

miRNA REMODELACIJA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA

Pejić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:494477>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-10**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Ana Pejić

miRNA REMODELACIJA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA

Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Ana Pejić

miRNA REMODELACIJA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA

Završni rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate programme
„Biotechnology and drug research“

Ana Pejić

miRNA REMODELING OF THE TUMOR MICROENVIRONMENT

Bachelor thesis

Rijeka, 2022.

Završni rad obranjen je dana 27. srpnja 2022.

pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj (mentor)

2. izv. prof. dr. sc. Jelena Ban

3. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Rad ima 36 stranica, 11 slika i 31 literaturni navod.

SAŽETAK

Tumor je nakupina stanica koje imaju nekontroliran rast. Tumor nastaje tumorogenezom, složenim procesom pretvorbe normalnih stanica u tumorske u uvjetima hipoksije. Tumori se mogu podijeliti na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne). Na proliferaciju i progresiju malignog tumora ne utječu samo tumorske stanice, nego i stanice koje se nalaze u tumorskom mikrookolišu (TME), a bitnu ulogu u razvoju imaju i microRNA (miRNA). Postoje dvije glavne podjele miRNA koje sudjeluju u metabolizmu tumora, onkomiR i anti-onkomiR. OnkomiR su miRNA koje mogu transformirati normalne stanice u tumorske, a anti-onkomiR mogu spriječiti transformaciju u tumorske stanice. miRNA se mogu smatrati ključnim elementom koji utječe na stanice TME jer sudjeluju u regulaciji genske ekspresije i na taj način mijenjaju TME i potiču lučenje citokina. Dugogodišnja istraživanja lijekova za tumore još uvijek nisu dala očekivane rezultate te su potrebna daljnja istraživanja i razumijevanje mehanizama koji pogoduju inicijaciji i progresiji tumora. Budući da je deregulacija miRNA povezana s razvojem i napredovanjem raka, cirkulirajuće miRNA razmatraju se kao novi, minimalno invazivni biomarkeri te su potencijalna terapijska meta jer je dokazana mogućnost njihove manipulacije. Kako bi se miRNA mogle uspješno koristiti kao terapeutici potrebno je premostiti izazov isporuke miRNA u ciljana tkiva.

Ključne riječi

Tumor

miRNA

tumorski mikrookoliš

ABSTRACT

A tumor is a mass of abnormal cells that have uncontrolled growth. The tumor is formed by tumorigenesis, a complex process of converting normal cells into tumor cells under conditions of hypoxia. Tumors can be divided into benign and malignant. The proliferation and progression of a malignant tumor is influenced not only by tumor cells, but also by cells located in the tumor microenvironment (TME), and microRNA (miRNA) also plays an important role in its development. There are two main divisions of miRNAs involved in tumor metabolism, oncomiR and anti-oncomiR. OncomiR are miRNAs that can transform normal cells into tumor cells, and anti-oncomiR can prevent transformation into tumor cells. miRNAs can be considered a key element that affects TMEs cells because they participate in the regulation of gene expression and thus alter TMEs and stimulate the secretion of cytokines. Many years of research into tumor drugs have not yet given the expected results, so further research and understanding of the mechanisms conducive to tumor initiation and progression is needed. Because deregulation of miRNAs is associated with cancer development and progression, circulating miRNAs are considered a new, minimally invasive biomarker and are a potential therapeutic target because the possibility for their manipulation has been proven. In order for miRNA to be used successfully as a therapeutic, it is necessary to bridge the challenge of delivering miRNA to target tissues.

Key words

Tumor

miRNA

tumor microenvironment

Sadržaj

1. UVOD	1
2. SVRHA RADA	3
3. LITERATURNI PREGLED	4
3.1. Što je tumor?	4
3.2. Tumorski mikrookoliš	6
3.2.1. Imunosne stanice	8
3.2.2. Fibroblasti povezani s rakom	12
3.2.3. Stromalne stanice	13
3.2.4. Izvanstanični matriks.....	14
3.3. Egzosomi	14
3.4. miRNA	18
3.4.1. Uloga miRNA u regulaciji tumorskih makrofaga	21
3.4.2. Uloga miRNA u regulaciji T stanica	22
3.4.3. Uloga miRNA u regulaciji endotelnih stanica	22
3.5. Uloga miRNA dobivene iz TME u regulaciji progresije tumora	23
3.6. miRNA-mRNA interakcije	24
3.7. Dijagnostika	25
3.8. Terapijski pristup	27
4. RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČAK	31
6. LITERATURA	32
7. ŽIVOTOPIS	36

1. UVOD

Višestoljetna istraživanja tumora i pokušaji pronalaska pravog pristupa u liječenju dovela su do novih spoznaja o proliferaciji i progresiji tumora, ali i dalje nema očekivanog odgovora tumora na liječenje. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi došli do prikladnih terapijskih meta.

Tumor je novotvorina, odnosno nakupina stanica koje imaju nekontroliran rast. Obilježja tumora su nesvršishodnost (nema koristi za organizam), samostalnost, parazitizam (iskorištavanje organizma u kojem se nalazi) i nekontroliran rast. Mogu se podijeliti na dobroćudne (benigne) i na zloćudne (maligne) tumore. [1] U ovom radu osvrnut ću se na maligne tumore za koje je uvriježen izraz rak.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da inicijacija i progresija tumora nisu određene samo tumorskim stanicama nego i tumorskim mikrookolišem. Tumorski mikrookoliš (engl. *Tumor microenvironment*, TME) je složena cjelina različitih stanica koja se kontinuirano razvija i omogućuje progresiju tumoru. Sastav TME razlikuje se između različitih tipova tumora, ali za sve tipove karakteristične značajke su imunosne stanice (makrofagi, dendritičke stanice, neutrofili, NK stanice (engl. *Natural killer cells*, prirodno ubilačke stanice), T stanice, B stanice), stromalne stanice, krvne žile i izvanstanični matriks (engl. *Extracellular matrix*, ECM). Smatra se da je TME važan kao podrška za preživljavanje stanica tumora te za lokalnu invaziju i metastaziranje. [2]

Sve više dokaza ukazuje na to da mikroRNA (miRNA) ima ključnu ulogu u oblikovanju biologije i funkcije stromalnih stanica tumora, a time i utjecaj na oblikovanje mikrookoliša i dinamiku kojom će se tumor razvijati. Deregulacije miRNA povezana je sa gotovo svim aspektima inicijacije i progresije tumora. [3] Deregulacija profila ekspresije miRNA dokazana je u većini ispitanih tumora. [4] U istraživanju iz 2006. godine (Volinia i sur.) pokazano je da su ciljevi dereguliranih miRNA klasični onkogeni ili tumor

supresorski geni. [3] Neodgovarajuća ekspresija miRNA koja regulira onkogene ili tumor supresorske gene može dovesti do razvoja tumora, a obitelji miRNA kao što su miR-15, miR-1 i let-7 često su povezane s progresijom tumora i metastaziranjem. [5] Onkogeni i tumor supresori su vrijedni pažnje jer imaju potencijal normalnu stanicu pretvorit u stanicu raka. [3] Specifične miRNA koje su sposobne transformirati normalne stanice u tumorske poznate su kao onkomiR. [5]

U ovom završnom radu provest ću literaturno pretraživanje i na osnovu toga pokušati opisati mehanizam djelovanja miRNA na remodelaciju TME, a time i na progresiju samog tumora. Objasnit ću potencijal miRNA u kliničkoj primjeni kao potencijalna klinička meta i biomarker.

2. SVRHA RADA

Cilj ovog završnog rada je pretraživanjem znanstvene literature objasniti utjecaj miRNA na rast i razvoj tumora, komunikaciju miRNA s mRNA i TME te utjecaj TME na sami tumor. Razumijevanje uloge miRNA u TME važno je za shvaćanje molekularnih mehanizama progresije tumora te za istraživanje novih terapijskih ciljeva. U ovom radu osvrnut ću se i na dijagnostičke potencijale miRNA. Svrha je razumijevanjem dosadašnjih otkrića unaprijediti znanje i doći do novih metoda liječenja kako bi postigli željeni odgovor tumora na terapije.

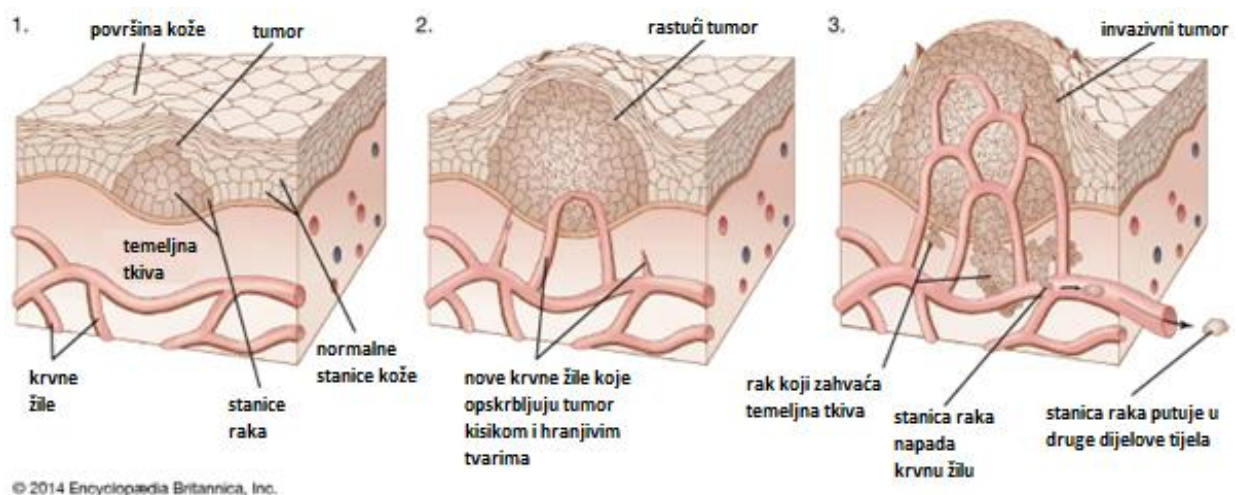
3. LITERATURNI PREGLED

3.1. Što je tumor?

Tumor (*lat. Tumor-oteklina*) je nakupina stanica koje imaju nekontroliran rast. Normalne stanice pretvaraju se u tumorske stanice složenim, postepenim i nerazjašnjenim procesom koji se naziva tumorogeneza. Glavna obilježja tumora su nesvrishodnost (nije koristan za organizam u kojem se nalazi, može biti štetan), parazitizam (iskorištava organizam u kojem se nalazi, dugoročno i iscrpljuje), samostalnost obzirom na organizam u kojem se nalazi (ne ovisi o fiziološkim nadzornim sustavima u organizmu) i neorganiziranost (tumorske stanice ne stvaraju nove organe ili normalna tkiva). [1] Stanice raka su sposobne proliferirati neovisno o signalima rasta, ne reagiraju na signale inhibicije rasta, izbjegavaju puteve programirane stanične smrti (apoptoze), prevladavaju granice unutarnje stanične replikacije, induciraju i održavaju angiogenezu (stvaranje novih krvnih žila) i stvaraju nove kolonije odvojeno od primarnog tumora. [4] Glavna podjela tumora je na zloćudne (maligne) i dobroćudne (benigne). O tome kakav je tumor ovisi kakve su prognoze bolesti i način liječenja. [1] Razvoj malignog tumora može se podijeliti na 4 koraka: inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje. [6] Neki tumori imaju poznate uzroke kao što su nasljedne promjene gena, onkogeni virusi i kancerogene tvari, a za druge tumore su pripisani čimbenici rizika kao što su dob, spol, način života, lijekovi, infekcije. Obzirom na vrstu tumora, liječenje se provodi kemoterapijom, kirurškim zahvatom ili zračenjem, a u slučaju benignog tumora liječenje se ne mora provoditi ukoliko tumor pacijentu ne smanjuje kvalitetu života. Stanice zloćudnog tumora mogu se proširiti krvlju ili limfom do drugog mjesta u tijelu, taj proces naziva se metastaziranje i odvija se u odmaklom stadiju tumora. [1] Geni povezani s razvojem raka okarakterizirani su kao onkogeni i tumor supresori. Onkogeni produkti mogu se kategorizirati u šest skupina na temelju njihove funkcije: mogu biti transkripcijski čimbenici, faktori rasta, remodelatori kromatina, regulatori

apoptoze ili transduktori signala. Prekomjerna ekspresija ovih genskih produkata daje selektivne prednosti rasta koje mogu potaknuti razvoj tumora. Onkogeni se mogu aktivirati genetskim promjenama koje pojačavaju gen, mijenjaju promotore/pojačivače za povećanje ekspresije gena ili mijenjaju strukturu proteina u trajno aktivno stanje. Suprotno tome produkti gena za supresiju tumora imaju regulatornu ulogu u biološkim procesima. Gubitak ili smanjenje funkcije tumor supresora rezultira disregulacijom povezanom s nastankom raka. [4]

Na slici 1 prikazan je tumor, odnosno koje promjene stanice prolaze kako bi se tumorogenezom razvio tumor. Abnormalne stanice, koje općenito čine tumor, razlikuju se od normalnih stanica po tome što su u procesu tumorogeneze prošle jednu ili više sljedećih promjena: 1) hipertrofija ili povećanje veličine pojedinačnih stanica, 2) hiperplazija ili povećanje broja stanica unutar određene zone te 3) anaplazija ili regresija fizičkih karakteristika stanica prema primitivnijem tipu. Rast tumora tj. hiperplaziju omogućuje proces angiogeneze te na taj način nove krvne žile opskrbljuju tumor kisikom i nutrijentima za daljnju invaziju. Kada tumor zahvati okolna tkiva i krvne žile tada prelazi u fazu invazije i metastaziranja te se krvlju širi u ostale dijelove tijela. [21]



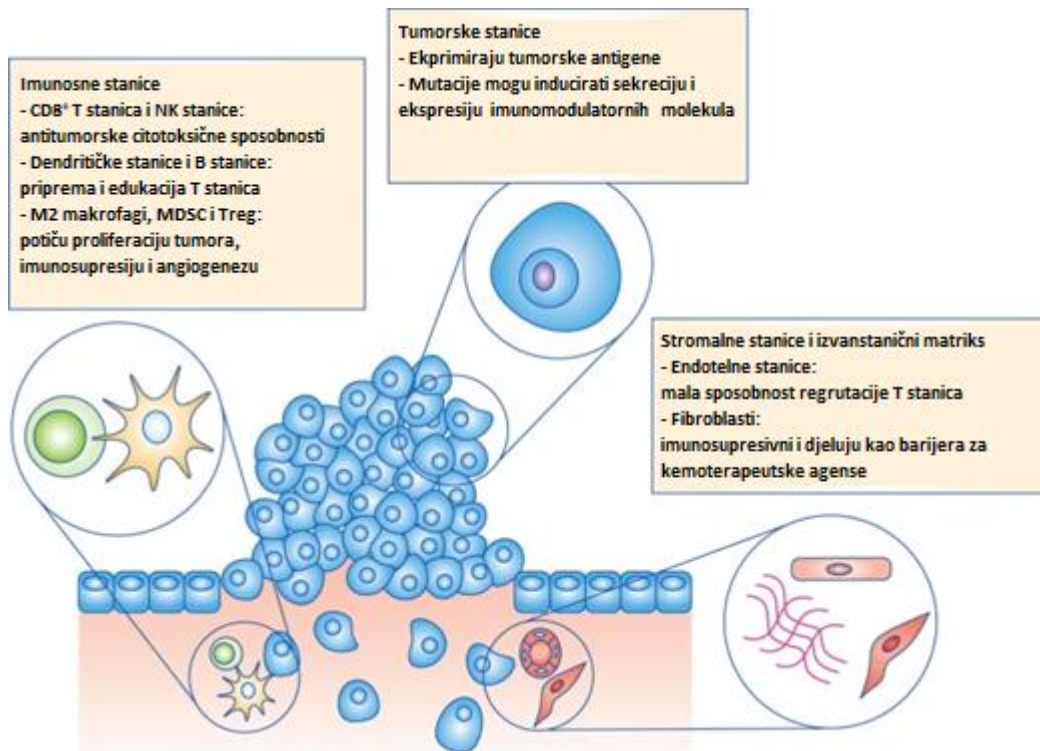
Slika (1). Proces tumorogeneze (prilagođeno prema <https://www.britannica.com/science/tumor>) [21]

Rast, preživljavanje i metastaziranje tumora ne bi bilo moguće bez prikladnog TME koji to omogućuje i koji omogućuje tumoru izbjegavanje imunskog sustava domaćina.

3.2. Tumorski mikrookoliš

Tumorski mikrookoliš odnosi se na staničnu okolinu u kojoj se nalazi tumor ili matične stanice raka. Matične stanice raka su stanice u tumoru koje imaju sposobnost samoobnavljanja i pokretanja tumorogeneze. TME obuhvaća okolne imunsko stanice (makrofage, dendritičke stanice, neutrofile, NK stanice, T stanice, B stanice), krvne žile, ECM, fibroblaste, limfocite i signalne molekule. [7]

Glavne stanice TME u imunskom kontekstu kod razvoja raka prikazane su na slici 2. Shema prikazuje tri glavne komponente u TME, imunsko stanice, tumorske stanice te stromalne stanice i ECM. Kod svake komponente naglašene su glavne uloge. Kod imunskih stanica $CD8^+$ T i NK stanice imaju antitumorske citotoksične sposobnosti, dendritičke stanice i B stanice pripremaju i educiraju T stanice, a M2 makrofagi, supresorske stanice koje su potekle iz mijeloidnog progenitora (engl. *Myeloid-derived suppressor cell*, MDSC) i Treg potiču proliferaciju tumora, imunosupresiju i angiogenezu. Tumorske stanice eksprimiraju tumorske antigene kako bi ih imunski sustav mogao prepoznati i reagirati na njih, mutacije tumorskih stanica mogu inducirati sekreciju i ekspresiju imunomodulatornih molekula te na taj način aktivirati ili suprimirati imunski sustav. U stromalnim stanicama i ECM glavne funkcije imaju endotelne stanice i fibroblasti. Endotelne stanice imaju slabe sposobnosti regrutacije T stanica. Fibroblasti imaju imunosupresivnu ulogu i djeluju kao barijera za kemoterapijske agense, a jedna od važnijih uloga fibroblasta je stvaranje kolagena. [22]



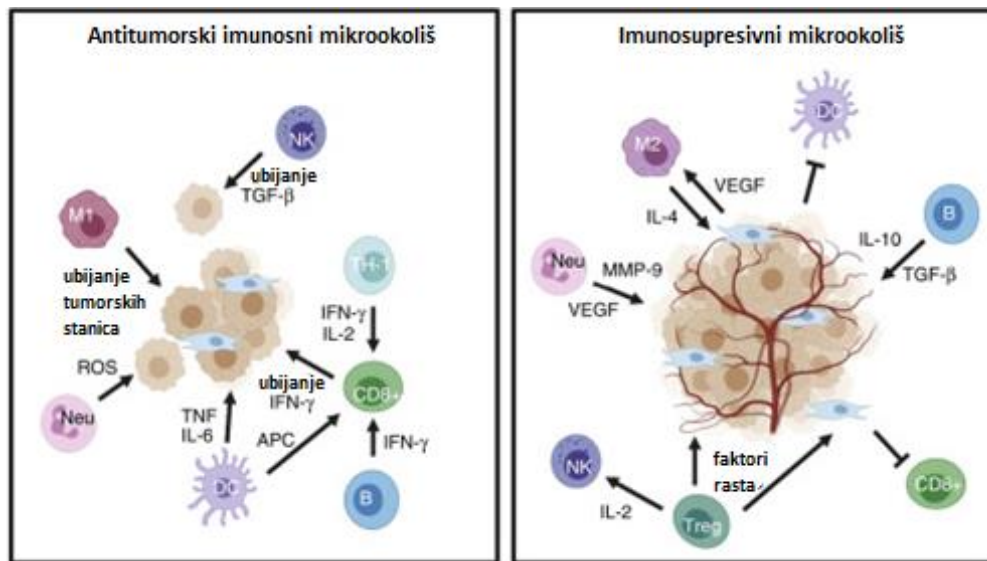
Slika (2). Tumorski mikrookoliš (TME) i imunosne uloge kod tumora (prilagođeno prema Giraldo, N.A., Sanchez-Salas, R., Peske, J.D. i sur.) [22]

S vremenom kako su se metode za proučavanje funkcija imunosnih stanica koje infiltriraju tkivo poboljšale, a time i proširilo razumijevanje njihovih interakcija s drugim stanicama, uloga TME u odvijanju razvoja stanica tumora postala je od značajne važnosti. Analiza staničnih interakcija u TME na temelju prirode, funkcije, gustoće i lokalizacije imunosnih stanica pokazala je da imunosne reakcije unutar mikrookoliša utječu na klinički ishod tumora.

Trenutne funkcije TME imaju velik utjecaj na progresiju tumora i preoblikovanje njegovog karaktera te imaju velik terapijski potencijal. [8]

Stanice unutar TME su u međusobnoj interakciji i u interakciji sa stanicama raka kako bi utjecale na razvoj i napredovanje tumora. U tom procesu utječu na invaziju stanica raka, rast tumora i metastaze. Prema dosadašnjim istraživanjima TME određuje toleranciju i odgovor domaćina na tumor. [10] Na slici 3 prikazano je da stanice uključene u TME određuju

na koji način će TME utjecati na tumor, može biti imunosupresivni TME i anti-tumorski TME. [2]



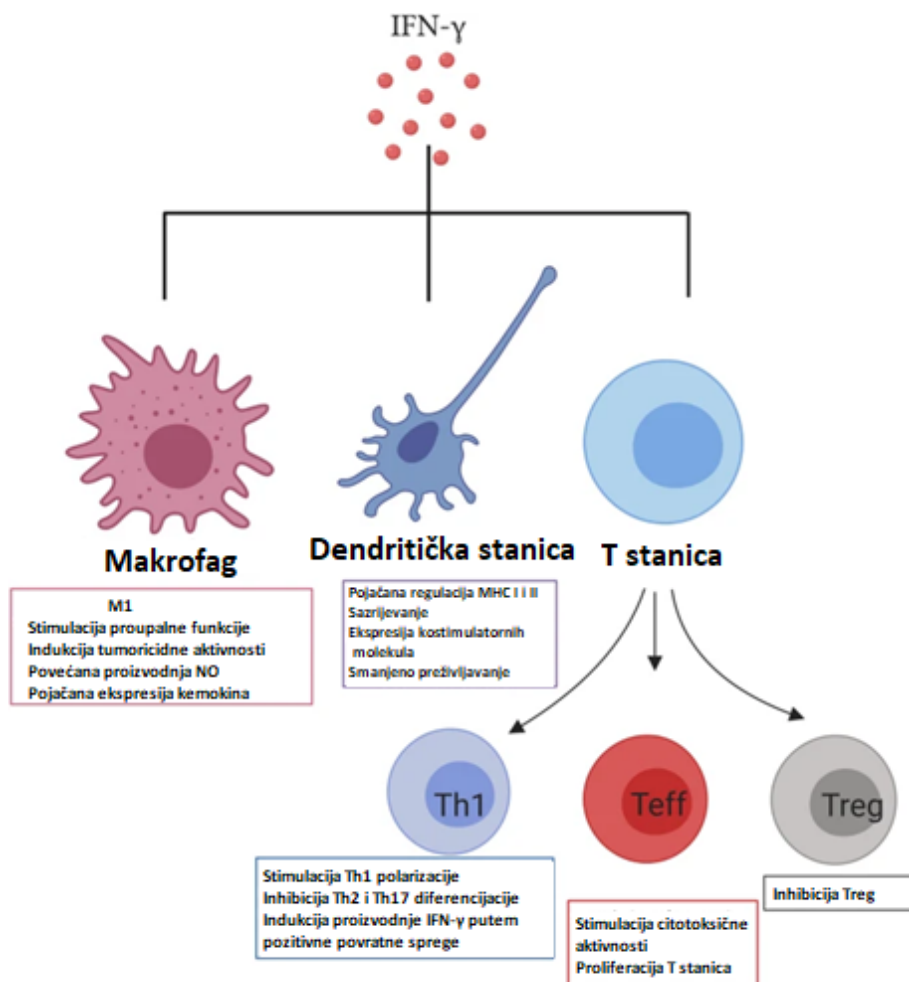
Slika (3). Utjecaj imunskih stanica na oblikovanje TME (prilagođeno prema Nicole M. Anderson, M. Celeste Simon) [2]

3.2.1. Imunosne stanice

Imunosne stanice ključna su komponenta TME. One mogu suprimirati rast tumora ili ga promovirati. Trajna upala zbog kronične infekcije je mehanizam koji je u osnovi formiranja tumora u nekoliko vrsta raka, primjerice kolorektalnog i raka vrata maternice. Imunosne stanice općenito se dijele u dvije kategorije: urođene imunosne stanice i stečene imunosne stanice. Stečeni imunosni sustav se aktivira izlaganjem specifičnim antigenima i koristi imunosnu memoriju za odgovor i pojačavanje imunosne reakcije. U stečeni imunosni odgovor spadaju NK stanice, T stanice i B stanice.

Urođeni imunitet je nespecifičan obrambeni mehanizam koji se aktivira u roku od nekoliko sati od ulaska stranog antigena u organizam. Stanice koje su ključne za urođeni imunosni odgovor su makrofagi, neutrofil i dendritičke stanice. [2]

Svaka T stanica ima svoj vlastiti T stanični receptor (engl. *T-cell receptor*, *TCR*) koji prepoznaje specifičan antigen. Unutar TME postoji nekoliko različitih populacija T stanica koje utječu na tumorogenezu. Citotoksične T stanice (CD8⁺) otkrivaju abnormalne antigene koji su eksprimirani na stanicama raka, ciljaju ih i uništavaju. Prisutnost CD8⁺ stanica u TME često je povezana s pozitivnom prognozom kod pacijenata s rakom. Osim što uništavaju tumorske stanice, one također suprimiraju angiogenezu lučenjem interferona gama (IFN- γ). [2] IFN- γ aktivira staničnu imunost, ima citostatsko, apoptotičko i antiproliferativno djelovanje. Utjecaj IFN- γ na imunosne stanice vidimo na slici 4. [9]



Slika (4). Interakcija IFN- γ sa imunosnim stanicama (prilagođeno prema Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. i sur.) [9]

CD4⁺ T stanice se diferenciraju u razne podvrste i na taj način koordiniraju širok raspon imunskih odgovora u TME. T pomoćničke stanice 1 (engl. *T-helper cell 1*, Th-1) su proupalne stanice koje podržavaju CD8⁺ stanice lučenjem interleukina 2 (IL-2) čija je glavna uloga stimulacija proliferacije aktiviranih T-limfocita i poticanje antitumorskog odgovora [10] i IFN- γ i zbog toga je njihova prisutnost u TME također povezana s pozitivnim ishodima u mnogim vrstama raka. Regulatorne T stanice (Treg) su potrebne za suzbijanje upalnog odgovora i kontrolu autoimunosti. U TME Treg su sveprisutne i potiču razvoj i progresiju tumora sprečavanjem antitumorskog imunskog odgovora. Treg direktno podržavaju preživljavanje i rast tumorskih stanica tako što luče faktore rasta. Obzirom na imunosne stanice i funkcije, TME se dijeli na 3 glavne kategorije: imunosni infiltriran, imunosno isključen i imunosno „tih“. U imunosno infiltriranom imunosne stanice su homogeno raspoređene po cijelom tumoru i to ukazuje na aktivan imunosni odgovor. U imunosno isključenima T stanice se nalaze samo na periferiji tumora i nisu se infiltrirale u TME. Imunosno „tihan“ u potpunosti nemaju stanični infiltrat što ukazuje na to da nema imunskog odgovora na tumor. [2]

B stanice su specijalizirane imunosne stanice koje su odgovorne za proizvodnju antitijela, prezentaciju antigena i izlučivanje citokina. Citokini su glikoproteini koji posreduju pri imunosnim reakcijama i reguliraju ih. B stanice se obično nakupljaju na marginama tumora, a nalaze se i u limfnim čvorovima u neposrednoj blizini TME. U usporedbi s T stanicama, B stanice se relativno malo infiltriraju u TME, međutim studije su pokazale da je prisutnost i funkcija B stanica važna tijekom tumorogeneze jer formiraju tercijarne limfoidne strukture koje omogućuju povezanost između T i B stanica i njihova prisutnost je pozitivan prognostički marker kod raka dojke, melanoma i raka jajnika. Uloge antitumorskih B stanica su prezentacija antigena T stanicama, proizvodnja antitumorskih protutijela i lučenje citokina, poput IFN- γ , koji potiču citotoksični imunosni odgovor. Također, B stanice mogu imati i funkcije koje potiču rast tumora slično kao i Treg

stanice, B regulatorne stanice potiču agresiju tumora proizvodnjom citokina kao što su interleukin 10 (IL-10) i faktor rasta tumora (TGF- β) koji potiču stvaranje imunosupresivnih fenotipova makrofaga, neutrofila i CD8⁺ stanica. [2] IL-10 djeluje tako što inhibira ekspresiju glavnog sustava tkivne podudarnosti klase II (engl. *Major histocompatibility complex*, MHC), čija je uloga prepoznavanje stranih molekula u organizmu, i na taj način inhibira sposobnost antigen prezentirajućih stanica da prezentiraju antigen T stanicama. [11]

NK stanice cirkuliraju krvotokom tražeći virusno inficirane stanice domaćina i tumorske stanice. Funkcionalno one se mogu podijeliti u dvije klase, prva klasa koja izravno sudjeluje u stanično posredovanom ubijanju tumorskih stanica te druga klasa koja luči upalne citokine. NK stanice imaju visoku učinkovitost u ubijanju tumorskih stanica u cirkulaciji i mogu sudjelovati u blokiranju metastaza, ali unutar TME su manje učinkovite u ubijanju. [2]

Makrofagi su ključne komponente urođenog imunskog sustava koje moduliraju imunosne odgovore fagocitozom patogena i prezentacijom antigena. Također, ključni su za rano zacjeljivanje i popravak tkiva. Postoje dvije vrste makrofaga, upalni M1 makrofagi koji fagocitiraju i ubijaju stanice i imunosupresivni M2 makrofagi koji sudjeluju u zarastanju rana. Iako se oba razreda makrofaga mogu pronaći unutar tumora, TME promovira fenotip M2 kroz hipoksiju (smanjena količina kisika u stanicama) i sekreciju citokina kao što su interleukin 4 (IL-4) za potporu rasta i napredovanje tumora. Određeni tipovi tumora mogu biti toliko jako infiltrirani sa makrofagima da oni čine do 50% mase tumora. [2] Često makrofagi okružuju krvne žile u TME gdje luče faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) i induciraju formiranje novih krvnih žila što potiče rast tumora. Visoka infiltracija makrofaga je povezana s lošom prognozom pacijenata kod mnogih vrsta raka. [2]

Neutrofili čine do 70% cirkulirajućih leukocita i prva su linija obrane protiv mnogih patogena. U kontekstu tumora mogu djelovati tako da suprimiraju ili pospješuju rast tumora, ovisno o vrsti tumora i stadiju razvoja. Kako

tumor raste, neutrofili se regrutiraju u TME i potiču upalu oslobađanjem citokina i reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) koje potiču apoptozu tumorskih stanica. U kasnijem stadiju razvoja tumora neutrofili potiču rast tumora kroz modifikaciju ECM, oslobađajući VEGF i proizvodnjom matriks metaloproteaze 9 (MMP-9) za stimulaciju angiogeneze te u konačnici progresije tumora i lokalne invazije. Jedna od uloga matriks metaloproteaza je i cijepanje proteina u ECM. [2]

Dendritičke stanice imaju važnu ulogu u imunom sustavu kao antigen prezentirajuće stanice. Prepoznaju, hvataju i prezentiraju antigene T stanicama u sekundarnim limfnim organima, primjerice u limfnim čvorovima. Dendritičke stanice su izuzetno važne zato što povezuju urođeni i specifični imunitet kako bi inducirale patogen-specifičan odgovor T stanica. U TME dendritičke stanice mogu imati anti-tumorski odgovor, ali i toleranciju ovisno o signalima koje dobivaju od samog TME. TME izlučuje citokine koji potiču dendritičke stanice da toleriraju prisutnost stanica tumora i blokiraju imunski odgovor. [2]

3.2.2. Fibroblasti povezani s rakom

Najzastupljenije stanice u TME su fibroblasti koji se nakon aktivacije mijenjaju u miofibroblaste koji su poznati i kao fibroblasti povezani s rakom (engl. *Cancer-associated fibroblasts*, CAFs). Miofibroblasti su prolazno prisutni tijekom prirodnog zacjeljivanja rana, ali za razliku od procesa zacjeljivanja CAF-ovi na mjestu tumora ostaju neprestano aktivirani. Aktivacija fibroblasta može biti inducirana različitim faktorima kao što su čimbenici rasta, izravna komunikacija između stanica, ROS i miRNA. Kada fibroblasti ostanu aktivirani nakon što se početna povreda tkiva povuče, aktivirani fibroblasti odnosno CAF-ovi mogu djelovati drugim molekularnim putevima kako bi potaknuli inicijaciju neoplazme. Obzirom da se miofibroblasti mogu razlikovati po α -glatkom mišiću, transformirajućem faktoru rasta beta i VEGF-A oni su prepoznati kao nositelji ključne uloge u metastaziranju i razvoju raka. Za razliku od ne-aktiviranih fibroblasta, CAF-

ovi pokazuju povećano lučenje različitih čimbenika rasta koji utječu na proliferaciju stanica raka, preživljavanje i invazivni potencijal. CAF-ovi imaju značajan utjecaj na napredovanje raka remodelacijom izvanstaničnog matriksa, induciranjem angiogeneze, regrutiranjem upalnih stanica i izravnim stimuliranjem proliferacije stanica. Izravnu stimulaciju proliferacije CAF-ovi postižu izlučivanjem čimbenika rasta i imunosupresivnih citokina. Koevolucija CAF-ova i stanica tumora tijekom tumorogeneze je neophodna za napredovanje u potpuno maligne tumore. [29] CAF-ovi potiču napredovanje raka prekomjernom proizvodnjom različitih modifikatora izvanstaničnog matriksa te povećavanjem krutosti matriksa što dovodi do pojačanog metastatskog ponašanja tumora. Povećana krutost matriksa također korelira s infiltracijom makrofaga M2 koji potiču malignu progresiju.

Uspješno stvaranje metastaza zapravo je rijedak događaj koji se sastoji od više procesa koji obuhvaćaju lokalnu invaziju, intravazaciju (ulazak maligne stanice u krvnu ili limfnu žilu), preživljavanje u krvotoku, ekstravazaciju (izlazak stanica iz žile) i na kraju kolonizaciju udaljenih organa. U većini slučajeva samo mali podskup stanica primarnog raka moći će uspješno uspostaviti metastaze. Korak koji određuje brzinu metastaziranja je metastatska kolonizacija, a dokazano je da CAF-ovi u udaljenim organima podržavaju kolonizaciju metastatski stanica. CAF-ovi regrutirani na metastatska mjesta proizvode brojne faktore za stvaranje niše koja podržava metastatsku kolonizaciju. [30]

3.2.3. Stromalne stanice

Stanice tumora regrutiraju potporne stanice iz okolnog endogenog tkiva stroma za promicanje ključnih koraka u formiranju tumora te oni zbog toga čine važnu komponentu TME. Sastav stromalnih stanica značajno varira između različitih tipova tumora i one uključuju vaskularne endotelne stanice, fibroblaste, adipocite i zvjezdaste stanice. Kada su stromalne

stanice regrutirane u TME, luče mnoge čimbenike (faktore rasta i citokine) koji utječu na angiogenezu, proliferaciju, invaziju i metastaze. [2]

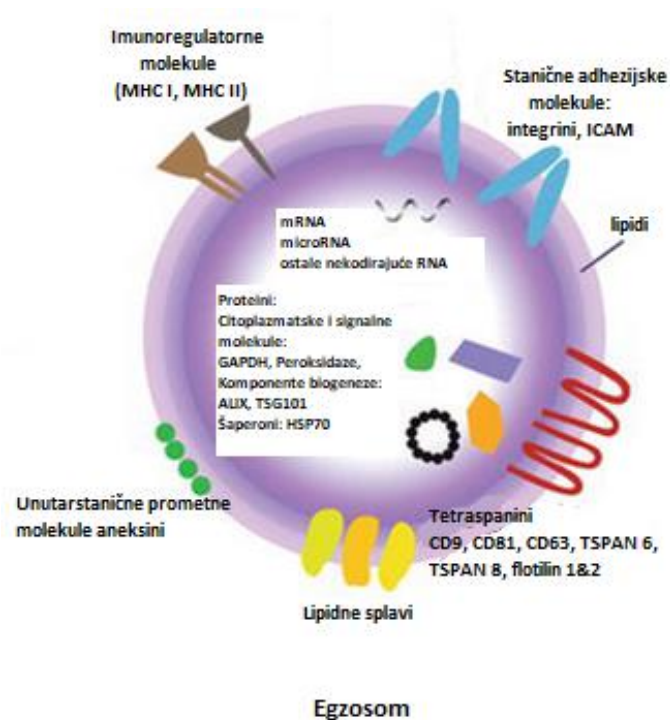
3.2.4. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks sastoji se od kolagena, fibronektina, elastina i lamina i važna je komponenta TME. Pruža fizički prostor za stanice, ali ima i ključnu ulogu u poticanju širenja stanica tumora. Čvrsti tumori imaju velike naslage ECM koje čine do 60% mase tumora. MMP (matriks metaloproteaze) su proteaze koje cijepaju proteine ECM i važni su u remodelaciji ECM omogućujući tumoru progresiju i metastaziranje. ECM je depo za citokine i faktore rasta koje oslobađaju proteaze poput MMP-a. Često je depo za proangiogene čimbenike poput VEGF, FGF (faktor rasta fibroblasta), PDGF (trombocitni faktor rasta) i TGF- β . [2]

S nabrojenim funkcijama TME i različitim mehanizmima vidimo koliko načina su tumori pronašli kako bi izbjegli imunosni odgovor domaćina i pronašli novi put proliferacije i progresije, ali bez posrednika u komunikaciji između stanica tumora sa stromalnim stanicama i ostalim proteinima tumori ne bi uspjeli toliko napredovati. Za učinkovit rast tumora i širenje potrebna je kontinuirana komunikacija između stanica raka i okruženja domaćina, a tu komunikaciju omogućuju egzosomi.

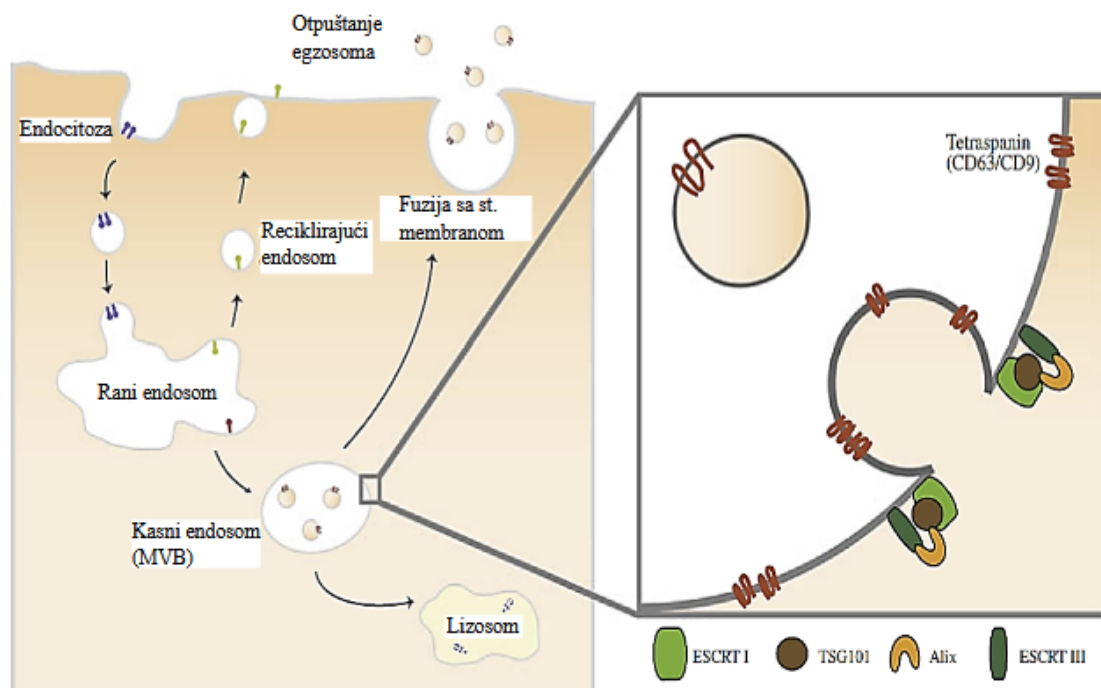
3.3. Egzosomi

Egzosomi su male membranske vezikule raspona veličine 30-200 nm. Njihov sadržaj odražava stanice iz kojih su nastali, uključujući proteine, RNA, DNA i lipide. [2] Mnogo različitih tipova stanica, kao što su imunosne stanice, mezenhimalne stanice i stanice raka, oslobađaju egzosome. [12] Važno je naglasiti da pored svih proteina i citokina koje egzosomi prenose oni mogu prenositi i miRNA.



Slika (5). Sadržaj i markeri egzosoma (prilagođeno prema <https://www.intechopen.com/chapters/64230>)

Prvi korak u nastanku egzosoma je sazrijevanje ranog endosoma u kasni. Tijekom ovog procesa dolazi do invaginacije membrane endosoma prema unutra i formiranja intraluminalnih vezikula (engl. *Intraluminal vesicles*, ILVs). Pupanje ILV-a iz endosomskih odjeljaka i njihovo spajanje rezultira stvaranjem kasnog endosoma. Nastali kasni endosom, koji se još naziva i multivezikularno tijelo (engl. *Multivesicular body*, MVB), ispunjen je vezikulama čiji će se sadržaj ili razgraditi fuzijom s lizosomima ili izlučiti iz stanice fuzijom sa staničnom membranom. Izlučene vezikule, odnosno egzosomi obavijene su fosfolipidnim dvoslojem. Nastanak ILV zahtjeva dva bitna procesa. U prvi proces uključeni su tetraspanini CD9 i CD63 na koje će se kasnije vezati proteini koji su odgovorni za drugi proces u nastanku ILV-a. U drugom procesu formiraju se endosomalni sortirajući kompleksi zaduženi za transport (engl. *Endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT). ESCRT-I i -II pokreću pupanje membrane, a ESCRT-III, koji se na ESCRT-I i -II veže preko proteina Alix, odgovoran je za dovršetak pupanja. [23]

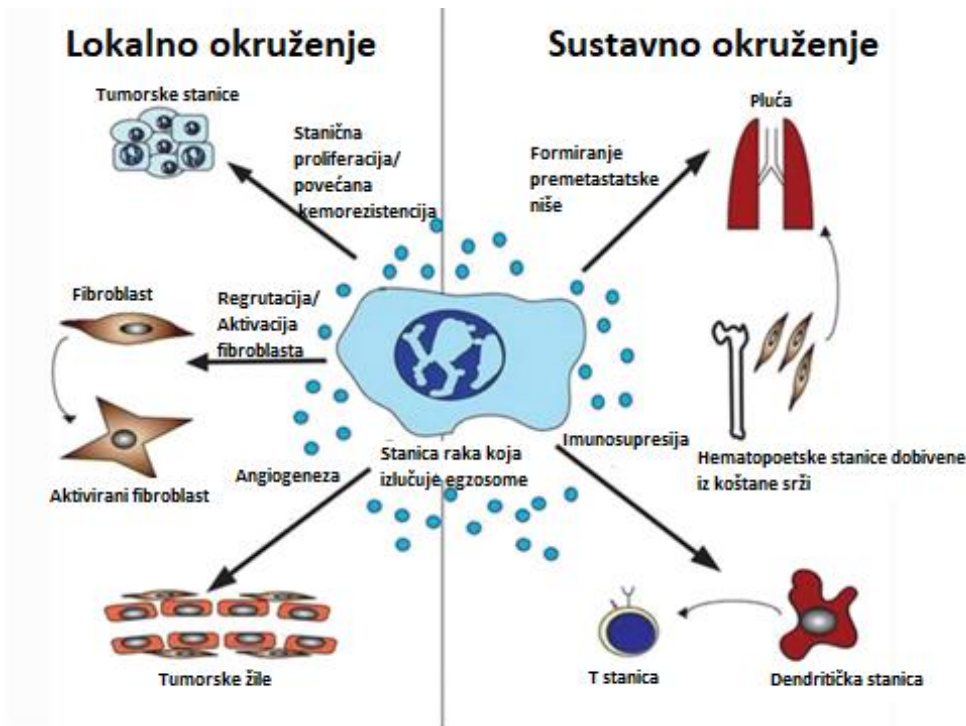


Slika (6). Proces nastanka egzosoma (preuzeta od: Barberić T.) [23]

Sadržaj u egzosomima se može razlikovati ovisno o matičnoj stanici iz koje je egzosom nastao. Egzosomi sadržaj primaju i putem ESCRT-ovisnih i neovisnih mehanizama. Kod ESCRT-neovisnih mehanizama važnu ulogu u sortiranju proteina u egzosome imaju tetraspanini. Post-translacijske modifikacije mogu direktno kontrolirati mehanizme razvrstavanja sadržaja u egzosomima. Na sadržaj egzosoma mogu utjecati i promjene u egzosomima uzrokovane stresom kao što je hipoksija. [24]

U TME egzosomi imaju ključnu ulogu u omogućavanju unakrsne komunikacije između tumorskih stanica i stromalnih stanica. Pokazalo se da imaju i proupalnu funkciju, potiču progresiju tumora i metastaze unutar TME. Uvjeti hipoksije pogoršavaju proizvodnju egzosoma od strane stanica tumora i na taj način potiču pretvorbu stromalnih stanica u tumorske fibroblaste. [2] Egzosomi mogu imati dvije različite uloge u tumoru. Slika 7 prikazuje kako egzosomi mogu manipulirati lokalnim i sustavnim okruženjem kako bi pomogli u rastu i širenju raka, ali također mogu i programirati imunski sustav da izazove antitumorski odgovor. Egzosomi u tumorima su heterogeni i luče ih sve stanice što dovodi do mreže interakcija koje su vrlo složene. [12] Prijenosom posredovanim egzosomima, tumorske

stanice izmjenjuju proteine s onkogenom aktivnošću, smatra se da na taj način dolazi do kemorezistencije, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se to potvrdilo. Ova istraživanja predstavljaju novi pogled na to kako maligne stanice mogu povećati svoj tumorski potencijal i razviti kemorezistentnost putem egzosoma. Provedene studije pokazuju da egzosomi dobiveni iz tumorskih stanica imaju ključnu ulogu u manipuliranju TME za dobrobit stanica raka. Međustanična komunikacije putem egzosoma je dvosmjerna između stanica raka i strome povezane s rakom. Komunikacija posredovana egzosomima između tumorskih stanica i imunskog sustava uključena je u regrutiranje protumorskih imunskih stanica. MiRNA u egzosomima oslobođenim od strane stanica raka mogu utišati transkripte povezane s obitelji Toll-like receptora (TLR) u makrofagima. Ovaj mehanizam stimulira makrofage da luče proupalne citokine, što podupire pojačano širenje tumora. Stanice raka sposobne su inhibirati antitumorske funkcije imunskog sustava domaćina signalizacijom putem egzosoma. Egzosomi otpušteni iz tumora aktiviraju MDSC. MDSC imaju immunosupresivne funkcije u karcinomu supresijom odgovora T stanica. [12] Egzosomi stanica raka mogu pridonijeti horizontalnom razmnožavanju onkogenih miRNA. Iako mehanizam izlučivanja i ugradnje miRNA nije razjašnjen, sekretorne miRNA mogu imati ključnu ulogu kao signalne molekule u fiziološkim i patofiziološkim procesima. [13]



Slika (7). Prikaz lokalnih i sustavnih učinaka egzosoma (prilagođeno prema Kahlert, C., Kalluri, R.) [12]

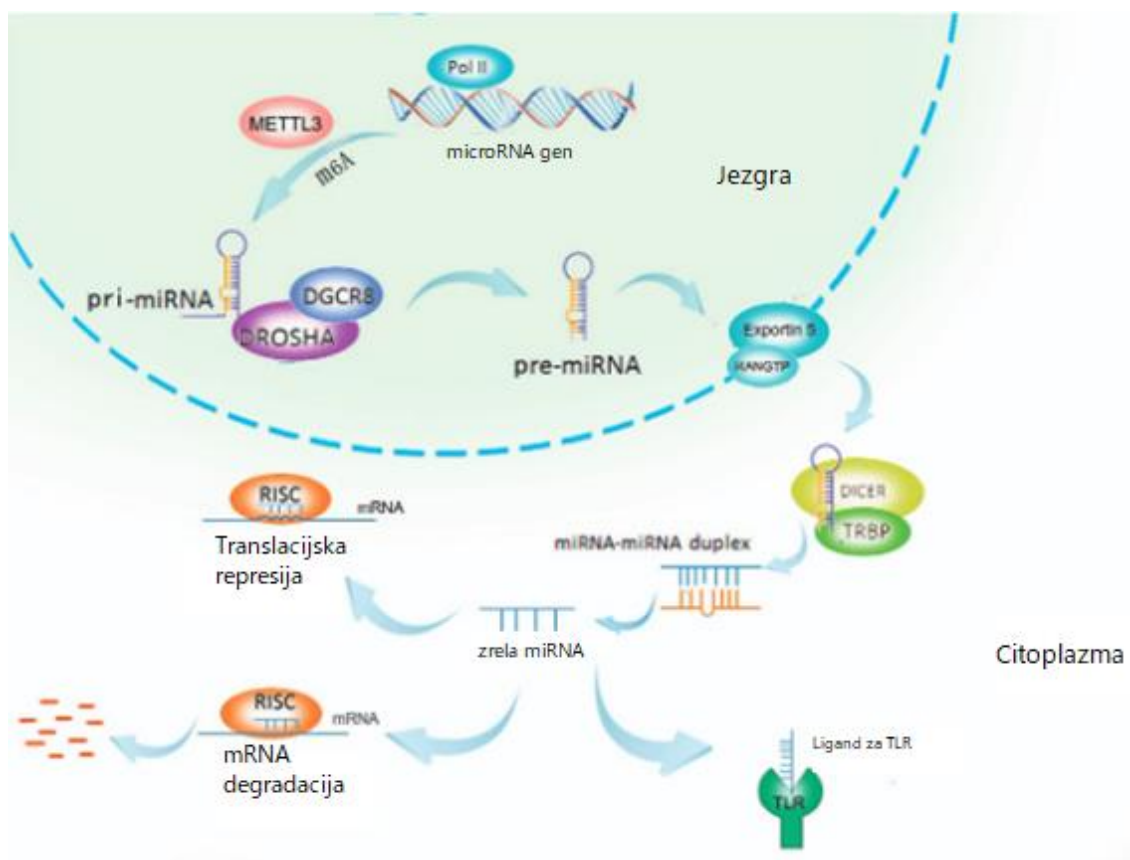
Sve više dokaza upućuje na to da mikroRNA ima važnu ulogu u oblikovanju biologije i funkcije tumorskih stromalnih stanica. Deregulacija miRNA povezana je s gotovo svim aspektima inicijacije i napredovanja raka.

3.4. miRNA

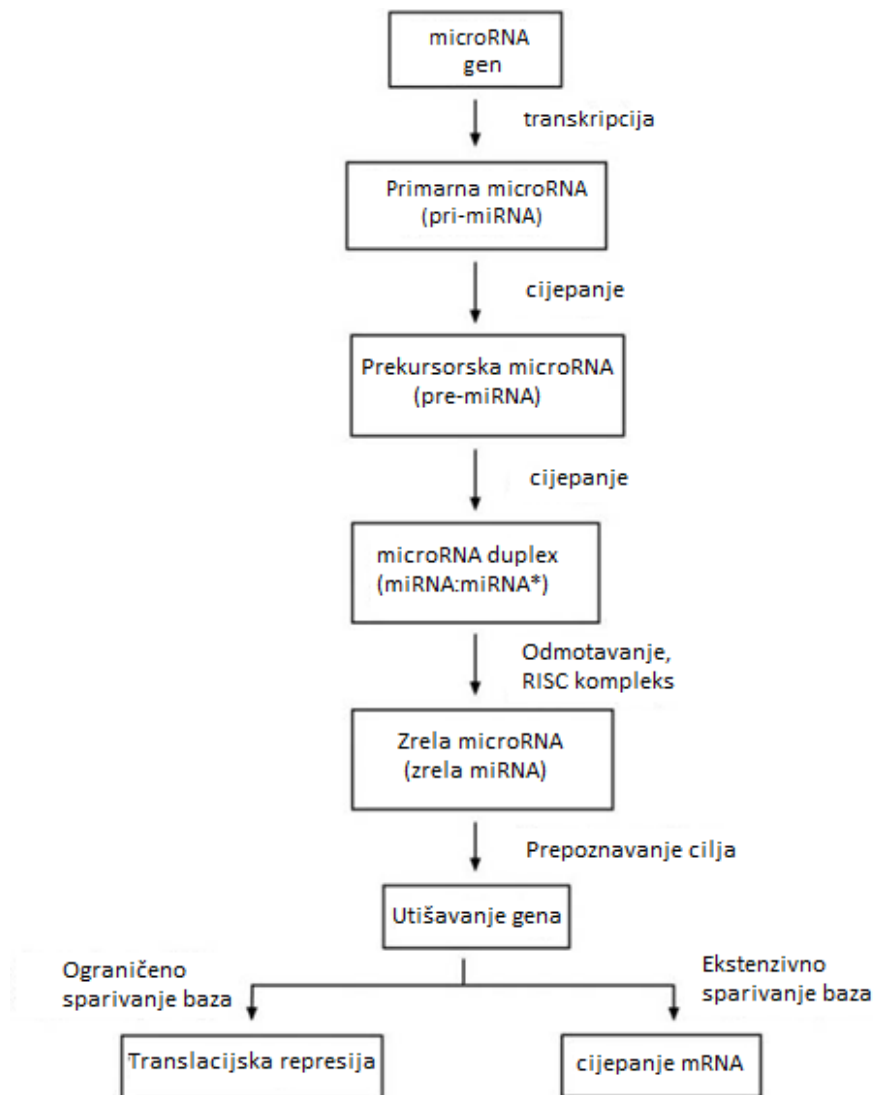
miRNA je klasa nekodirajućih RNA, prosječne duljine 17-22 nukleotida, koje imaju važnu ulogu u regulaciji genske ekspresije. [14] MiRNA su male, evolucijski očuvane, jednolančane, nekodirajuće RNA molekule koje vežu ciljnu mRNA kako bi spriječile proizvodnju proteina jednim od dva različita mehanizma. Zrela miRNA nastaje cijepanjem primarne miRNA (pri-miRNA) u dva koraka. miRNA funkcionira kao vodič uparujući baze s ciljnom mRNA kako bi negativno regulirala njezinu ekspresiju. Razina komplementarnosti između miRNA (vodiča) i ciljne mRNA određuje koji od dva mehanizma za utišavanje će se koristiti: cijepanje ciljne mRNA s naknadnom degradacijom ili inhibicija translacije. [4] Većina

miRNA su prepisane sa DNA sekvence u prekursorske miRNA i zrele miRNA. [14] Gen miRNA se prepisuje kako bi se stvorila primarna miRNA (pri-miRNA) prekursorska molekula koje se podvrgava nuklearnom cijepanju kako bi se formirala prekursorska miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA se cijepa u citoplazmi kako bi se stvorio miRNA dupleks koji sadrži zrelu miRNA. Dupleks se odmotava i zrela miRNA se sastavlja u RNA-inducirani kompleks za utišavanje (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISC). RISC je multiproteinski kompleks koji djeluje u utišavanju gena pri transkripciji i translaciji. Parovi baza miRNA s ciljnom mRNA za usmjeravanje utišavanja gena putem cijepanja mRNA ili potiskivanja translacije na temelju razine komplementarnosti između miRNA i ciljane mRNA. Genomske analize pokazale su da su primarne prekursorske miRNA dugi policistronski transkripti koji su slični mRNA po tome što imaju različite 5' i 3' granice, 7-metil gvanilat (m7G) kape i poli(A) repove. Većina miRNA transkribirana je RNA polimerazom II (pol II). Sinteza miRNA od strane pol II i pol III implicira da je miRNA temeljni regulatorni element generiran iz različitih lokusa unutar ljudskog genoma, koji su uključeni u kontrolu ekspresije gena esencijalnih za normalnu staničnu funkciju. Naknadna obrada pre-miRNA događa se u citoplazmi. Pre-miRNA se sastavlja u kompleks s nukleocitoplazmatskim transportnim faktorom Exportin-5 i RanGTP, koji sprječavaju nuklearnu degradaciju i olakšavaju translokaciju u citoplazmu. [4] U većini slučajeva miRNA su u interakciji s 3' netranslacijskim regijama (engl. *3'-untranslated region*, 3'-UTR) ciljane mRNA kako bi suprimirale ekspresiju. [14] 2006. godine Volinia i sur. prvi su identificirali djelovanje miRNA u ljudskim karcinomima. Jedna od onkogenih miRNA koju su identificirali bila je miR.21. Napredovanjem tehnika za otkrivanje miRNA, miRNA dobivene iz stanica raka istaknule su se kao obećavajući dijagnostički i terapijski ciljevi. [15] Neodgovarajuća ekspresija miRNA koja regulira ključne gene kao što su onkogeni ili tumor supresori može dovesti do razvoja tumora, a obitelji kao što su miR-15, miR-1 i let-7 su često povezane s rastom raka i metastazama. Specifične miRNA koje su sposobne transformirati normalne stanice u tumorske stanice poznate su kao

onkomiR. Prvi opisan onkomiR bio je miR-17/92 klaster, policistronska RNA koja kodira za šest različitih miRNA. Suprotno od toga, postoji još jedan podskup miRNA, tumor supresorske miRNA koje su poznate kao anti-onkomiR. [5] Procjenjuje se da se 10% ekspresije miRNA kontrolira metilacijom DNA. Dodatni dokazi podupiru miRNA kao odgovor na hipoksiju, hormonalne i prehrambene promjene. MiRNA igraju važnu ulogu u regulaciji brojnih metaboličkih i staničnih putova, posebice onih koji kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje. [4] Na slici 8 je prikaz sazrijevanja i funkcije miRNA.



Slika (8). Sinteza i djelovanje miRNA (prilagođeno prema Peng, Y., Croce, C.) [31]



Slika (9). Shematski prikaz sazrijevanja i funkcije miRNA (prilagođeno prema Macfarlane LA, Murphy PR.) [4]

3.4.1. Uloga miRNA u regulaciji tumorskih makrofaga

Stanice raka mogu regulirati ekspresiju miRNA u infiltrirajućim imunskim stanicama, čime suprimiraju lokalni antitumorski imunski odgovor i u konačnici dovode do progresije tumora. Tumorski makrofagi imaju i pro- i antitumorogena svojstva, ovisno o tome pripadaju li M1 ili M2 podtipu, kao što je navedeno u tekstu iznad. U kasnoj fazi raka, većina infiltrirajućih makrofaga je fenotipa M2 i stvaraju imunosupresivno

okruženje koje pogoduje napredovanju tumora. Povećana dostava miR-21-5p od strane izvanstaničnih vezikula dobivenih iz mezenhimalnih matičnih stanica potiče polarizaciju makrofaga prema M2 fenotipu. miR-125b se veže na 3' UTR regiju faktora tumorske nekroze alfa (TNF- α) i inhibira njegovu proizvodnju i održavajući fenotip M1 makrofaga. Suprotno tome, miR-146 izravno inhibira ekspresiju adapterskog proteina faktora 6 povezanog s faktorom nekroze tumora faktora 6 i kinaze-1 povezane s IL-1 receptorom u NF- κ B putu i time smanjuje proizvodnju proupalnih citokina i potiču M2 aktivaciju. [15]

3.4.2. Uloga miRNA u regulaciji T stanica

miRNA imaju glavnu ulogu u sazrijevanju, aktivaciji i funkcioniranju T stanica. Imunosupresivne FOXP3⁺ regulatorne T stanice (Treg) obogaćene su u tumorskim tkivima i povezane su s razvojem i progresijom raka. Egzosomalna miR-24-3p inhibira proliferaciju T stanica, diferencijaciju Th1 i Th17 te potiče razvoj Treg kroz potiskivanje faktora rasta fibroblasta 11. miR-214 koju izlučuje tumor može inducirati Treg da luče veće razine IL-10 što dovodi to supresije imuniteta i brzog rasta tumora. Pokazalo se da inhibicija miR-214 koje izlučuju tumorske stanice blokira Treg indukciju i tumorski rast i to sugerira da anti-miR-214 terapija može prekinuti tumorom induciranu ekspanziju Treg stanica i suprimirati rast tumora. Uspješnost ove terapije sugerira da su miRNA ključni regulatori funkcija T stanica u TME. [15]

3.4.3. Uloga miRNA u regulaciji endotelnih stanica

Angiogeneza je ključna za napredovanje tumora i metastaziranje. Mangala i sur. izolirali su endotelne stanice iz karcinoma jajnika i normalnog tkiva jajnika, u endotelnim stanicama karcinoma identificirali su

deregulirane miRNA. Oni su pokazali da je jedna od dereguliranih miRNA, miR-29a/c, regulator VEGF-a te da povećanjem ekspresije VEGF potiče napredovanje karcinoma. Kod raka dojke tumorske stanice mogu otpustiti miR-939 u endotelne stanice putem egzosoma, a miR-939 potiskuje ekspresiju vaskularnog endotel-kadherina u endotelnim stanicama i na taj način povećava vaskularnu permeabilnost. Iz njihovog istraživanja vidimo da miRNA imaju različite uloge u regulaciji aktivnosti endotelnih stanica i tumorske angiogeneze. [15]

3.5. Uloga miRNA dobivene iz TME u regulaciji progresije tumora

Rast tumora uvelike ovisi o komunikaciji tumorskih stanica i stanica TME. Jedne od stanica na kojima je dokazano da miRNA utječe na TME su fibroblasti. Tijekom progresije tumora miRNA sudjeluje u interakcijama između tumorskih stanica i tumorskih stromalnih stanica, kao što su CAF-ovi, endotelne stanice i infiltrirajuće imunosne stanice. Primjerice fibroblasti daju stromalni okvir za tumorske stanice tijekom ranog rasta tumora. Na mjestu primarnog tumora, fibroblasti poprimaju različite fenotipske karakteristike i postaju CAF kroz regulaciju višestrukih signalnih putova posredovanu miRNA. CAF se razlikuju od normalnih fibroblasta po visokoj ekspresiji α -glatkog mišića i svojim protumorogenim svojstvima. CAF izlučuju širok raspon proupalnih molekula, uključujući interleukine i kemokine u konačnici potičući rast tumora moduliranjem upale povezane s tumorom. [15] U procesu aktivacije fibroblasta i nastanka CAF miRNA imaju važnu ulogu te djeluju kao parakrini podražaj za aktiviranje susjednih fibroblasta čime se širi tzv. „CAF stanje“. [25] MiRNA mogu regulirati nastanak i učinke CAF-ova preko regulacije različitih signalnih puteva, otpuštanjem citokina/faktora rasta ili egzosoma. [26] Pokazalo se da miR-211 dobiven iz stanica melanoma inducira stvaranje CAF-a izravnim ciljanjem faktora rasta 2 sličnog inzulinu i aktiviranjem signalizacije protein kinaze aktivirane mitogenom što zauzvrat pojačava rast melanoma. Yin i

sur. pokazali su da egzosomalni miR-501-3p izveden iz M2 makrofaga olakšava stvaranje tumora in vivo regulacijom signalnog puta transformirajućeg TGF- β . [15]

Makrofagi transficirani molekulom koja oponaša djelovanje miR-125a pokazali su povećanu fagocitoznu aktivnost i suprimirali rast raka pluća kod miševa. Prema tome vidimo da miRNA povezane s TME imaju ključnu ulogu u rastu tumora. [15]

3.6. miRNA-mRNA interakcije

miRNA su uključene u destabilizaciju i degradaciju mRNA. [5] miRNA se veže na svoju ciljnu mRNA i negativno regulira njezinu ekspresiju nakon transkripcije uparivanjem baza s 3'-UTR ciljne mRNA. [16, 4] miRNA se vežu samo za mjesta koja su obilježena 7 metil gvanozin trifosfatnom kapom. Nakon vezanja miRNA, argonaut protein (Ago) RISC kompleksa interferira ili sa m7G kapom ili sa eukariotskim translacijskim inicijacijskim faktorom i ta interakcija ometa aktivaciju inicijacijskog kompleksa. Tada se mRNA ne može vezati za ribosomske podjedinice i ne dolazi do sinteze proteina. [17]

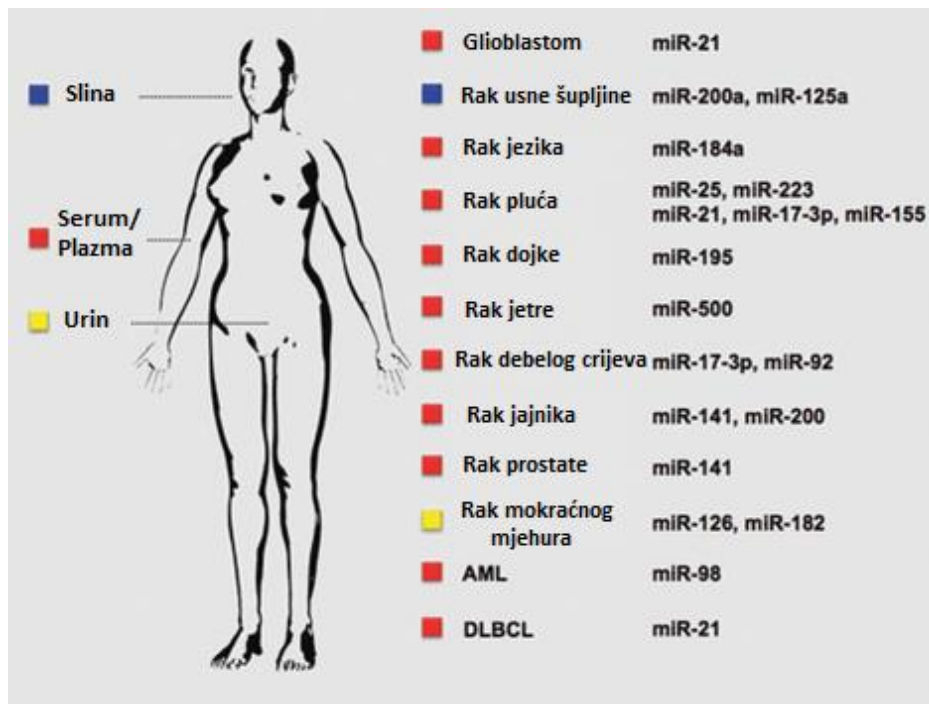
Identifikacija parova interakcija miRNA-mRNA dobiva značajnu pozornost obzirom na njihove potencijalne implikacije u osmišljavanju novih terapija. [5] Jedan miRNA vodič može regulirati nekoliko ciljnih mRNA i obrnuto nekoliko miRNA mogu kooperativno regulirati jednu ciljnu mRNA. miRNA usmjereno cijepanje mRNA katalizira argonaut 2 protein (Ago2), kada su ciljna mRNA i miRNA opsežno uparene bazama u regijama. Jedno opsežno komplementarno područje obično je dovoljno za cijepanje. Produkti cijepanja razgrađuju se jednim od dva procesa odgovorna za masovnu degradaciju stanične mRNA, a oba počinju s deadenilacijom mRNA kako bi se uklonio poli (A) rep. Naknadna degradacija može se dogoditi preko egzosoma, koji je višeproteinski kompleks s aktivnošću egzonukleaze od 3'

do 5'. Alternativno, mRNA se može podvrgnuti uklanjanju kape enzimima Dcp1 i Dcp2 što olakšava razgradnju od 5' do 3' egzoribonukleazom Xrn1p. [4]

3.7. Dijagnostika

Značajna pozornost i resursi posvećeni su otkrivanju biomarkera raka. Biomarkeri se koriste za rano otkrivanje, prognozu i terapijsko usmjerenje. Još uvijek postoji ograničen broj korisnih biomarkera dostupnih za kliničku upotrebu. Idealan biomarker trebao bi se lako analizirati i biti dostupan minimalno invazivnim medicinskim postupkom, ali imati visoku osjetljivost i specifičnost. Uobičajeni biomarkeri su cirkulirajući proteini u serumu, od kojih većina zahtijeva intenzivnu analizu ometanu niskom osjetljivošću. Budući da je deregulacija miRNA povezana s razvojem i napredovanjem raka, cirkulirajuće miRNA razmatraju se kao novi, minimalno invazivni biomarker. [18]

Otkriveno je da izvanstanične miRNA cirkuliraju u krvi i kod zdravih i kod bolesnih pojedinaca iako je ribonukleaza prisutna i u plazmi i u serumu. MiRNA bez nositelja razgradit će se probavom ribonukleaza i drugih okolišnih čimbenika pa je većina cirkulirajućih miRNA uključena u komplekse lipida ili lipoproteina, kao što su apoptotska tijela, mikrovezikule ili egzosomi, što ih čini stabilnima i štiti od razgradnje. Postojanje cirkulirajućih miRNA u krvi pacijenata s rakom povećalo je mogućnost da miRNA mogu poslužiti kao novi dijagnostički biomarker. Mnoge vrste cirkulirajućih miRNA zabilježene su u raznim vrstama raka. Određeni karcinomi ne mogu se dijagnosticirati poznatim serumskim biomarkerima i u takvim slučajevima miRNA u serumu, slini i urinu su odlični kandidati za buduću upotrebu (slika 10). [13]



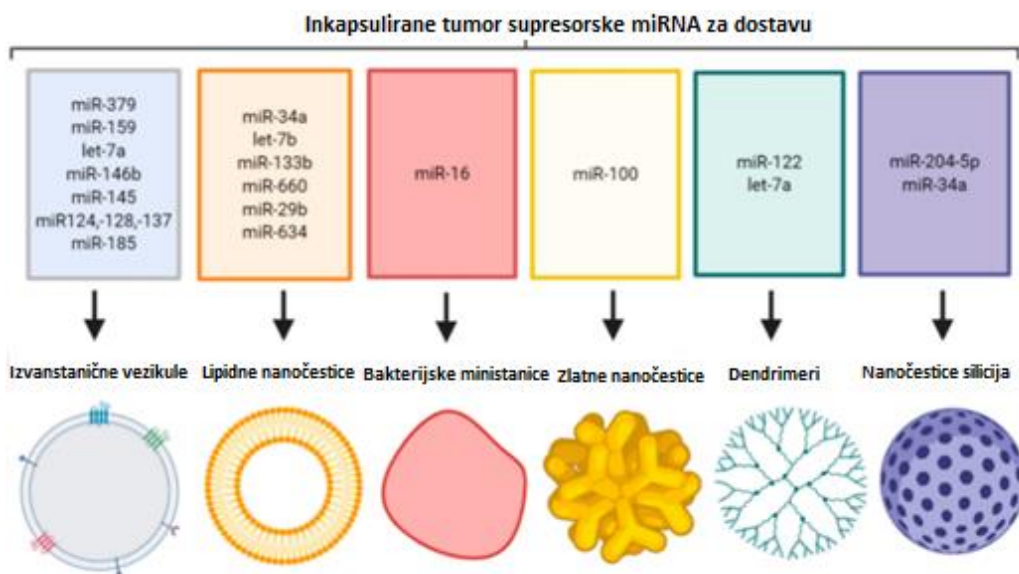
Slika (10). miRNA u slini, serumu i urinu kao biomarkeri. AML, akutna mijeloidna leukemija; DLBCL, difuzni veliki B-stanični limfom (prilagođeno prema Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T.) [13]

Osim kao biomarkeri, miRNA se mogu koristiti i kao indikatori za prognozu tijeka bolesti i brzine oporavka nakon kirurškog odstranjivanja tumora. Pomoću ekspresije miRNA moguće je odvojiti maligna od benignih stanja i odrediti stadij raka. MiRNA potpisi pokazali su dijagnostičku vrijednost u određivanju položaja organa karcinoma nepoznatog primarnog podrijetla čime se može poboljšati tijek liječenja i ishod bolesti. Prednost miRNA kao biomarkera je dijagnoza raka bez upotrebe invazivnih metoda kao što je biopsija limfnih čvorova. [28]

Izazov na koji nailazimo kod upotrebe miRNA kao biomarkera je izbjeći interferenciju miRNA iz krvnih stanica u profiliranju miRNA u serumu/plazmi. Važno je razlikovati miRNA dobivene iz tumora od onih iz krvnih stanica. [18]

3.8. Terapijski pristup

Obzirom da miRNA utječu na ekspresiju više gena i na taj način utječu na više točaka razvoja bolesti, miRNA i njihovi ciljni geni predstavljaju zanimljive terapijske mete. Istraživanja na životinjama pokazala su izvedivost manipuliranja razinama miRNA. [19] Izazov predstavlja učinkovita isporuka miRNA u ciljana tkiva. Kationski polimeri ili virusni vektori učinkoviti su agensi za isporuku, ali sistemska toksičnost i imunogenost ograničavaju njihovu upotrebu. Ciljanje i kontinuirano oslobađanje miRNA i anti-miRNA korištenjem nanočestica (engl. *nanoparticles*, NP) smanjuju potrebnu terapijsku dozu, ali istodobno minimiziraju sistemska i stanična toksičnost. NP koje se do sada koriste su izvanstanične vezikule, lipidne nanočestice, bakterijske ministanice i anorganske nanočestice (od zlata, silicija te dendrimeri). Izvanstanične vezikule su prirodne nanočestice koje otpuštaju sve stanice i imaju važnu ulogu u staničnoj komunikaciji tako što sudjeluju u transportu inkapsuliranih proteina, lipida i nukleinskih kiselina između stanica. Liposomi su lipidne vezikule koje se sastoje od jednog ili više fosfolipidnih dvosloja koji inkapsuliraju vodenu otopinu. Obzirom da su amfipatski, liposomi mogu vezati i hidrofobne i hidrofilne molekule, što ih čini dobrim prijenosnicima lijekova koji se već godinama koriste u farmaceutskoj industriji. Bakterijske ministanice su nanočestice bez jezgre stvorene gašenjem gena stanične diobe u roditeljskim bakterijskim stanicama. Anorganske nanočestice uključuju derivate silicija i razne metale. Na slici 11 prikazana je inkapsulacija tumor supresorskih miRNA u navedene formulacije nanočestica za dostavu primarnim tumorima i metastazama. [20]



Slika (11). Inkapsulacija tumor supresorskih miRNA u formulacije nanočestica (prilagođeno prema Aditya Ganju, Sheema Khan, Bilal B. Hafeez, Stephen W. Behrman, Murali M. Yallapu, Subhash C. Chauhan, Meena Jaggi) [20]

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razvila nanoformulacija miRNA koja bi postigla poboljšano stanično preuzimanje, bioraspodjelivost i akumulaciju na ciljanom mjestu. [20]

Provedeno je istraživanje kombiniranog liječenja miRNA terapeutika s malim molekulama lijekova protiv raka koje je dobilo mnogo pažnje zbog superiorne terapijske koristi. Ovakav pristup liječenju ima mnogo prednosti u odnosu na konvencionalne terapije, epitelno-mezenhimalni prijelaz, inhibicija nastanka rezistencije na lijekove, poticanje apoptoze i autofagije i supresija angiogeneze. Aktivnim ciljanjem onkogenih miRNA korištenjem anti-miR sustava ili vraćanjem izgubljenih tumor supresorskih miRNA moguće je senzibilizirati stanice na kemoterapijske lijekove. [20]

Uspješna isporuka miRNA stanicama raka glavna je prepreka u terapiji raka. Zajednička isporuka miRNA/siRNA zajedno s kemoterapijskim lijekovima ima velik potencijal jer ima sinergističko djelovanje. Kemoterapijski lijekovi mogu inhibirati rast i proliferaciju stanica raka, ali tijekom određenog vremenskog razdoblja stanice stječu otpornost zbog povećane ekspresije

efluksnih transportera i antiapoptotske signalizacije. Kombinacija miRNA/siRNA pomaže u prevladavanju rezistencije izravnim ciljanjem ekspresije efluksnog transportera i antiapoptotske signalizacije čime se stanice raka senzibiliziraju na kemoterapijske lijekove. Ovaj sustav zajedničke dostave je obećavajuća platforma i zbog toga zahtijeva daljnje istraživanje. [20]

Kako bi razvili farmakološki pristup za utišavanje miRNA, znanstvenici su dizajnirali kemijski modificirane jednolančane analoge RNA konjugirane s kolesterolom, nazvane antagomir ili antimiR. Antagomiri su komplementarni s miRNA i koriste se za prigušivanje miRNA. U budućnosti bi aktivacija tumor anti-onkomiR s agomiR ili utišavanje onko-miR s antimiR mogla postati terapijska strategija za liječenje raka. Prije primjene takve strategije u klinici potrebno je savladati nekoliko poteškoća, na primjer je li moguće dizajnirati antagomire koji ciljaju određena tkiva ili organe te također potrebno je regulirati stabilnost antagomira i odrediti odgovarajuće doze za optimalan učinak te ispitati potencijalne nuspojave. [27]

4. RASPRAVA

Istraživanjem je dokazana deregulacija profila ekspresije miRNA u većini pregledanih tumora. Otkriće uloge miRNA u razvoju tumora otvorilo je nove terapijske pristupe. Obrasci ekspresije razlikuju se za specifična tkiva i stanja diferencijacije, a to je jedan od problema u klasifikaciji miRNA. Potencijal miRNA kao biomarkera u budućnosti bi mogao omogućiti ranije otkrivanje raka neinvazivnim metodama, a time bi se olakšalo i unaprijedilo i liječenje jer bi se reagiralo na vrijeme.

Interakcija i utjecaj miRNA na stanice tumora, ali i na TME i njegova remodelacija kako bi bio pogodan za progresiju tumora, pokazuje koliko značajnu ulogu miRNA imaju u inicijaciji i progresiji tumora. Samim time što imaju veliku ulogu u više procesa i potencijal iskorištavanja miRNA u kliničke svrhe je velik.

Obzirom da miRNA sudjeluju u brojnim regulatornim putevima u stanici, bitno je razumjeti s čim i kako se odvijaju te interakcije kako bi se miRNA mogle promatrati u terapijskom kontekstu. U *in vivo*, *in vitro* i kliničkim istraživanjima pojedinačno ciljanje miRNA pokazalo se neučinkovitim. Neki pacijenti su imali teške nuspojave, a njihov uzrok je bilo teško procijeniti zbog svih interakcija u kojima bi testirana miRNA mogla sudjelovati. Kako bi se mogla nastaviti klinička ispitivanja mora se razumjeti cijela regulatorna mreža.

Nekoliko izvješća pokazalo je da se tumori mogu učinkovito suzbiti ili utišavanjem pro-kancerogene miRNA ili ekspresijom anti-kancerogene miRNA. [16] Kada se sva otkrića i istraživanja zajedno uzmu u obzir, ona pokazuju da miRNA imaju ključnu ulogu u razvoju i napredovanju raka, ali nužna su daljnja istraživanja i veće razumijevanje svih regulatornih puteva kako bi se mogle premostiti prepreke i miRNA iskoristiti u dijagnostičke i terapijske svrhe.

5. ZAKLJUČAK

Tumori su novotvorine čiji rast nije usklađen s normalnim stanicama, mogu se podijeliti na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne)

U inicijaciju i progresiju tumora uključen je tumorski mikrookoliš

Na remodelaciju tumorskog mikrookoliša utječu miRNA tako što reguliraju gensku ekspresiju

Postoje onkomiR koje sudjeluju u transformaciji normalnih stanica u tumorske i anti-onkomiR koje sprječavaju takvu transformaciju

Dugogodišnjim istraživanjima i pokušajima pronalaska terapijskih meta za liječenje tumora, znanstvenici su vidjeli potencijal u miRNA koje sudjeluju u remodelaciji tumorskog mikrookoliša

miRNA cirkuliraju i u krvi te su zbog toga mogući biomarkeri za rano otkrivanje raka, potrebno je premostiti interferenciju tumorskih miRNA i onih iz krvnih stanica

Iako miRNA imaju velik potencijal i kao terapijska meta i kao biomarkeri, još uvijek postoje problemi koje je potrebno premostiti daljnjim istraživanjima kako bi se uspješno iskoristio njihov potencijal te omogućilo liječenje pacijenata s tumorom i poboljšanje kvalitete njihovog života

6. LITERATURA

1. tumor. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021.
<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=62675>
2. Nicole M. Anderson, M. Celeste Simon, The tumor microenvironment, *Current Biology*, Volume 30, Issue 16, 2020: 921-925.
3. Pan, Z., Tian, Y., Niu, G., Cao, C."Role of microRNAs in remodeling the tumor microenvironment (Review)". *International Journal of Oncology* 56.2, 2020: 407-416.
4. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-561.
5. Andrés-León, E., Cases, I., Alonso, S. et al. Novel miRNA-mRNA interactions conserved in essential cancer pathways. *Sci Rep* 7, 2017.
6. Dugeč J. Metabolizam stanica raka: [Završni rad], Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2020
7. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina*. 2020; 56(1):15.
8. Whiteside, T. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27,2008; 5904–5912.
9. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res* 8, 49, 2020.

10. Interleukin 2, Struna, Hrvatsko strukovno nazivlje, Institut za hrvatski jezik i jezikoslovlje, 2011.
<http://struna.ihjj.hr/naziv/interleukin-2/26317/>
11. Štibi S. Polimorfizam gena IL 1B i IL 10 kod karcinoma vrata maternice [Master's thesis]. Osijek: Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek; 2019
12. Kahlert, C., Kalluri, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med* 91, 2013; 431–437.
13. Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T., Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science*, 101, 2010; 2087-2092.
14. O'Brien Jacob, Hayder Heyam, Zayed Yara, Peng Chun. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 9, 2018.
15. Pan Z, Tian Y, Niu G, Cao C. Role of microRNAs in remodeling the tumor microenvironment (Review). *Int J Oncol*. 2020;56(2):407-416.
16. Luo, D., Wilson, J.M., Harvel, N. et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Transl Med* 11, 57, 2013.

17. Ivošević A. Značenje mikroRNA u razvoju kronične bubrežne bolesti [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2018.
18. Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer*. 2012;3:432-448.
19. Farazi, T.A., Spitzer, J.I., Morozov, P. and Tuschl, T., miRNAs in human cancer. *J. Pathol.*, 223, 2011; 102-115.
20. Aditya Ganju, Sheema Khan, Bilal B. Hafeez, Stephen W. Behrman, Murali M. Yallapu, Subhash C. Chauhan, Meena Jaggi, miRNA nanotherapeutics for cancer, *Drug Discovery Today*, Volume 22, Issue 2, 2017, 424-432.
21. T. Editors of Encyclopaedia. tumour. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/tumor>
22. Giraldo, N.A., Sanchez-Salas, R., Peske, J.D. et al. The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer* 120, 2019, 45–53.
23. Barberić T. Vanstanične vezikule i njihova uloga u bolestima [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2017
24. Jan A, Rahman S, Khan S, Tasduq S, Choi I. Biology, Pathophysiological Role, and Clinical Implications of Exosomes: A Critical Appraisal. *Cells*. 2019 Jan 29;8(2):99.
25. Wang Z, Tan Y, Yu W, Zheng S, Zhang S, Sun L, Ding K. Small role with big impact: miRNAs as communicators in the cross-talk between

- cancer-associated fibroblasts and cancer cells. *Int J Biol Sci.* 2017 Feb 25;13(3):339-348.
26. Yang, F., Ning, Z., Ma, L. et al. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer* 16, 148 (2017).
 27. Wu, W., Sun, M., Zou, G.-M. and Chen, J. (2007), MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int. J. Cancer*, 120: 953-960.
 28. Sempere, L. F., Azmi, A. S., & Moore, A. microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 12 (6), 2021.
 29. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, Gong Z, Zhang S, Zhou J, Cao K, Li X, Xiong W, Li G, Zeng Z, Guo C. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 8(5), 2017, 761-773.
 30. Mezawa, Y., Orimo, A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res* 365, 675–689 (2016).
 31. Peng, Y., Croce, C. The role of MicroRNAs in human cancer. *Sig Transduct Target Ther* 1, 15004 (2016).

7. ŽIVOTOPIS

Ana Pejić

✉ E-adresa: apejic743@gmail.com

Spol: Žensko Datum rođenja: 30/08/2000 Državljanstvo: hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[01/09/2015 – 15/06/2019] **Srednja škola Ivan Švear, gimnazija**

Adresa: Ivanić-Grad, Hrvatska

[01/10/2019 – Trenutačno] **Biotehnologija i istraživanje lijekova**

Adresa: Rijeka, Hrvatska

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici: engleski

DIGITALNE VJEŠTINE

Moje digitalne vještine

MS OFFICE - napredna upotreba

KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

Komunikativna, sklona timskom radu