, Brenner H. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(7): 1272-1286.
137. Balacescu O, Sur D, Cainap C, Visan S, Cruceru D, Manzat-Saplacan R et al. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12).
138. Oberg AL, French AJ, Sarver AL, Subramanian S, Morlan BW, Riska SM et al. miRNA expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer. *PLoS One* 2011; 6(6): e20465.

139. Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J* 2012; 18(3): 244-252.
140. Tokarz P, Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. *Acta Biochim Pol* 2012; 59(4): 467-474.
141. Cellura D, Pickard K, Quarantino S, Parker H, Strefford JC, Thomas GJ et al. miR-19-Mediated Inhibition of Transglutaminase-2 Leads to Enhanced Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Res* 2015; 13(7): 1095-1105.
142. Lam CS, Ng L, Chow AK, Wan TM, Yau S, Cheng NS et al. Identification of microRNA 885-5p as a novel regulator of tumor metastasis by targeting CPEB2 in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8(16): 26858-26870.
143. Cheng D, Zhao S, Tang H, Zhang D, Sun H, Yu F et al. MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4. *Oncotarget* 2016; 7(29): 45199-45213.
144. Shibuya H, Inuma H, Shimada R, Horiuchi A, Watanabe T. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology* 2010; 79(3-4): 313-320.
145. Ji D, Chen Z, Li M, Zhan T, Yao Y, Zhang Z et al. MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Mol Cancer* 2014; 13(86).
146. Li J, Du L, Yang Y, Wang C, Liu H, Wang L et al. MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2. *Cancer Lett* 2013; 329(1): 84-90.
147. Chen J, Wang Y, Zhuo L, Liu Z, Liu T, Li W et al. Fas signaling induces stemness properties in colorectal cancer by regulation of Bmi1. *Mol Carcinog* 2017; 56(10): 2267-2278.
148. Li Y, Sun Z, Liu B, Shan Y, Zhao L, Jia L. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2017; 8(6): e2892.
149. Laudato S, Patil N, Abba ML, Leupold JH, Benner A, Gaiser T et al. P53-induced miR-30e-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ITGA6 and ITGB1. *Int J Cancer* 2017; 141(9): 1879-1890.
150. Pecqueux M, Liebetrau I, Werft W, Dienemann H, Muley T, Pfannschmidt J et al. A Comprehensive MicroRNA Expression Profile of Liver and Lung Metastases of Colorectal Cancer with Their Corresponding Host Tissue and Its Prognostic Impact on Survival. *Int J Mol Sci* 2016; 17(10).
151. Li J, Chen Y, Guo X, Zhou L, Jia Z, Tang Y et al. Inhibition of miR-15b decreases cell migration and metastasis in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(7): 8765-8773.
152. Park YR, Kim SL, Lee MR, Seo SY, Lee JH, Kim SH et al. MicroRNA-30a-5p (miR-30a) regulates cell motility and EMT by directly targeting oncogenic TM4SF1 in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017; 143(10): 1915-1927.
153. Wang X, Ding X, Nan L, Wang Y, Wang J, Yan Z et al. Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis. *Oncol Rep* 2015; 33(5): 2445-2453.
154. Xie T, Huang M, Wang Y, Wang L, Chen C, Chu X. MicroRNAs as Regulators, Biomarkers and Therapeutic Targets in the Drug Resistance of Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2016; 40(1-2): 62-76.
155. Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56(3): 248-253.
156. Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W et al. 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncol Rep* 2010; 23(1): 121-128.
157. Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L. Role of microRNA in anticancer drug resistance. *Int J Cancer* 2010; 126(1): 2-10.

158. Garajová I, Ferracin M, Porcellini E, Palloni A, Abbati F, Biasco G et al. Non-Coding RNAs as Predictive Biomarkers to Current Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7).
159. Gherman A, Balacescu L, Gheorghe-Cetean S, Vlad C, Balacescu O, Irimie A et al. Current and New Predictors for Treatment Response in Metastatic Colorectal Cancer. The Role of Circulating miRNAs as Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2020; 21(6).
160. Cappuzzo F, Sacconi A, Landi L, Ludovini V, Biagioni F, D'incecco A et al. MicroRNA signature in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies. *Clin Colorectal Cancer* 2014; 13(1): 37-45.e34.
161. Pichler M, Winter E, Röss AL, Bauernhofer T, Gerger A, Kiesslich T et al. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor. *J Clin Pathol* 2014; 67(3): 198-203.
162. Mosakhani N, Lahti L, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundström J, Ristamäki R et al. MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genet* 2012; 205(11): 545-551.
163. Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S et al. Association of MicroRNA-31-5p with Clinical Efficacy of Anti-EGFR Therapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(8): 2640-2648.
164. Manceau G, Imbeaud S, Thiébaud R, Liébaert F, Fontaine K, Rousseau F et al. Hsa-miR-31-3p expression is linked to progression-free survival in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20(12): 3338-3347.
165. Pugh S, Thiébaud R, Bridgewater J, Grisoni ML, Moutasim K, Rousseau F et al. Association between miR-31-3p expression and cetuximab efficacy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a post-hoc analysis of the New EPOC trial. *Oncotarget* 2017; 8(55): 93856-93866.
166. Laurent-Puig P, Grisoni ML, Heinemann V, Liébaert F, Neureiter D, Jung A et al. Validation of miR-31-3p Expression to Predict Cetuximab Efficacy When Used as First-Line Treatment in. *Clin Cancer Res* 2019; 25(1): 134-141.
167. Boisen MK, Dehlendorff C, Linnemann D, Nielsen BS, Larsen JS, Osterlind K et al. Tissue microRNAs as predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first line Capecitabine and Oxaliplatin with or without Bevacizumab. *PLoS One* 2014; 9(10): e109430.
168. Chen DL, Wang ZQ, Zeng ZL, Wu WJ, Zhang DS, Luo HY et al. Identification of microRNA-214 as a negative regulator of colorectal cancer liver metastasis by way of regulation of fibroblast growth factor receptor 1 expression. *Hepatology* 2014; 60(2): 598-609.
169. Lou X, Qi X, Zhang Y, Long H, Yang J. Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2013; 108(4): 230-235.
170. Iino I, Kikuchi H, Miyazaki S, Hiramatsu Y, Ohta M, Kamiya K et al. Effect of miR-122 and its target gene cationic amino acid transporter 1 on colorectal liver metastasis. *Cancer Sci* 2013; 104(5): 624-630.
171. Stiegelbauer V, Vychytilova-Faltejskova P, Karbiener M, Pehserl AM, Reicher A, Resel M et al. miR-196b-5p Regulates Colorectal Cancer Cell Migration and Metastases through Interaction with HOXB7 and GALNT5. *Clin Cancer Res* 2017; 23(17): 5255-5266.
172. Matsuzaki J, Ochiya T. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review. *Int J Clin Oncol* 2017; 22(3): 413-420.
173. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1733-1741.
174. Zen K, Zhang CY. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 2012; 32(2): 326-348.
175. Rapado-González Ó, Álvarez-Castro A, López-López R, Iglesias-Canle J, Suárez-Cunqueiro MM, Muínelo-Romay L. Circulating microRNAs as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2019; 11(7).

176. Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, Tsujimoto G. miRNAs and regulation of cell signaling. *FEBS J* 2011; 278(10): 1610-1618.
177. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(4): 252-263.
178. Bowen T, Jenkins RH, Fraser DJ. MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis. *J Pathol* 2013; 229(2): 274-285.
179. Guo L, Zhang Y, Zhang L, Huang F, Li J, Wang S. MicroRNAs, TGF- $\beta$  signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(1): 115-125.
180. Chen W, Zhou S, Mao L, Zhang H, Sun D, Zhang J et al. Crosstalk between TGF- $\beta$  signaling and miRNAs in breast cancer metastasis. *Tumour Biol* 2016; 37(8): 10011-10019.
181. Kang H. Role of MicroRNAs in TGF- $\beta$  Signaling Pathway-Mediated Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci* 2017; 18(12).
182. Gulei D, Mehterov N, Ling H, Stanta G, Braicu C, Berindan-Neagoe I. The "good-cop bad-cop" TGF-beta role in breast cancer modulated by non-coding RNAs. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; 1861(7): 1661-1675.
183. Janakiraman H, House RP, Gangaraju VK, Diehl JA, Howe PH, Palanisamy V. The Long (lncRNA) and Short (miRNA) of It: TGF $\beta$ -Mediated Control of RNA-Binding Proteins and Noncoding RNAs. *Mol Cancer Res* 2018; 16(4): 567-579.
184. Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A. Crosstalk between TGF- $\beta$  signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33(7): 382-393.
185. Suzuki HI. MicroRNA Control of TGF- $\beta$  Signaling. *Int J Mol Sci* 2018; 19(7).
186. Han M, Wang F, Gu Y, Pei X, Guo G, Yu C et al. MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF- $\beta$  pathways. *Oncol Rep* 2016; 35(1): 73-80.
187. Zhang R, Wang M, Sui P, Ding L, Yang Q. Upregulation of microRNA-574-3p in a human gastric cancer cell line AGS by TGF- $\beta$ 1. *Gene* 2017; 605(63-69).
188. Fang C, Dai CY, Mei Z, Jiang MJ, Gu DN, Huang Q et al. microRNA-193a stimulates pancreatic cancer cell repopulation and metastasis through modulating TGF- $\beta$ 2/TGF- $\beta$ RIII signalings. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37(1): 25.
189. Soleimani A, Khazaei M, Ferns GA, Ryzhikov M, Avan A, Hassanian SM. Role of TGF- $\beta$  signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Cell Physiol* 2019.
190. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 2015; 12(8): 697.
191. Ikehata M, Ogawa M, Yamada Y, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S. Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2013; 37(1): 67-73.
192. Lu JF, Bruno R, Eppler S, Novotny W, Lum B, Gaudreault J. Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62(5): 779-786.
193. Zhi J, Chen E, Major P, Burns I, Robinson B, Mckendrick J et al. A multicenter, randomized, open-label study to assess the steady-state pharmacokinetics of bevacizumab given with either XELOX or FOLFOX-4 in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68(5): 1199-1206.
194. Liston DR, Davis M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin Cancer Res* 2017; 23(14): 3489-3498.
195. Eckrich J, Kugler P, Buhr CR, Ernst BP, Mendler S, Baumgart J et al. Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Sci Rep* 2020; 10(1): 18585.
196. Feldman J, Goldwasser R, Mark S, Schwartz J, Orion I. A mathematical model for tumor volume evaluation using two-dimensions. *J Appl Quant Methods* 2009; 4(4): 455-462.
197. Schliekelman MJ, Taguchi A, Zhu J, Dai X, Rodriguez J, Celiktas M et al. Molecular portraits of epithelial, mesenchymal, and hybrid States in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer Res* 2015; 75(9): 1789-1800.

198. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45(2): 228-247.
199. Ulivi P, Canale M, Passardi A, Marisi G, Valgiusti M, Frassinetti GL et al. Circulating Plasma Levels of miR-20b, miR-29b and miR-155 as Predictors of Bevacizumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2018; 19(1).
200. Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 2008; 68(20): 8191-8194.
201. Mestdagh P, Boström AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P et al. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- $\beta$  pathway in neuroblastoma. *Mol Cell* 2010; 40(5): 762-773.
202. Dews M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY et al. The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res* 2010; 70(20): 8233-8246.
203. Meng WJ, Yang L, Ma Q, Zhang H, Adell G, Arbman G et al. MicroRNA Expression Profile Reveals miR-17-92 and miR-143-145 Cluster in Synchronous Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(32): e1297.
204. Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9(374).
205. Pellatt DF, Stevens JR, Wolff RK, Mullany LE, Herrick JS, Samowitz W et al. Expression Profiles of miRNA Subsets Distinguish Human Colorectal Carcinoma and Normal Colonic Mucosa. *Clin Transl Gastroenterol* 2016; 7(e152).
206. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299(4): 425-436.
207. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21(11): 1350-1356.
208. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976; 36(12): 4562-4569.
209. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer* 2017; 16(1): 116.
210. Linnekamp JF, Hooff SRV, Prasetyanti PR, Kandimalla R, Buikhuisen JY, Fessler E et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death Differ* 2018; 25(3): 616-633.
211. Hara J, Miyata H, Yamasaki M, Sugimura K, Takahashi T, Kurokawa Y et al. Mesenchymal phenotype after chemotherapy is associated with chemoresistance and poor clinical outcome in esophageal cancer. *Oncol Rep* 2013; 31(2): 589-596.
212. Yu X, Li Z, Yu J, Chan MT, Wu WK. MicroRNAs predict and modulate responses to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Prolif* 2015; 48(5): 503-510.
213. Li H, Yang BB. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(7): 870-879.
214. Yu Y, Sarkar FH, Majumdar AP. Down-regulation of miR-21 Induces Differentiation of Chemoresistant Colon Cancer Cells and Enhances Susceptibility to Therapeutic Regimens. *Transl Oncol* 2013; 6(2): 180-186.
215. Faltejiskova P, Besse A, Sevcikova S, Kubiczkova L, Svoboda M, Smarda J et al. Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27(11): 1401-1408.
216. Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K et al. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol* 2012; 47(8): 883-895.

217. Quan Q, Zhong F, Wang X, Chen K, Guo L. PAR2 Inhibition Enhanced the Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to 5-FU and Reduced EMT Signaling. *Oncol Res* 2019; 27(7): 779-788.
218. Robinson SM, Mann DA, Manas DM, Oakley F, Mann J, White SA. The potential contribution of tumour-related factors to the development of FOLFOX-induced sinusoidal obstruction syndrome. *Br J Cancer* 2013; 109(9): 2396-2403.
219. Wang H, Nie L, Wu L, Liu Q, Guo X. NR2F2 inhibits Smad7 expression and promotes TGF- $\beta$ -dependent epithelial-mesenchymal transition of CRC via transactivation of miR-21. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485(1): 181-188.
220. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998; 78(8): 986-992.
221. Roh SA, Choi EY, Cho DH, Yoon YS, Kim TW, Kim YS et al. Characterization of biological responses of colorectal cancer cells to anticancer regimens. *J Korean Surg Soc* 2012; 83(1): 21-29.
222. Gourdiere I, Del Rio M, Crabbé L, Candeil L, Copois V, Ychou M et al. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett* 2002; 529(2-3): 232-236.
223. George JT, Jolly MK, Xu S, Somarelli JA, Levine H. Survival Outcomes in Cancer Patients Predicted by a Partial EMT Gene Expression Scoring Metric. *Cancer Res* 2017; 77(22): 6415-6428.
224. Matsuda Y, Miura K, Yamane J, Shima H, Fujibuchi W, Ishida K et al. SERPINI1 regulates epithelial-mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer. *Cancer Sci* 2016; 107(5): 619-628.
225. Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY et al. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 2014; 6(10): 1279-1293.
226. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *International Biological and Biomedical Journal* 2017; 3(3): 105-111.
227. Vuletic I, Zhou K, Li H, Bai H, Meng X, Zhu S et al. Validation of Bevacizumab Therapy Effect on Colon Cancer Subtypes by Using Whole Body Imaging in Mice. *Mol Imaging Biol* 2017; 19(6): 847-856.
228. Hein M, Graver S. Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. *Cancer Cell Int* 2013; 13(1): 94.
229. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 330-338.
230. Yusefi M, Shameli K, Jahangirian H, Teow SY, Umakoshi H, Saleh B et al. The Potential Anticancer Activity of 5-Fluorouracil Loaded in Cellulose Fibers Isolated from Rice Straw. *Int J Nanomedicine* 2020; 15(5417-5432).
231. Tang Q, Zou Z, Zou C, Zhang Q, Huang R, Guan X et al. MicroRNA-93 suppress colorectal cancer development via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway downregulating. *Tumour Biol* 2014; 36(3): 1701-1710.
232. Al-Mutairi FF, Baru R, Ramalingam S, Ahmad A, Charan HK, Vijayan V et al. Global MicroRNA Profiling of Human Lung Cancer Cell Lines Using Bevacizumab. *Trends in Biosciences* 2017; 10(12): 2266-2268.
233. Lindholm EM, Ragle Aure M, Haugen MH, Kleivi Sahlberg K, Kristensen VN, Nebdal D et al. miRNA expression changes during the course of neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy treatment in breast cancer. *Mol Oncol* 2019; 13(10): 2278-2296.
234. Despotovic J, Dragicevic S, Nikolic A. Effects of Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer on the TGF-beta Signaling and Related miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p and hsa-miR-93-5p. *Cell Biochem Biophys* 2021; 79(4): 757-767.
235. Long L, Huang G, Zhu H, Guo Y, Liu Y, Huo J. Down-regulation of miR-138 promotes colorectal cancer metastasis via directly targeting TWIST2. *J Transl Med* 2013; 11(275).



236. Zhang Y, He X, Liu Y, Ye Y, Zhang H, He P et al. microRNA-320a inhibits tumor invasion by targeting neuropilin 1 and is associated with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2011; 27(3): 685-694.
237. Kulda V, Pesta M, Topolcan O, Liska V, Treska V, Sutnar A et al. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 200(2): 154-160.
238. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007; 8(166).
239. Drusco A, Nuovo GJ, Zanesi N, Di Leva G, Pichiorri F, Volinia S et al. MicroRNA profiles discriminate among colon cancer metastasis. *PLoS One* 2014; 9(6): e96670.
240. Xiao ZG, Deng ZS, Zhang YD, Zhang Y, Huang ZC. Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25(3): 296-301.
241. Chen YL, Wang GX, Lin BA, Huang JS. MicroRNA-93-5p expression in tumor tissue and its tumor suppressor function via targeting programmed death ligand-1 in colorectal cancer. *Cell Biol Int* 2020; 44(5): 1224-1236.
242. Pesta M, Kucera R, Topolcan O, Karlikova M, Houfkova K, Polivka J et al. Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)* 2019; 11(6).
243. Wang LG, Gu J. Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis. *Cancer Epidemiol* 2011; 36(1): e61-67.
244. Gmerek L, Martyniak K, Horbacka K, Krokowicz P, Scierski W, Golusinski P et al. MicroRNA regulation in colorectal cancer tissue and serum. *PLoS One* 2019; 14(8): e0222013.
245. To KK, Tong CW, Wu M, Cho WC. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol* 2018; 24(27): 2949-2973.
246. Rasmussen MH, Jensen NF, Tarpgaard LS, Qvortrup C, Rømer MU, Stenvang J et al. High expression of microRNA-625-3p is associated with poor response to first-line oxaliplatin based treatment of metastatic colorectal cancer. *Mol Oncol* 2013; 7(3): 637-646.
247. Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Mimori K. MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2017; 9(9).
248. Yang IP, Tsai HL, Hou MF, Chen KC, Tsai PC, Huang SW et al. MicroRNA-93 inhibits tumor growth and early relapse of human colorectal cancer by affecting genes involved in the cell cycle. *Carcinogenesis* 2012; 33(8): 1522-1530.
249. Yang IP, Tsai HL, Miao ZF, Huang CW, Kuo CH, Wu JY et al. Development of a deregulating microRNA panel for the detection of early relapse in postoperative colorectal cancer patients. *J Transl Med* 2016; 14(1): 108.
250. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat* 2010; 13(4-5): 109-118.
251. Chu S, Liu G, Xia P, Chen G, Shi F, Yi T et al. miR-93 and PTEN: Key regulators of doxorubicin-resistance and EMT in breast cancer. *Oncol Rep* 2017; 38(4): 2401-2407.
252. Bao C, Chen J, Chen D, Lu Y, Lou W, Ding B et al. MiR-93 suppresses tumorigenesis and enhances chemosensitivity of breast cancer via dual targeting E2F1 and CCND1. *Cell Death Dis* 2020; 11(8): 618.
253. Wang Q, Su C, Li J, Wei C. Mechanism of the enhancing effects of miR-93 on resistance of breast cancer MCF-7 cells to adriamycin. *Oncol Lett* 2018; 16(3): 3779-3783.
254. Chen Q, Qin R, Fang Y, Li H. Berberine Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to Cisplatin Through miR-93/PTEN/Akt Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36(3): 956-965.
255. Fu X, Tian J, Zhang L, Chen Y, Hao Q. Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 2012; 586(9): 1279-1286.

256. Hu B, Mao Z, Du Q, Jiang X, Wang Z, Xiao Z et al. miR-93-5p targets Smad7 to regulate the transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad3 pathway and mediate fibrosis in drug-resistant prolactinoma. *Brain Res Bull* 2019; 149(21-31).
257. Wu Y, Xu W, Yang Y, Zhang Z. miRNA-93-5p Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer Cells by Targeting the PTEN-Mediated PI3K/Akt Signaling Pathway. *Ann Clin Lab Sci* 2021; 51(3): 310-320.
258. Wang SJ, Cao YF, Yang ZQ, Jiang ZY, Cai B, Guo J et al. MicroRNA-93-5p increases multidrug resistance in human colorectal carcinoma cells by downregulating cyclin dependent kinase inhibitor 1A gene expression. *Oncol Lett* 2017; 13(2): 722-730.
259. Marjaneh RM, Khazaei M, Ferns GA, Avan A, Aghaee-Bakhtiari SH. The role of microRNAs in 5-FU resistance of colorectal cancer: Possible mechanisms. *J Cell Physiol* 2019; 234(3): 2306-2316.
260. Chai J, Dong W, Xie C, Wang L, Han DL, Wang S et al. MicroRNA-494 sensitizes colon cancer cells to fluorouracil through regulation of DPYD. *IUBMB Life* 2015; 67(3): 191-201.
261. Ruihua H, Mengyi Z, Chong Z, Meng Q, Xin M, Qiulin T et al. RhoA regulates resistance to irinotecan by regulating membrane transporter and apoptosis signaling in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7(52): 87136-87146.
262. Fischel JL, Rostagno P, Formento P, Dubreuil A, Etienne MC, Milano G. Ternary combination of irinotecan, fluorouracil-folinic acid and oxaliplatin: results on human colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 2001; 84(4): 579-585.
263. Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Grivicich I, Garcia-Santos D, Chies JA et al. 5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J Appl Toxicol* 2009; 29(4): 308-316.
264. Mans DR, Grivicich I, Peters GJ, Schwartzmann G. Sequence-dependent growth inhibition and DNA damage formation by the irinotecan-5-fluorouracil combination in human colon carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 1999; 35(13): 1851-1861.
265. González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, De La Cueva A, Vargas T, Santoyo S et al. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol Res* 2013; 72(61-68).
266. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F, Liang H. Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011(740564).
267. Shen L, Yu M, Xu X, Gao L, Ni J, Luo Z et al. Knockdown of  $\beta$ 3GnT8 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells via inhibition the biosynthesis of poly lactosamine-type N-glycans. *Int J Oncol* 2014; 45(6): 2560-2568.
268. McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol* 2014; 4(40).
269. Liu Y, Mi Y, Mueller T, Kreibich S, Williams EG, Van Drogen A et al. Multi-omic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories. *Nat Biotechnol* 2019; 37(3): 314-322.
270. Vargas-Accarino E, Herrera-Montávez C, Ramón Y Cajal S, Aasen T. Spontaneous Cell Detachment and Reattachment in Cancer Cell Lines: An In Vitro Model of Metastasis and Malignancy. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9).
271. Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW et al. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- $\beta$ 8. *Oncogene* 2010; 30(7): 806-821.
272. Lyu X, Fang W, Cai L, Zheng H, Ye Y, Zhang L et al. TGF $\beta$ R2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness. *Mol Cancer* 2014; 13(51).
273. Yang W, Bai J, Liu D, Wang S, Zhao N, Che R et al. MiR-93-5p up-regulation is involved in non-small cell lung cancer cells proliferation and migration and poor prognosis. *Gene* 2018; 647(13-20).

274. Liu MX, Liao J, Xie M, Gao ZK, Wang XH, Zhang Y et al. miR-93-5p Transferred by Exosomes Promotes the Proliferation of Esophageal Cancer Cells via Intercellular Communication by Targeting PTEN. *Biomed Environ Sci* 2018; 31(3): 171-185.
275. Li J, Chu ZP, Han H, Zhang Y, Tian F, Zhang JQ et al. Suppression of miR-93-5p inhibits high-risk HPV-positive cervical cancer progression via targeting of BTG3. *Hum Cell* 2019; 32(2): 160-171.
276. Sun XY, Han XM, Zhao XL, Cheng XM, Zhang Y. MiR-93-5p promotes cervical cancer progression by targeting THBS2/MMPS signal pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(12): 5113-5121.
277. Li L, Zhao J, Huang S, Wang Y, Zhu L, Cao Y et al. MiR-93-5p promotes gastric cancer-cell progression via inactivation of the Hippo signaling pathway. *Gene* 2018; 641(240-247).
278. Wu H, Liu L, Zhu JM. MiR-93-5p inhibited proliferation and metastasis of glioma cells by targeting MMP2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(21): 9517-9524.
279. Yu XF, Zou J, Bao ZJ, Dong J. miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17(42): 4711-4717.
280. Liu Y, Chen X, Liu J, Gu H, Fan R, Ge H. Long non-coding RNA HOTAIR knockdown enhances radiosensitivity through regulating microRNA-93/ATG12 axis in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2020; 11(3): 175.
281. Gu M, Jiang Z, Li H, Peng J, Chen X, Tang M. MiR-93/HMGB3 regulatory axis exerts tumor suppressive effects in colorectal carcinoma cells. *Exp Mol Pathol* 2021; 120(104635).
282. Guo Y, Pang Y, Gao X, Zhao M, Zhang X, Zhang H et al. MicroRNA-137 chemosensitizes colon cancer cells to the chemotherapeutic drug oxaliplatin (OXA) by targeting YBX1. *Cancer Biomark* 2017; 18(1): 1-9.
283. Fabbri E, Montagner G, Bianchi N, Finotti A, Borgatti M, Lampronti I et al. MicroRNA miR-93-5p regulates expression of IL-8 and VEGF in neuroblastoma SK-N-AS cells. *Oncol Rep* 2016; 35(5): 2866-2872.
284. Ma DH, Li BS, Liu JJ, Xiao YF, Yong X, Wang SM et al. miR-93-5p/IFNAR1 axis promotes gastric cancer metastasis through activating the STAT3 signaling pathway. *Cancer Lett* 2017; 408(23-32).
285. Zhang S, He Y, Liu C, Li G, Lu S, Jing Q et al. miR-93-5p enhances migration and invasion by targeting RGMB in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cancer* 2020; 11(13): 3871-3881.
286. Shi X, Liu TT, Yu XN, Balakrishnan A, Zhu HR, Guo HY et al. microRNA-93-5p promotes hepatocellular carcinoma progression via a microRNA-93-5p/MAP3K2/c-Jun positive feedback circuit. *Oncogene* 2020; 39(35): 5768-5781.
287. Cai Y, Ruan W, Ding J, Wei N, Wang J, Zhang H et al. miR-93-5p regulates the occurrence and development of esophageal carcinoma epithelial cells by targeting TGF $\beta$ R2. *Int J Mol Med* 2021; 47(3).
288. Liang L, Zhao L, Zan Y, Zhu Q, Ren J, Zhao X. MiR-93-5p enhances growth and angiogenesis capacity of HUVECs by down-regulating EPLIN. *Oncotarget* 2017; 8(63): 107033-107043.
289. Fang L, Du WW, Yang W, Rutnam ZJ, Peng C, Li H et al. MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle* 2012; 11(23): 4352-4365.
290. An G, Lu F, Huang S, Bai J, He L, Liu Y et al. Effects of miR-93 on epithelial-to-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer cells. *Mol Med Rep* 2021; 23(1).
291. Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Massa A, Baldini N. Extracellular Nanovesicles Secreted by Human Osteosarcoma Cells Promote Angiogenesis. *Cancers (Basel)* 2019; 11(6).
292. Qian Q, Sun W, Zhu W, Liu Y, Ge A, Ma Y et al. The role of microRNA-93 regulating angiopoietin2 in the formation of malignant pleural effusion. *Cancer Med* 2017; 6(5): 1036-1048.
293. Chen X, Chen S, Xiu YL, Sun KX, Zong ZH, Zhao Y. RhoC is a major target of microRNA-93-5P in epithelial ovarian carcinoma tumorigenesis and progression. *Mol Cancer* 2015; 14(31).

294. Kunz P, Schenker A, Sähr H, Lehner B, Fellenberg J. Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable in vivo model for the analysis of osteosarcoma. *PLoS One* 2019; 14(4): e0215312.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jovana Despotović je rođena 4. marta 1991. godine u Beogradu. Studijsku grupu Molekularna biologija i fiziologija na Biološkom fakultetu (BF) Univerziteta u Beogradu (UB) je upisala školske 2010/2011. godine. Osnovne akademske studije je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,76. Master studije na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija i modulu Humana molekularna biologija, upisane školske 2014/2015. godine na BF UB, završila je 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,83. Master rad pod naslovom: „Analiza efekta povećane ekspresije gena SOX3 na karakteristike U87 i U251 ćelijskih linija glioblastoma“, pod mentorstvom dr Danijele Drakulić urađen u Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), UB odbranila je sa ocenom 10. Doktorske studije na studijskom programu Molekularna biologija, BF UB je upisala 2015/2016. godine, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 10,00. Jovana se u martu 2016. godine zaposlila kao istraživač-pripravnik u Laboratoriji za molekularnu biologiju IMGGI, UB, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (173008) pod rukovodstvom dr Dragice Radojković. Zvanje istraživač-saradnik stiže u februaru 2021. godine. Član je Srpskog društva za molekularnu biologiju, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva istraživača raka, Evropske asocijacije za istraživanje raka (eng. *European Association for Cancer Research*) i Federacije evropskih biohemijskih društava (eng. *Federation of European Biochemical Societies*). Jovana Despotović je do sada učestvovala kao autor/koautor na 7 radova u međunarodnim časopisima, ima 14 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 2 saopštenja na skupu nacionalnog značaja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Деспотовић

Број индекса М3003/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога микроРНК укључених у регулацију TGF $\beta$  сигналног пута у метастатском

колоректалном карциному - функционална анализа и одговор на терапију

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 20.01.2022.

---

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора           Јована Деспотовић          

Број индекса                   М3003/2015                  

Студијски програм           Молекуларна биологија          

Наслов рада           Улога микроРНК укључених у регулацију TGF $\beta$  сигналног пута          

          у метастатском колоректалном карциному - функционална анализа и одговор          

          на терапију          

Ментор           др Александра Николић и др Катарина Зељић          

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 20.01.2022.

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Улога микроРНК укључених у регулацију TGF $\beta$  сигналног пута у метастатском

---

колоректалном карциному - функционална анализа и одговор на терапију

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 20.01.2022.

---



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.