

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija M. Cumbo Stikić

Ekspresija, aktivacija i uloga trombina u progresiji  
kolorektalnog karcinoma čoveka

Doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija M. Cumbo Stikić

Expression, activation and role of thrombin in  
progression of colorectal cancer in humans

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026.

MENTORI:

dr Branko Tomić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Goran Brajušković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr Dušanka Savić Pavićević, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

dr Valentina Đorđević, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

---

dr Dušan Ušjak, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

---

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

## Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u Grupi za molekularnu biologiju hemostaze, Laboratorije za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Iskrenu zahvalnost izražavam svim kolegama sa Instituta, na svojoj podršci i pomoći tokom rada.

Profesorima dr Dušanki Savić Pavićević i dr Goranu Brajuškoviću veliko hvala prenetom znanju tokom studiranja, kao i na svim savetima i komentarima za unapređenje ove disertacije.

Zahvaljujem se svom mentoru dr Branku Tomiću na strpljenju, poverenju i podršci. Dr Valentini Đorđević, rukovodnicu grupe, hvala na prilici za rad, na trudu i zalaganju i svojoj stručnoj pomoći.

Koleginici Mariji Švrtlih hvala na eksperimentalnoj pomoći za sekvenciranje transkriptoma. Kolegama iz Centra za sekvenciranje genoma i bioinformatiku, Mariji Lazić i Mateji Iliću, veliko hvala na pomoći oko obrade bioinformatičkih podataka.

Posebnu zahvalnost dugujem svim bivšim i sadašnjim članovima grupa proizašlih iz nekadašnje Laboratorije za molekularnu biologiju, u kojoj sam ovu disertaciju započela. Ako bih svakoga pojedinačno navodila, ova zahvalnica bi zahtevala posebno poglavlje. Tako da, neizmerno vam hvala svima, na brojnim rečima i delima pomoći i podrške tokom svih ovih godina. Svakako, zasebno se moram zahvaliti Emiliji Milošević i Bojanu Iliću, na nesebičnoj pomoći oko eksperimenata sa zebricama.

Naročitu zahvalnost dugujem članovima svoga tima:

Dušanu Ušjaku, veliko hvala na svim komentarima tokom izrade disertacije, i na svežim idejama koje donosi u naš tim. Martini Mii Mitić, hvala na ogromnoj količini energije i optimizma koju deli sa nama od kad je došla. Takođe, hvala puno na svojoj pruženoj pomoći u toku izrade ove disertacije.

Maji Gvozdenov, iako više nije naš član zvanično, to je i dalje u našim očima. Hvala na svakoj reči utehe, pohvale i kritike, na podeljenom znanju i predivnom prijateljstvu.

Najposebniju, neizmernu zahvalnost dugujem koleginici i prijateljici Sofiji Dunjić Manevski, mom Semu, bez koje ovu tezu nikada ne bih izgurala do kraja. Hvala na svakom podeljenom trenutku sreće, tuge, ushićenosti, straha i mnogo toga drugog. Tvoje prijateljstvo je jedna od najvrednijih stvari koju mi je doktorat doneo, bilo je zadovoljstvo raditi i učiti sa tobom i od tebe.

Mojoj ZP ekipici, Kiki, Mici i Dinu, hvala što su verovali u mene od "najmanjih" nogu, i na razumevanju kad nestanem u poslu i obavezama pa se ne javljam nedeljama.

Mojim dragim Zemuncima, mojoj Socijali, hvala na prijateljstvu i podršci u godinama kada smo otkrivali i gradili sebe, kao i sada kada smo "porasli". Posebno hvala mojim doktorkama molekulima Emici i kumi Ivani, s kojima me sudbina prepliće kroz sve sfere mog života već skoro dve decenije, i koje su mi sve to vreme nezamenljivi izvor podrške, inspiracije i mira.

Mojim dragim Stikićima, hvala na višegodišnjoj podršci i podstreku!

Mojim roditeljima, Borinki i Momčilu, hvala na poverenju i slobodi da pravim sopstvene izbore od početka svog školovanja. Sve što sam ikada postigla dugujem vašem trudu i zalaganju, a sve što danas jesam dugujem ljubavi koju ste mi pružili. Baki Milki, hvala što mi je svojim rečima ponosa, kada bi drugima pričala o meni, davala poleta da je učinim još ponosnijom. Mojoj sestri Ani, mom "negativu" i mom odrazu, hvala što mi je uvek bila podstrek da budem nečiji uzor, ali i što je bila moj uzor da budem odvažnija i da više verujem u sebe.

Mom suprugu Milanu, hvala na svemu što umem i ne umem izreći. Tvoja vera u mene, podrška i ljubav su najjači oslonac u ovoj naučno-istraživačkoj avanturi, ali i u svemu ostalom. Mom sinu Vukašinu, hvala na neopisivoj radosti i ljubavi koju je uneo u moj život.

*Ovu tezu posvećujem svojim roditeljima.*

### Sažetak

Veza između tromboze i maligniteta poznata je više od jednog veka. Pored ključne uloge u hemostazi, faktori koagulacije mogu doprineti razvoju malignih bolesti delovanjem na tumorske ćelije. Trombin, centralni enzim koagulacione kaskade, stimuliše proliferaciju, migraciju i invazivnost ćelija. Njegov prekursor protrombin, osim u jetri, može biti eksprimiran i u tumorskim ćelijama. Kolorektalni karcinom (KRK) predstavlja jedan od najčešćih malignih tumora i vodeći uzrok smrtnosti od malignih bolesti u razvijenim zemljama.

Cilj ove disertacije bio je ispitivanje ekspresije i aktivacije protrombina, kao i efekata protrombina, trombina i dabigatrana na progresiju KRK. U uzorcima KRK analiziran je 3' kraj gena za protrombin u tumorskom i neizmenjenom okolnom tkivu, i urađena bioinformatička obrada podataka transkriptoma radi procene diferencijalne ekspresije odabranih gena. U ćelijskim linijama KRK ispitivani su ekspresija protrombina i PAR-1 receptora, aktivacija protrombina, kao i efekti protrombina, trombina i dabigatrana primenom MTT testa, eseja zarastanja povrede i angiogeneze. Dodatno, na modelu zebrice procenjivan je uticaj trombina i dabigatrana na razvoj ksenografta KRK.

Rezultati ukazuju na moguće promene genotipa 3' kraja gena za protrombin i ekspresije PAR receptora tokom tumorigeneze. Potvrđena je ekspresija i aktivacija protrombina *in vitro*, pri čemu je pokazano da protrombin inhibira proliferaciju, migraciju i angiogenezu, dok trombin stimuliše proliferaciju ćelija KRK, a dabigatran inhibira taj efekat. Efekat na razvoj ksenografta *in vivo* nije potvrđen.

Dobijeni rezultati doprinose boljem razumevanju uloge pro/trombina u patogenezi KRK i ukazuju na potencijalni prognostički značaj i terapijsku primenu dabigatrana.

Ključne reči: hemostaza, protrombin, trombin, maligna oboljenja, kolorektalni karcinom

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

### Abstract

The thrombosis and malignancy link has been known for over a century. Beside the role in hemostasis, coagulation factors can aid malignant disease development by acting on tumor cells. Thrombin, the central coagulation cascade enzyme, stimulates cell proliferation, migration and invasion. Its precursor prothrombin, beside the liver, can also be expressed in tumor cells. Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most common malignancies and major cause of cancer-related death in developed countries.

The aim of this dissertation was to investigate the expression and activation of prothrombin, and the effects of prothrombin, thrombin and dabigatran on CRC progression. In CRC samples, the 3' end of prothrombin gene was analyzed in tumor and normal adjacent tissue, and transcriptome data was bioinformatically processed to assess differential gene expression. In CRC cell lines, prothrombin and PAR-1 receptor expression and prothrombin activation were investigated, as well as the effects of prothrombin, thrombin and dabigatran using the MTT test, wound healing assay and angiogenesis assay. The influence of thrombin and dabigatran on CRC xenograft development was assessed in a zebrafish model.

Results indicate possible changes in prothrombin gene 3' end genotype and PAR receptor expression during tumorigenesis. The expression and activation of prothrombin was confirmed *in vitro*. Prothrombin inhibits proliferation, migration and angiogenesis, while thrombin stimulates CRC cell proliferation, and dabigatran inhibits this effect. The effect on xenograft development *in vivo* was not confirmed.

Obtained results contribute to a better understanding of pro/thrombin role and indicate a potential prognostic significance in CRC pathogenesis, as well as therapeutic application of dabigatran.

Key words: hemostasis, prothrombin, thrombin, malignant diseases, colorectal cancer

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

## Skraćenice

AK – aminokiselina  
bp – bazni par  
BSA – albumin goveđeg seruma, eng. *Bovine Serum Albumin*  
CI – interval poverenja, eng. *Confidence Interval*  
CIMP - fenotip nastao metilacijom CpG ostrvaca, eng. *CpG island methylator phenotype*  
CIN - hromozomska nestabilnost, eng. *chromosomal instability*  
CMS - konsenzusni molekularni podtip, eng. *consensus molecular subtype*  
DMEM – eng. *Dullbecco's Modified Minimum Essential Medium*  
DMSO – dimetilsulfoksid  
DNB – eng. *DNA Nano-Ball*  
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina  
dpi - dan nakon injektiranja ćelija, eng. *day post injection*  
DSE - eng. *Downstream Sequence Element*  
EĆM - ekstraćelijski matriks  
EDTA – etilendiaminotetraacetat  
ELISA – enzimski imunosorbentni esej, eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
EMT - epitelno-mezenhimalna tranzicija, eng. *epithelial–mesenchymal transition*  
ER – reakcija popravljanja krajeva, eng. *End Repair*  
F1+2 – fragment 1+2  
FAIR - eng. *Findable, Accessible, Interoperable and Reusable*  
FAP - familijalna adenomatozna polipoza  
FBS – fetalni goveđi serum, eng. *Fetal Bovine Serum*  
FCL – protočna ćelija, eng. *Flow Cell*  
FDR – eng. *False Discovery Rate*  
FE – fosfatidiletanolamin  
FII – koagulacioni faktor II, protrombin  
FS – fosfatidilserin  
GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, eng. *glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase*  
GFP - zeleni fluorescentni protein, eng. *Green Fluorescent Protein*  
GPCRs - G-proteinom kuplovani receptori, eng. *G-Protein Coupled Receptors*  
GSEA - eng. *Gene Set Enrichment Analysis*  
GWAS - studija asocijacije na celom genomu, eng. *Genome Wide Association Study*  
HAT – natrijum hipoksantin, aminopterin i timidin  
HGNC - eng. *HUGO Gene Nomenclature Committee*  
HNF – jedarni faktor hepatocita, eng. *Hepatocyte Nuclear Factor*  
HNPC naslednog nepolipoznog KRK, eng. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*  
HRP – peroksidaza rena, eng. *Horseradish Peroxidase*  
IBD – inflamatorna bolest creva, eng. *Inflammatory Bowel Disease*  
iRNK – informaciona RNK  
KM – kondicionirani medijum  
KRK - kolorektalni karcinom  
LA – *Luria Agar*  
LB – *Luria-Bethani Broth*  
LMWH - nisko molekulski heparin, eng. *Low Molecular Weight Heparin*  
LOH - gubitak heterozigotnosti, eng. *loss of heterozygosity*  
MET - mezenhimalno-epitelna tranzicija, eng. *mesenchymal-epithelial transition*  
MMP - matriksne metaloproteinaze, eng. *Matrix Metalloproteinases*  
MMR - eng. *mismatch repair*  
MSI - mikrosatelitska nestabilnost, eng. *microsatellite instability*  
MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolijum bromid

NOT – neizmenjeno okolno tkivo  
OD – optička gustina, eng. *Optical Density*  
PAR – proteazama aktivirani receptor, eng. *Protease Activated Receptor*  
PC – protein C  
PCA – analiza osnovnih komponenti, eng. *Principal Component Analysis*  
PCR – lančana reakcija polimeraze, eng. *Polimerase Chain Reaction*  
PS – protein S  
qPCR - metodom PCR-a u realnom vremenu, eng. *Real-Time PCR, Quantitative PCR*  
RCA - amplifikacija “po kotrljajućem obruču” eng. *Rolling Circle Amplification*  
RT – reverzna transkripcija  
SBS – sekvenciranje sintezom, eng. *Sequencing By Synthesis*  
SDS-PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu sa natrijum dodecil sulfatom, eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*  
Sp – proteini specifičnosti, eng. *Specificity Protein*  
TEMED – tetrametiletilendiamin  
TF – tkivni faktor, eng. *Tissue Factor*  
TM - Tumorsko mikrokruženje  
TNM - eng. *Tumor, Node, Metastasis*  
TT – tumorsko tkivo  
USE – eng. *Upstream Sequence Element*  
UTR - netranslatirajući region, eng. *untranslated region*  
VEGF - vaskularni endotelni faktora rasta, eng. *Vascular endothelial growth factor*  
VTE – venski tromboembolizam  
WT – divlji soj, eng. *Wild-type*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Hemostaza .....	1
1.1.1. Trombofilija .....	2
1.1.2. Hemostaza i maligna oboljenja .....	3
1.2. Protrombin .....	4
1.2.1. Gen za protrombin .....	4
1.2.2. Struktura i aktivacija proteina .....	5
1.2.3. Uloga pro/trombina .....	7
1.2.3.1. Uloga trombina u hemostazi .....	8
1.2.3.2. Uloga trombina kao signalnog molekula kroz aktivaciju PAR receptora .....	9
1.2.3.3. Trombin i maligna oboljenja .....	10
1.3. Kolorektalni karcinom (KRK) .....	13
1.3.1. Etiologija i klasifikacija KRK .....	13
1.3.2. Etiopatologija i molekularna genetika KRK .....	13
1.3.3. Trombin u razvoju KRK .....	15
2. CILJEVI .....	17
3. MATERIJAL I METODE .....	18
3.1. Eksperimentalni materijal .....	18
3.1.1. Uzorci humanog tkiva .....	18
3.1.2. Bakterijski sojevi .....	18
3.1.3. Plazmidni vektori .....	18
3.1.4. Čelijske linije .....	19
3.1.5. Zebrice (lat. <i>Danio rerio</i> ) .....	20
3.1.6. Oligonukleotidi .....	20
3.1.7. Antitela .....	20
3.2. Metode .....	21
3.2.1. Analize na uzorcima humanog porekla .....	21
3.2.1.1. Izolacija molekula genomske DNK iz uzoraka tkiva .....	21
3.2.1.2. Umnožavanje molekula DNK metodom PCR .....	21
3.2.1.3. Kloniranje ciljne sekvence u plazmidni vektor .....	22
3.2.1.3.1. Kultivacija bakterija .....	22
3.2.1.3.2. Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija .....	22
3.2.1.3.3. Izolovanje molekula plazmidne DNK .....	23
3.2.1.4. Sekvenciranje molekula DNK .....	24

3.2.1.5. Analiza diferencijalne ekspresije gena korišćenjem podataka iz javno dostupnih baza .....	24
3.2.2. Analize na permanentnim ćelijskim linijama .....	26
3.2.2.1. Gajenje ćelija.....	26
3.2.2.2. Analiza ekspresije i aktivacije protrombina.....	27
3.2.2.2.1. Tretmani ćelija u kulturi protrombinom.....	27
3.2.2.2.2. Izolacija RNK iz ćelija u kulturi.....	27
3.2.2.2.3. Sinteza molekula cDNK.....	27
3.2.2.2.4. Kvantifikacija genske ekspresije metodom PCR-a u realnom vremenu .....	28
3.2.2.2.5. Određivanje diferencijalne ekspresije ciljnih gena metodom RNASeq.....	29
3.2.2.2.6. Prikupljanje medijuma i izolacija proteina iz ćelija u kulturi .....	30
3.2.2.2.7. Merenje koncentracije ukupnih proteina .....	30
3.2.2.2.8. ELISA eseji .....	31
3.2.2.2.9. Western blot .....	31
3.2.2.2.10. Određivanje enzimske aktivnosti primenom fluorescentnog supstrata .....	32
3.2.2.3. MTT esej .....	33
3.2.2.4. Test zarastanja povrede.....	34
3.2.2.5. Efekat tretmana na proces angiogeneze .....	35
3.2.3. Analize na model sistemu zebrice .....	36
3.2.3.1. Gajenje i mrešćenje zebrica .....	36
3.2.3.2. Inokulacija ćelija KRK u embrione zebrica.....	36
3.2.4. Statistička analiza podataka .....	37
4. REZULTATI.....	38
4.1. Rezultati analize 3' kraja gena za protrombin kod obolelih od kolorektalnog karcinoma.....	38
4.2. Rezultati analize ekspresije ciljnih gena iz javno dostupnih baza.....	40
4.3. Rezultati analize ekspresije protrombina i PAR1 <i>in vitro</i> .....	48
4.4. Rezultati ispitivanja aktivacije protrombina u trombin.....	50
4.5. Rezultati ispitivanja efekata protrombina <i>in vitro</i> .....	52
4.5.1. Rezultati uticaja protrombina na vijabilnost i proliferaciju ćelija KRK.....	52
4.5.2. Rezultati uticaja protrombina na migraciju ćelija KRK .....	54
4.5.3. Rezultati uticaja protrombina na angiogeni potencijal ćelija KRK.....	58
4.5.4. Rezultati uticaja tretmana protrombinom na ekspresiju gena u KRK ćelijskim linijama	60
4.6. Rezultati ispitivanja efekata trombina i dabigatrana <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	66
4.6.1. Rezultati uticaja trombina i dabigatrana na vijabilnost i proliferaciju ćelija KRK .....	66
4.6.3. Rezultati uticaja trombina i dabigatrana na migraciju ćelija KRK.....	70
4.6.4. Rezultati uticaja trombina i dabigatrana na KRK ćelije <i>in vivo</i> .....	76

5. DISKUSIJA .....	78
6. ZAKLJUČCI.....	88
7. LITERATURA.....	89

# 1. UVOD

## 1.1. Hemostaza

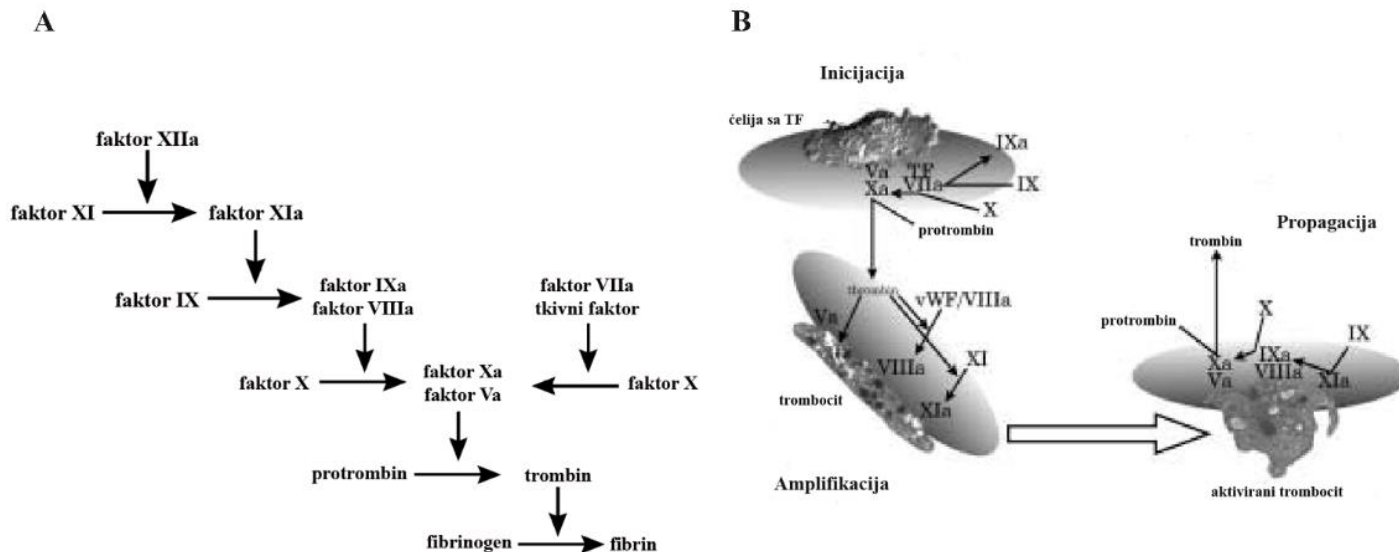
Hemostaza je fiziološki mehanizam koji balansom prokoagulantnih i antikoagulantnih procesa održava tečno stanje krvi i sprečava njen gubitak u slučaju povrede, čime doprinosi održanju celokupne homeostaze organizma (1).

Prvobitno opisan šezdesetih godina prošlog veka, kaskadni model koagulacione kaskade je podrazumevao serijsku aktivaciju koagulacionih faktora na mestu povrede i produkciju trombina, koji prevodi solubilni fibrinogen u nesolubilni fibrin. Obuhvatao je dva nezavisna puta aktivacije faktora - intrinzični i ekstrinzični (2,3). Iako je ovaj model doprineo dubljem razumevanju koagulacije i razviću laboratorijskih testova, nije mogao da omogući precizno razumevanje hemostaze *in vivo*, kao i ulogu ćelija u hemostazi.

Danas prihvaćeni ćelijski model (eng. *cell based*) koagulacione kaskade je opisan kroz tri stupnja - inicijacija, amplifikacija i propagacija (4). Doprinos ovog modela u odnosu na prethodni je u tome što uključuje i ulogu ćelija u procesu regulacije hemostaze i pokretanju koagulacione kaskade. Dodatno, ovaj model ukazuje i na to da koagulacioni enzimi, iako deo kaskade, mogu imati i uloge u drugim procesima.

- **Inicijacija.** Prilikom povrede krvnog suda, tkivni faktor (TF) eksprimiran u ćelijama koje se inače nalaze izvan lumena krvnih sudova, dolazi u kontakt sa koagulacionim faktorima u krvotoku. Prevedeno dolazi u kontakt sa faktorom VIIa (FVIIa), koji konstantno cirkuliše u aktivnoj formi (oko 1% ukupnog FVII) (5). Ovo rezultira daljim aktiviranjem faktora koji omogućavaju prevođenje manje količine neaktivnog protrombina u trombin. Opisani proces se dešava na površini ćelija koje ekspimiraju TF (4,6). Još jedna važna uloga ćelija u pokretanju koagulacije je i njihova negativno naelektrisana membrana, sa fosfatidilserinom (FS) i fosfatidiletanolaminom (FE), koja omogućava optimalno odvijanje reakcija aktivacije koagulacionih proteina (7).
- **Amplifikacija.** Trombin generisan u stupnju inicijacije difunduje sa ćelijske membrane od koje počinje inicijacija, i aktivira krvne pločice prisutne na mestu povrede. Aktivacijom krvnih pločica se omogućava formiranje tenaznog (FVIIIa/IXa) i protrombinaznog (FVa/Xa) kompleksa, koji dovode do povećane aktivacije protrombina u trombin (4,6).
- **Propagacija.** Nakon amplifikacije, dolazi do brzog porasta u produkciji trombina, upravo na površini aktiviranih krvnih pločica. Ovo za posledicu ima povećanu aktivaciju i agregaciju krvnih pločica na mestu povrede, kao i prevođenje fibrinogena u fibrin, čime se stvara ugrušak (6).

Šema oba modela prikazana je na **Slici 1**.



**Slika 1.** Šema kaskadnog (A) i ćelijskog (B) modela koagulacione kaskade. Slika preuzeta i modifikovana iz Hoffman et al., 2001 (4).

### 1.1.1. Trombofilija

Hemostaza je dinamičan proces, sačinjen od velikog broja činilaca, i narušavanje njihove strukture, funkcije i interakcija može dovesti do poremećaja ravnoteže. Disbalans u smeru hipokoagulacije za posledicu ima sklonost ka krvarenju (hemoragijska dijateza), dok u smeru hiperkoagulacije za posledicu ima sklonost ka razviću tromboza (trombofilija) (1).

Trombofilija predstavlja patološko stanje hemostaze koje se manifestuje kroz povećanu sklonost ka nastanku tromboze, tj. stvaranju krvnog ugruška (tromba) u krvnom sudu. U odnosu na mesto nastanka tromboze mogu biti arterijske, od kojih su najčešći moždani udar i infarkt miokarda, i venske, od kojih su najčešće tromboze dubokih vena i plućni embolizam (8).

Trombofilija može biti stečena i nasledna. Stečena trombofilija se može razviti dejstvom različitih spoljašnjih faktora, u određenim fiziološkim stanjima ili usled različitih oboljenja. Najčešći faktori rizika kod arterijskih tromboza su hipertenzija, dijabetes, hiperholesterolemija i pušenje, dok su kod venskih tromboza primena oralnih kontraceptiva, trudnoća i puerperijum, starost, povrede, hirurške intervencije, mirovanje i infekcije (9).

Nasledne trombofilije su poremećaji zgrušavanja krvi uslovljeni postojanjem genetičke predispozicije pojedinca ka hiperkoagulaciji (10). Varijante koje predstavljaju faktore rizika najčešće se nalaze u genima koji kodiraju za:

- Inhibitore koagulacije, usled čije deficijencije je smanjena inhibicija koagulacije (deficijencije antitrombina III, proteina S i proteina C) (11),
- Prokoagulantne faktore, čime dolazi do povećanja količine proteina ili smanjenja njihove inhibicije (najznačajnije varijante su FV G1691A i FII G20210A) (12,13). U ovu grupu spadaju i novije opisani oblici nasledne trombofilije, poput rezistencije na antitrombin, kojoj pripada i varijanta Protrombin Beograd FII c.1787G>A, identifikovana u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (14).
- Faktore fibrinolitičkog sistema, čime se narušava fibrinoliza (PAI-1 4G/5G) (15).

### 1.1.2. Hemostaza i maligna oboljenja

Postojanje veze između tromboza i tumora poznato je već dva veka. Prvu pretpostavku o njenom postojanju objavio je francuski lekar Žan Batist Bujo 1823. godine (16), a šezdesetih godina devetnaestog veka francuski lekar Arman Truso je i opisao (17). On je uočio da ponavljajući migratorni tromboflebitisi (upala krvnih sudova sa trombozom) mogu biti znak postojanja malignog tumora u organizmu. Ovaj fenomen nazvan je po njemu Trusoov znak maligniteta ili Trusoov sindrom (18). Igram sudbine, ovaj lekar će navedeni simptom uočiti i kod sebe, nakon čega mu je dijagnostikovao rak želuca, od koga je i umro (19).

Tromboze su među prvim kliničkim manifestacijama i drugi vodeći uzrok smrti kod pacijenata sa malignitetom (20). Kod obolelih, rizik od razvića tromboza je povećan od 4 do 7 puta u poređenju sa zdravom populacijom, i oni čine oko 20% svih pacijenata sa trombozama (21,22). Smrtnost obolelih od maligniteta koji razviju trombozu dva do tri puta je veća u odnosu na obolele koji je ne razviju. Dodatno, prisustvo drugih komorbiditeta, poput prethodnih trombotičkih događaja, gojaznosti ili infekcija, dodatno doprinosi riziku razvića tromboza (23). Verovatnoća da će doći do komplikacija vezanih za tromboze zavisi i od tipa maligniteta i njegove uznapredealosti. Kada su u pitanju solidni tumori, najveće incidence su kod maligniteta mozga, pankreasa, gastrointestinalnog trakta, pluća i jajnika, ali i kod hematoloških maligniteta (24,25). Dodatnu komplikaciju i rizik od tromboza nose terapije poput hirurške intervencije, radijacije, hemio- ili hormonske terapije, koje mogu izazvati oštećenja endotela, ekspresiju tkivnog faktora ili oslobađanje prokoagulantnih mikrovezikula (26,27).

Kod pacijenata sa malignim oboljenjima često se uočava prisustvo hiperkoagulabilnog stanja, a laboratorijski rezultati pokazuju veoma aktivan proces nastanka i uklanjanja fibrina. Povratno, upravo hiperkoagulabilno stanje može dodatno podsticati rast tumora i metastaziranje (28).

U fiziološkim uslovima, za pokretanje koagulacione kaskade potreban je kontakt TF-a, prisutnog na subendotelnim ćelijama, i faktora prisutnih u krvi. Međutim, pored subendotelnih, i neke cirkulišuće ćelije mogu eksprimirati TF, poput monocita i neutrofila, a može se pronaći i u mikrovezikulama poreklom sa različitih tipova ćelija (29). U fiziološkim uslovima, postranslacionim modifikacijama ovoj intravaskularnoj formi proteina je inhibirana prokoagulaciona aktivnost, dok se ne steknu uslovi za aktivaciju (30). Ovo može biti izmenjeno upravo prisustvom patološkog stanja poput infekcije, prethodnog postojanja tromboza ili malignog oboljenja (31). Maligne ćelije mogu eksprimirati TF, ali i oslobađati mikropartikule na čijoj membrani je prisutan TF, koje potom mogu izazivati pojavu tromboza (32).

Osamdesetih godina prošlog veka, Harold Dvorak iznosi hipotezu u čijoj osnovi počiva potencijal faktora hemostaze da doprinose rastu tumora. Ovaj autor ukazuje na sličnosti formiranja tumorske strome sa procesom zarastanja rana, i tumore predstavlja kao „rane koje ne zarastaju” (33). Povećana ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) je odlika većeg broja malignih tumora (34), a i prisutan je u procesu zarastanja rana (35). Ovaj faktor omogućava povećanje permeabilnosti endotela krvnih sudova unutar tumora, i izlazak proteina plazme van krvnih sudova, što omogućava formiranje fibrinske mreže, zahvaljujući interakciji sa TF na membrani tumorskih ćelija. U prilog ovoj hipotezi ide činjenica da su primećeni depoziti fibrina u solidnim tumorima (36,37).

Sposobnost maligne ćelije da eksprimira TF i pokrene koagulacionu kaskadu, smatra se jednim od najranijih događaja u procesu onkogeneze različitih tipova tumora, poput glioma, karcinoma pankreasa, dojke i debelog creva (38–40). Osim formiranja fibrinskog matriksa, koji može služiti kao podloga za vezivanje i interakciju malignih ćelija sa različitim faktorima rasta i drugim ćelijama u tumorskoj mikrosredini, aktivacijom koagulacione kaskade doprinosi se i pokretanju signalnih puteva koji utiču na rast i remodelovanje tumora (41). Dodatno, trombociti i fibrin mogu formirati zaštitni omotač oko tumorskih ćelija u cirkulaciji, čime omogućavaju zaštitu od imunskog sistema, kao i efikasnije vezivanje

za endotel i ekstravazaciju u sekundarna tkiva i organe (42). Bitnu ulogu u ovim procesima može ostvarivati trombin, što će detaljnije biti navedeno u sledećim poglavljima.

Tromboze dodatno komplikuju pristupe u lečenju pacijenata obolelih od malignih bolesti. Kod pacijenata koji razviju trombozu, najčešće se primenjuje terapija nisko molekulskim heparinom (eng. *Low Molecular Weight Heparin*, LMWH), indirektnim inhibitorom aktiviranog faktora X (FXa) i trombina (43). Ova terapija je dodatno podržana ispitivanjima koja su pokazala da primena antikoagulantnih lekova poput LMWH ne samo što ima preventivni efekat na razvoj tromboze kod obolelih, nego i usporava progresiju same bolesti. Takođe, uočeno je i da je dugogodišnja primena antikoagulantne terapije varfarinom, koji inhibicijom enzima VKORC1 ometa gama karboksilaciju koagulacionih faktora, povezana sa smanjenom incidencom određenih tipova tumora poput prostate i debelog creva (44,45). Međutim, antikoagulantna terapija može dovesti i do povećanog rizika od krvarenja kod obolelih, zbog čega su potrebna dodatna ispitivanja o značaju ove terapije kod obolelih od malignih bolesti koji nisu razvili trombozu (46).

## 1.2. Protrombin

### 1.2.1. Gen za protrombin

Protrombin ili koagulacioni faktor II (FII), ključni je činilac koagulacione kaskade, čijom se aktivacijom u trombin (FIIa) omogućava prevođenje fibrinogena u fibrin i formiranje ugruška (1).

Gen za protrombin (*F2*) kod čoveka smešten je na hromozomu 11 u regionu p11-q12. Kompletna sekvenca gena iznosi približno 20,3 kb i sačinjena je od 14 egzona (dužine 25-315 bp) i 13 introna (dužine 84-9447 bp) (47). Gen za protrombin odlikuje visok procenat ponavljajućih sekvenci. Najčešći tip su Alu sekvence, dok je zabeleženo i prisustvo Kpn I ponovaka i nekoliko MER ponavljajućih sekvenci (1).

Protrombin spada u grupu vitamin K zavisnih koagulacionih faktora kojima je zajedničko odusustvo kanonskih TATA i CCAAT sekvenci u okviru promotora. Regulacija ekspresije vrši se pomoću dva mesta za inicijaciju transkripcije koja se nalaze na pozicijama -36 i -20 bp uzvodno od mesta za inicijaciju translacije, i imaju različit uticaj na njegovu ekspresiju (47,48). Jedan regulatorni element održava bazalnu aktivnost promotora, dok drugi određuje tkivno-specifičnu ekspresiju u jetri. Ovaj regulatorni element predstavlja mesto vezivanja jedarnih faktora hepatocita (eng. *Hepatocyte Nuclear Factor*, HNF), odgovornih za regulaciju ekspresije različitih gena u jetri, kao i regulatornih proteina transkripcije Sp (proteini specifičnosti, eng. *specificity protein*) (49,50).

Za razliku od velikog broja gena kod sisara, 3' kraj gena za protrombin ima nekanosku organizaciju. Odlikuju ga prisustvo aktivnijeg USE elementa (eng. *Upstream Sequence Element*), kao i smanjena efikasnost elemenata za proces obrade 3' kraja, gde spadaju mesto iskrajanja i DSE regulatorni element (eng. *Downstream Sequence Element*) siromašan timinima. Upravo ovakva organizacija ovaj region čini potencijalnim mestom nastanka varijanti koje mogu dovesti do povećanja ekspresije protrombina (51). Neke genske varijante opisane u ovom regionu za posledicu imaju povećanu ekspresiju protrombina i predstavljaju faktor rizika za nastanak tromboza. Najbolje opisana, varijanta FII G20210A (FII c. \*97G>A) dovodi do zamene G u A na mestu isecanja primarnog transkripta, čime se pospešuje proces iskrajanja i poliadenilacije pre-iRNK i posledično povećava ekspresija protrombina. Ova varijanta kod nosilaca povećava rizik za pojavu venskih tromboza 2-4 puta, i zbog toga spada u sastavni deo testova za naslednu trombofiliju (13).

Gen za protrombin se eksprimira predominantno u jetri, a u manjoj meri i u mozgu, bubrezima, dijafragmi, placenti i tkivu nadbubrežne žlezde (52). Informaciona RNK (iRNK) sintetisana sa ovog gena je dužine 2130 nukleotida, bez poli-A repa i sačinjena je iz prepro vodeće sekvence i sekvence koja kodira

za polipeptidni lanac (1). Prepro vodeća sekvenca daje lanac od 43 aminokiseline (AK), koji je značajan za posttranslacionu modifikaciju proteina neophodnu za pravilno funkcionisanje (53).

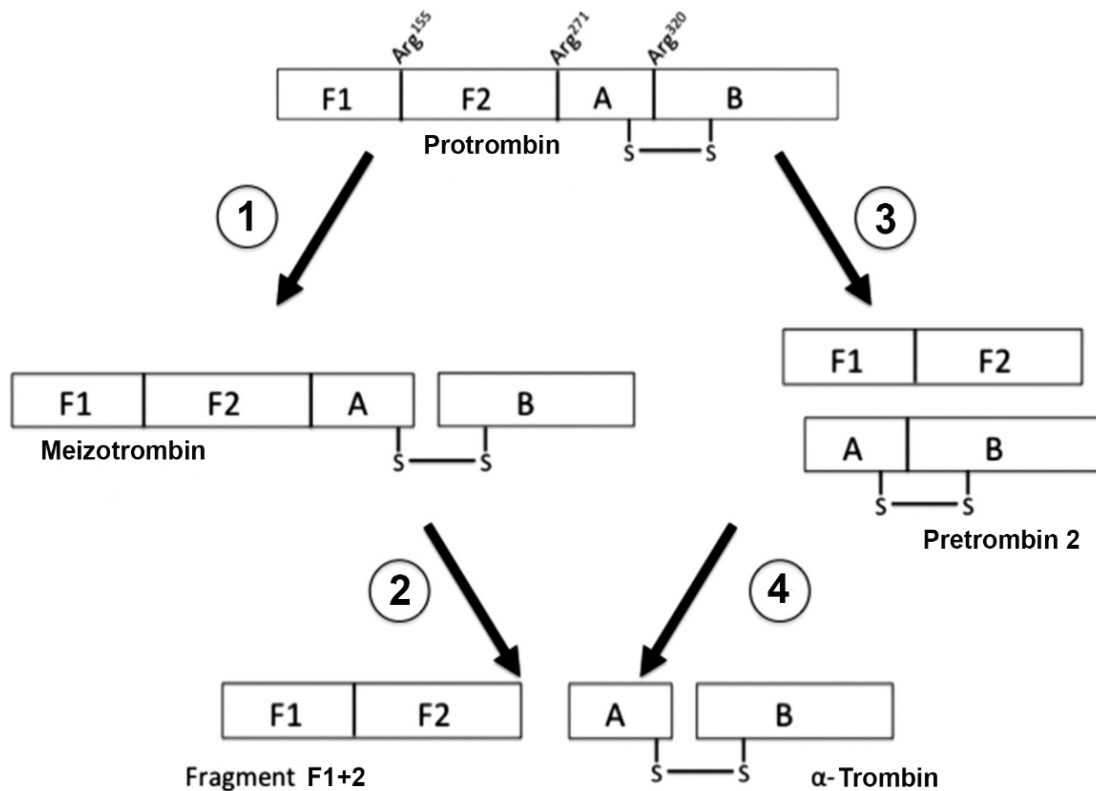
### 1.2.2. Struktura i aktivacija proteina

Humani protrombin je glikoprotein molekulske mase 72 kDa, koji pripada grupi enzima zavisnih od vitamina K. Protrombin je zimogen, predominantno eksprimiran u jetri, odakle se oslobađa u krvotok, i smatra se neaktivnom formom. U krvotoku se proteolitičkim isecanjem prevodi u aktivnu formu trombin, serin proteazu koja je jedan od ključnih regulatora hemostaze (1).

Polipeptidni lanac ljudskog protrombina sadrži 579 AK, organizovanih u nekoliko domena: N terminalni domen Gla veličine 40 AK, dva Kringl (1 i 2) domena sa po oko 80 AK, i na C terminusu laki i teški lanac, koji nakon aktivacije predstavljaju aktivni  $\alpha$ -trombin. Navedeni domeni čine tri strukturalna regiona protrombina- fragment 1, fragment 2 i proteazni domen, koji su povezni sa tri "linkera". Linker 1 povezuje Gla domen i Kringl 1 koji sačinjavaju fragment 1, linker 2 povezuje Kringl 1 sa Kringl 2 domenom, koji čini fragment 2, a linker 3 povezuje Kringl 2 domen sa lakim i teškim lancem trombina, koji čine proteazni domen (1,54).

Pravilna posttranslaciona obrada, zavisna od vitamina K, je ključna za efikasnu aktivaciju protrombina u trombin i njegovu biološku aktivnost. U slučaju nepravilne gama-karboksilacije značajno je smanjena prokoagulantna funkcija trombina (55). Prilikom biosinteze, prvo se uklanja signalni peptid sa N-kraja prepro-protrombina, i dobijena forma pro-protrombina se usmerava ka endoplazmatičnom retikulumu. U lumenu endoplazmatičnog retikuluma nalazi se enzim gama-glutamil transferaza koja u prisustvu vitamina K vrši karboksilaciju 10 AK ostataka glutaminske kiseline na N terminusu, čime se formira se Gla domen (56). Ovaj korak omogućava ostvarivanje pravilne uloge tog domena. Gla domen ostvaruje dvostruku ulogu u aktivaciji protrombina u trombin. Prvenstveno, vezujući pozitivno naelektrisane jone kalcijuma, čime se omogućava interakcija sa negativno naelektrisanim fosfolipidima membrane trombocita i drugih ćelija (57). Potom, ostvarujući interakciju sa FVa, koji je deo protrombinaznog kompleksa i neophodan za aktivaciju protrombina u trombin (58). Kringl 1 i Kringl 2 domeni takođe su značajni za vezivanje jona kalcijuma, ali i protrombinaznog kompleksa (59,60).

Aktivacija protrombina u trombin podrazumeva koordinisano i kaskadno isecanje na dva mesta, koje može da se odvija preko dva različita puta (**Slika 2.**). Pozicije na kojima se vrši isecanje su R271 koje se nalazi između fragmenta 2 i lakog A lanca, i R320 koje se nalazi između lakog A lanca i teškog B lanca (61). U slučaju aktivacije preko FXa, protrombin se prvo iseca na poziciji R271, čime nastaju fragment F1+2 i intermedijer pretrombin-2, koji ne poseduje enzimsku aktivnost. Pri sledećem koraku isecanje se vrši na poziciji R320, čime se formira aktivni  $\alpha$ -trombin u kome su dva polipeptidna lanca spojena disulfidnim mostom (61,62). Drugi put aktivacije, favorizovan u prisustvu FVa i jona  $Ca^{2+}$  (odnosno preko protrombinaznog kompleksa), podrazumeva isecanje na mestu R320, čime se formira intermedijer meizotrombin. Dobijena forma se potom iseca na mestu R271, čime se dobijaju fragment F1+2 i  $\alpha$ -trombin (61,63). Ovaj način aktivacije je i preko 300 hiljada puta brži od mehanizma preko samog FXa. Pod određenim uslovima, do isecanja protrombina može doći na mestu R155, čime se oslobađaju Gla i Kringl 1 domen, a dobija pretrombin-1. Isecanjem pretrombina-1 na poziciji R320 ili autokatalitičkim isecanjem meizotrombina na poziciji R155, dobija se forma intermedijera meizotrombin des-fragment-1, a potom isecanjem na mestu R271 i stabilna forma  $\alpha$ -trombina (61,64).



**Slika 2.** Putevi aktivacije protrombina. 1 i 4 – Isecanje na mestu R320, 2 i 3 – Isecanje na mestu R271. Slika preuzeta i modifikovana iz Haynes et al., 2012 (65).

Aktivna forma,  $\alpha$ -trombin, je protein veličine 36 kDa, i sačinjen od lakog A i teškog B lanca, povezanih nekovalentnim vezama i disulfidnim mostovima (1). Laki A lanac, veličine oko 36 AK, omogućava održanje stabilne strukture i funkcije trombina i njegovog aktivnog mesta. Teški B lanac (veličine oko 259 AK) sadrži njegov katalitički domen - katalitičku trijadu His363, Asp429 i Ser525, pomoću koje trombin ostvaruje serin-proteaznu aktivnost. Takođe, prisutna su dva anjon vezujuća mesta (eng. *exosite I*, *exosite II*) koji omogućavaju prepoznavanje različitih supstrata i inhibitora trombina, kao i  $\text{Na}^+$  vezujuće mesto, koje vrši modulaciju funkcije trombina (66). Kada je  $\text{Na}^+$  vezan, trombin zauzima "brzu formu" koja pokazuje veći afinitet ka supstratima čime se povećeva njegova prokoagulantna funkcija. Suprotno, kada  $\text{Na}^+$  nije vezan, trombin se nalazi u "sporoj formi" i ima prvenstveno antikoagulantnu funkciju (67).

Trombin se u fiziološkim uslovima nalazi neaktivan u krvotoku, u formi zimogena protrombina, i za pravilno funkcionisanje koagulacione kaskade je neophodno da katalitički i anjon vezujući domeni budu neaktivni dok se protrombin ne prevede u trombin. Novije studije ukazuju na postojanje dve forme protrombina u cirkulaciji - zatvorene i otvorene. U cirkulaciji se pretežno nalazi zatvorena forma (70%), kod koje su domeni postavljeni tako da je aktivno mesto prikriveno i onemogućeno proteolitičko isecanje. Protrombinazni kompleks preferencijalno prepoznaje ovu formu i aktivira je prevođenjem u meizotrombin. U okviru otvorene forme (prisutna oko 30%), domeni su postavljeni tako da je aktivno mesto dostupno, i aktivira se u trombin preko intermedijerne forme pretrombina-2 (68).

U određenim uslovima, može doći i do procesa autoaktivacije protrombina. Prilikom oštećenja ćelija, u cirkulaciju se mogu osloboditi histoni, koji mogu stimulisati autoaktivaciju protrombina. Vezivanjem histona H4 za Glu domen dolazi do otkrivanja R320, što omogućava autoaktivaciju (69).

Dodatno, specifičnu autoaktivaciju pokreću i određeni bakterijski sojevi. Prilikom infekcije, u uslovima bakteremije ili sepse, određeni sojevi bakterija poput *Staphylococcus aureus* imaju mogućnost oslobađanja enzima stafilokoagulaze, koji se vezuje za trombin. Ova forma se naziva stafilotrombin i svojom aktivnošću omogućava bakterijama da se zaštite od imunskog sistema tako što se ugrađuju u mrežu sačinjenu od fibrinskih vlakana i trombocita (70).

### 1.2.3. Uloga pro/trombina

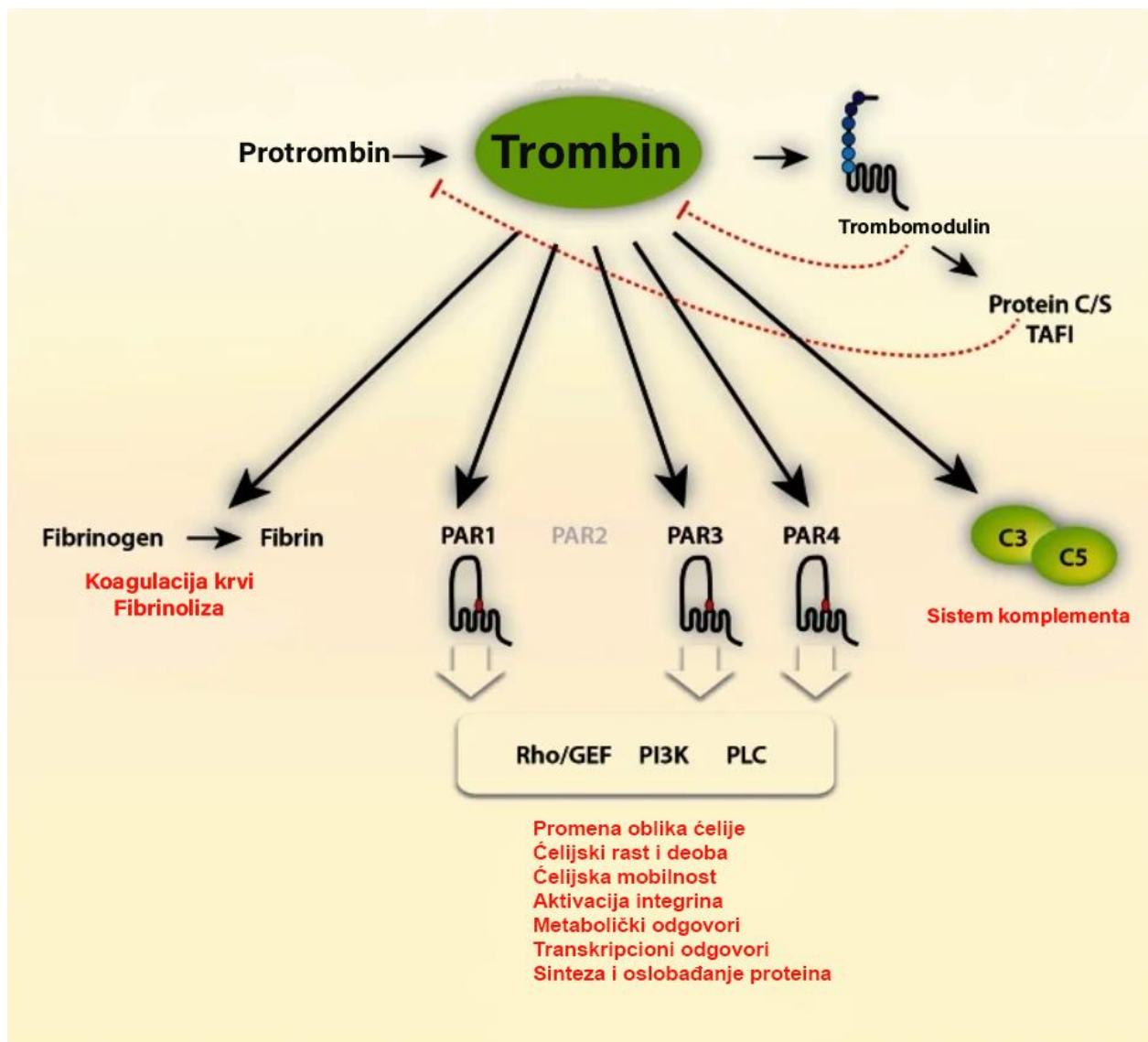
Uloga protrombina, odnosno aktivne forme trombina, prvenstveno se povezuje sa regulacijom hemostaze. Međutim, kao i mnoge proteaze, trombin je multifunkcionalni enzim koji svoje dejstvo ostvaruje i u nizu drugih procesa (**Slika 3.**). Osim što direktno svojom proteaznom aktivnošću prevodi fibrinogen u fibrin, trombin može zaobići puteve aktivacije sistema komplementa i na mestu povrede direktno generisati C5a peptid, čime utiče na odgovor imunskih ćelija. Ova veza je dvostrana, pošto sistem komplementa i koagulaciona kaskada dele zajednički evolutivni put.

Trombin je neophodan tokom embrionalnog razvića, za formiranje pravilne vaskularizacije, pogotovo žumanceta. Ovo je potvrđeno *in vivo*, na transgenim FII<sup>-/-</sup> miševima, gde je nedostatak protrombina doveo do teških poremećaja koagulacije koji su rezultirali embrionalnom i neonatalnom smrtnošću (71).

Iako inicijalno trombin doprinosi oštećenju mozga nakon intracerebralnog krvarenja, pokazano je da može imati ulogu u oporavku od povrede promovisanjem procesa neurogeneze (72). Takođe, može učestvovati i u regeneraciji tkiva i organa, što je pokazano na primeru sočiva kičmenjaka, kroz stimulaciju pigmentovanih epitelnih ćelija na transdiferencijaciju i ulazak u ćelijski ciklus (73).

Pored fizioloških, trombin može biti uključen i u niz patoloških procesa, poput ateroskleroze (74), reumatoidnog artritisa (75), multiple skleroze (76), Alchajmerove bolesti (77) i različitih tipova malignih oboljenja (78,79).

Različite nabrojane procese trombin reguliše kroz aktivaciju proteazama aktiviranih receptora (eng. *Protease Activated Receptors*, PARs) na ciljnim ćelijama (80).



**Slika 3.** Mehanizmi dejstva trombina na različite procese. Slika preuzeta i modifikovana iz Danckwardt et al., 2013 (78).

### 1.2.3.1. Uloga trombina u hemostazi

Svoju osnovnu funkciju, protrombin tj. njegova aktivna forma trombin, ostvaruje u očuvanju hemostazne ravnoteže, kao jedan od njenih centralnih regulatora. Ovo ostvaruje kroz dvostruku aktivnost – prokoagulantnu i antikoagulantnu, direktnim isecanjem supstrata, poput fibrinogena, ili aktivacijom PAR receptora (1).

Prokoagulantnu aktivnost trombin ostvaruje kroz procese stvaranja krvnog ugruška i održavanja njegove stabilnosti. Isecanjem fibrinogena u fibrin, omogućava se dalje međusobno povezivanje molekula fibrina jedan za drugi, čime se dobija protofibril. Uzdužnim povezivanjem protofibrila formira se fibrinsko vlakno, čijim grananjem nastaje fibrinska mreža, koja je osnova za formiranje krvnog ugruška. Dokle god postoji signal da je povreda krvnog suda prisutna, kroz proces inhibicije fibrinolize, trombin stabilizuje ugrušak (81). Aktivacijom trombocita (putem receptora PAR-1 ili PAR-4). Obezbeđuje se prokoagulantna

površina na membrani, koja omogućava akumulaciju trombocita i faktora koagulacije na mestu povrede. Kroz dejstvo na aktivaciju trombocita i faktora V, VIII i XI, trombin utiče na sopstvenu produkciju (82).

Antikoagulantnu funkciju trombin ostvaruje formiranjem kompleksa sa kofaktorima koji sprečavaju njegovo dalje proteolitičko dejstvo, čime se održava balans između njegove aktivacije i inhibicije. Nakon što je povređeni deo krvnog suda ispunjen krvnim ugruškom, trombin dolazi u kontakt sa delom nepovređenog endotela. Na endotelnim ćelijama nalazi se glikoprotein trombomodulin, koji ima izraženo visok afinitet ka trombinu i vezuje se za njega, čime sprečava dalje isecanje fibrinogena, kao i aktivaciju PAR receptora i trombocita (83). Dobijeni kompleks trombin-trombomodulin aktivira protein C, koji zatim zajedno sa proteinom S dovodi do isecanja FVa i FVIIIa, što sprečava nastanak novog trombina (84). Dodatno, za trombin se vezuje inhibitor antitrombin III koji sprečava njegovu serin-proteaznu aktivnost i širenje ugruška (85).

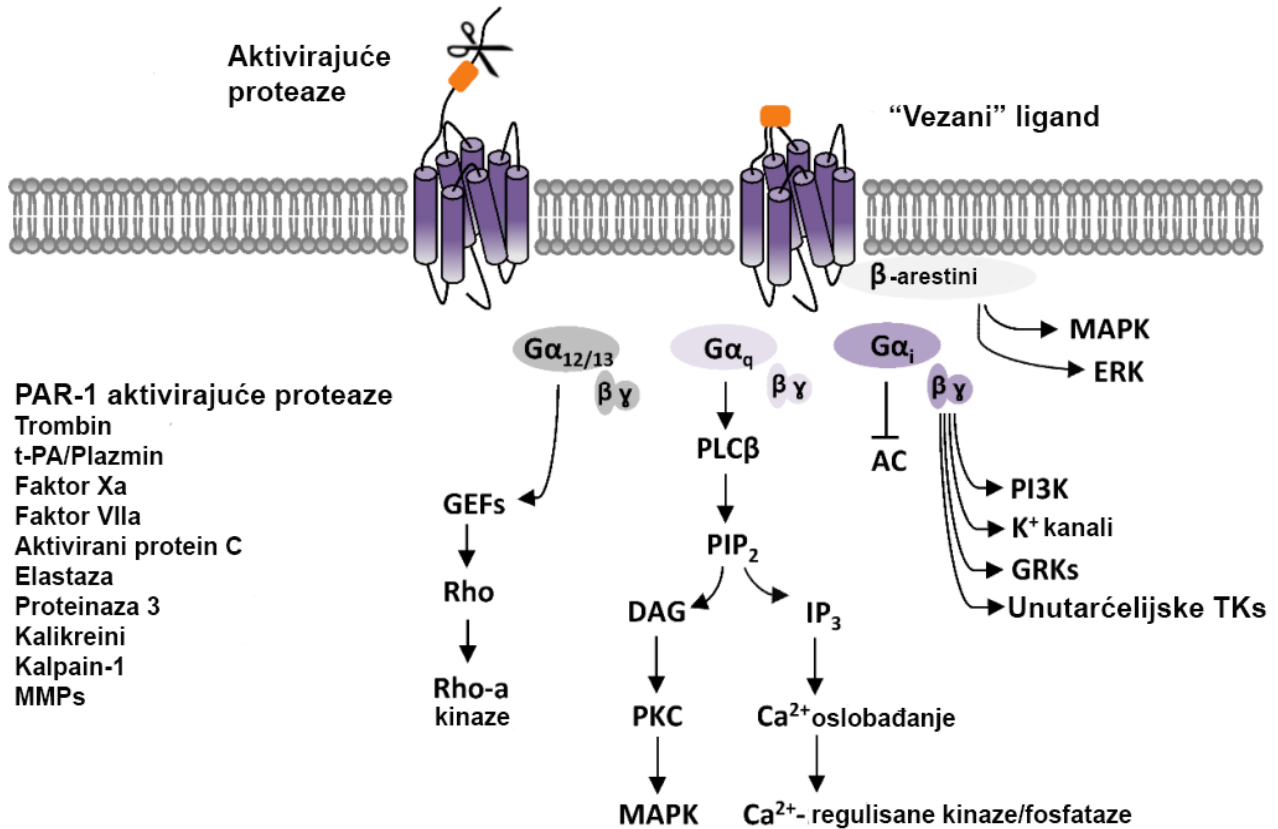
### 1.2.3.2. Uloga trombina kao signalnog molekula kroz aktivaciju PAR receptora

Otkriće PAR receptora devedesetih godina prošlog veka omogućilo je razjašnjavanje mehanizama pomoću kojih trombin i drugi koagulacioni faktori mogu biti uključeni u regulaciju ponašanja ćelija. PAR receptori spadaju u porodicu G-proteinom kuplovanih receptora (eng. *G-Protein Coupled Receptors*, GPCRs), koje odlikuje struktura od sedam transmembranskih domena povezanih sa po tri unutar- i vanćelijske petlje (86). Vanćelijski N terminalni domen odlikuje sekvencija duža od većine GPCRs, koja uključuje mesto isecanja (87). Proteolitičkim sečenjem oslobađa se skriveni “vezani” ligand, koji se vezuje za ligand-vezujuće mesto u okviru vanćelijskih petlji, čime se receptor aktivira. Unutarćelijske petlje služe kao mesto vezivanja proteina G (trimer  $G\alpha\beta\gamma$ ), koji pokreću dalju signalnu transdukciju (88). Široko su prisutni u različitim tipovima ćelija, a varijabilnost u ekspresiji zavisi od tkiva i fiziološkog konteksta. Zahvaljujući tome, uključeni su u niz bioloških procesa, kako fizioloških, tako i patoloških (89).

Četiri člana ove porodice proteina su do sada identifikovana, nazvana po redosledu otkrića i kloniranja. Prvootkriveni receptor PAR-1 (kodiran genom *F2R*) otkriven je kao receptor trombina, prilikom istraživanja receptora preko koga deluje trombin, i dugo je i nosio naziv trombinski receptor (90,91). PAR-2 receptor (kodiran genom *F2RL1*) je aktiviran proteazama poput tripsina i triptaze, kao i koagulacionim faktorima FVIIa i FXa, i dugo je navođen kao jedini PAR koji se ne aktivira trombinom (92). PAR-3 (kodiran genom *F2RL2*) i PAR-4 (kodiran genom *F2RL3*) se takođe mogu aktivirati trombinom (93,94). PAR-1 i PAR-3 poseduju hirudinu sličan domen, što omogućava vezivanje trombina većim afinitetom, preko *exosite I*, i aktivaciju sa malom koncentracijom trombina. S druge strane, PAR-4 receptor ima manji afinitet za vezivanje trombina, i zahteva njegovu veću koncentraciju kako bi se aktivirao. Kao i PAR-2, i ostali PAR receptori mogu biti aktivirani različitim drugim proteazama (95).

Kanonska aktivacija receptora proteolitičkim isecanjem N terminalnog domena oslobađa “vezani” ligand, i to je ireverzibilan proces. Dobijeni “vezani” ligand se vezuje za drugu vanćelijsku petlju receptora i stimuliše promenu konformacije, koja pokreće nizvodnu signalnu kaskadu. Unutaćelijski domeni receptora vezuju subjedinice proteina G, čime se omogućava fosforilacija  $G\alpha$  subjedinice i njeno oslobađanje od dimera  $G\beta\gamma$  (96). U zavisnosti od faktora kao što su koncentracija aktivatora, trajanje aktivacije, prisustva koreceptora, kao i tipa ćelije i lokalizacije PAR receptora, aktivacija stimuliše fosforilaciju različite porodice subjedinice  $G\alpha$  -  $G\alpha_{12/13}$ ,  $G\alpha_i$ , ili  $G\alpha_q$  (97–99). Nizvodna signalizacija sa navedenih subjedinica rezultuje aktivacijom različitih kinaza, i posledično regulacijom ekspresije gena i sinteze proteina uključenih u brojne ćelijske procese (99). Dodatno, vezivanjem i aktivacijom  $\beta$ -arestina, receptor pokreće signalizaciju nezavisno od proteina G (100). Kanonska aktivacija PAR receptora je prikazana na **Slici 4**.

## Proteazama aktivirani receptori (PAR)



**Slika 4.** Signalni putevi koji se pokreću sa PAR receptora. Slika preuzeta i modifikovana iz Price et al., 2021 (95).

Pored kanonske aktivacije, postoji i mogućnost nekanonske - “pristrasne” aktivacije, koja može rezultirati isecanjem receptora izvan standardnog mesta isecanja, ili pokretanjem signalnih puteva koji mogu imati suprotan efekat u odnosu na kanonske (101). Dodatno, neke proteaze mogu da spreče aktiviranje receptora tako što seku receptor iznad mesta za proteolitičko isecanje, pri čemu se dobija novi vezani ligand koji ne može aktivirati receptor (102).

Iako se ne može direktno aktivirati trombinom, pokazano je da PAR-2 može biti aktiviran indirektno procesom transaktivacije. Ko-ekspresijom mutiranog PAR-1 receptora, koji može biti vezan ali ne može biti aktiviran od strane trombina, sa PAR-2 receptorom, pokazano je da trombin nakon vezivanja PAR-1 aktivira PAR-2 i pokreće nizvodnu signalizaciju sa njega (103).

### 1.2.3.3. Trombin i maligna oboljenja

Tumorsko mikrookruženje (TM) je dinamična sredina koju pored tumorskih ćelija sačinjavaju i proteini ekstraćelijskog matriksa (ECM), fibroblasti, krvni sudovi i imunske ćelije (104). Brojna istraživanja dala su podatke koji povezuju trombin sa regulacijom važnih koraka u diseminaciji tumora – od njegovog rasta i formiranja krvnih sudova, do odvajanja ćelija od primarnog tumora, njihovog preživljavanja u vaskulaturi i implantacije u udaljene organe. Ove uloge trombin ostvaruje kako direktnim dejstvom na različite ćelije ECM preko PAR receptora (prethodno opisanim mehanizmima), tako i posredno kroz aktivaciju fibrinogena u fibrin (79).

Prisustvo PAR receptora, pogotovo PAR-1, je potvrđeno u većem broju tumorskih ćelija, poput tumora prostate, dojke, jajnika i materice, jetre, bubrega, pankreasa, gastrointestinalnog trakta, glioma i melanoma (105). Ekspresija PAR-1 je povišena u izraženo invazivnim tumorima, što je takođe povezano sa lošijom prognozom (106). U više *in vitro* i *in vivo* studija pokazano je da trombin stimuliše proliferaciju, migraciju i invazivnost malignih ćelija različitih tipova tumora, različitim spektrom signalnih puteva pokrenutih aktivacijom PAR receptora (107–115).

Preko PAR-1 trombin može stimulusati diferencijaciju monocita, pri ulasku u TM, u fenotip makrofaga asociranih sa tumorima, koji predstavljaju dominantnu grupu inflamatornih ćelija u TM. Pri tom, pokreće se NF- $\kappa$ B signalni put, čime se povećava i nivo ekspresije proinflamatornih citokina (113).

Osim na tumorskim ćelijama, ekspresija PAR receptora je povećana i na fibroblastima malignih tumora u odnosu na benigne tumore i neizmenjena tkiva. Dejstvom trombina na ove ćelije *in vitro*, povećava im se proliferacija (116). Unutar zdravih tkiva fibroblasti su koordinatori EĆM, koji regulišu sintezu i razgradnju komponenti poput kolagena, kao i komunikaciju između ćelija (117). Fibroblasti unutar tumora zauzimaju “aktivirani” fenotip, slično kao i u procesima zarastanja rana. U ovom stanju povećana im je proliferacija, produkcija kolagena i različitih faktora rasta, koji mogu stimulusati napredovanje tumora (118). Dejstvom na tumorske fibroblaste, trombin stimuliše ekspresiju matriksnih metaloproteinaza (eng. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs), koje vrše degradaciju EĆM i njegovo remodelovanje, što omogućava širenje tumora i angiogenezu, ali i podstiče invazivnost ćelija i metastaziranje (119).

Angiogeneza, odnosno formiranje novih krvnih sudova, jedan je od ključnih procesa za preživljavanje tumorske mase koja raste, kako bi se obezbedili kiseonik i nutrijenti, a uklonili produkti ćelijskog metabolizma (120). U tumorskim ćelijama trombin indukuje povećanje nivoa ekspresije hemokina GRO $\alpha$ , koji stimuliše ekspresiju proangiogenih faktora poput VEGF, angiopoetina-2 i MMP-1 (121). Na nivou endotelnih ćelija, trombin stimuliše angiogeni fenotip *in vitro* i *in vivo* (122).

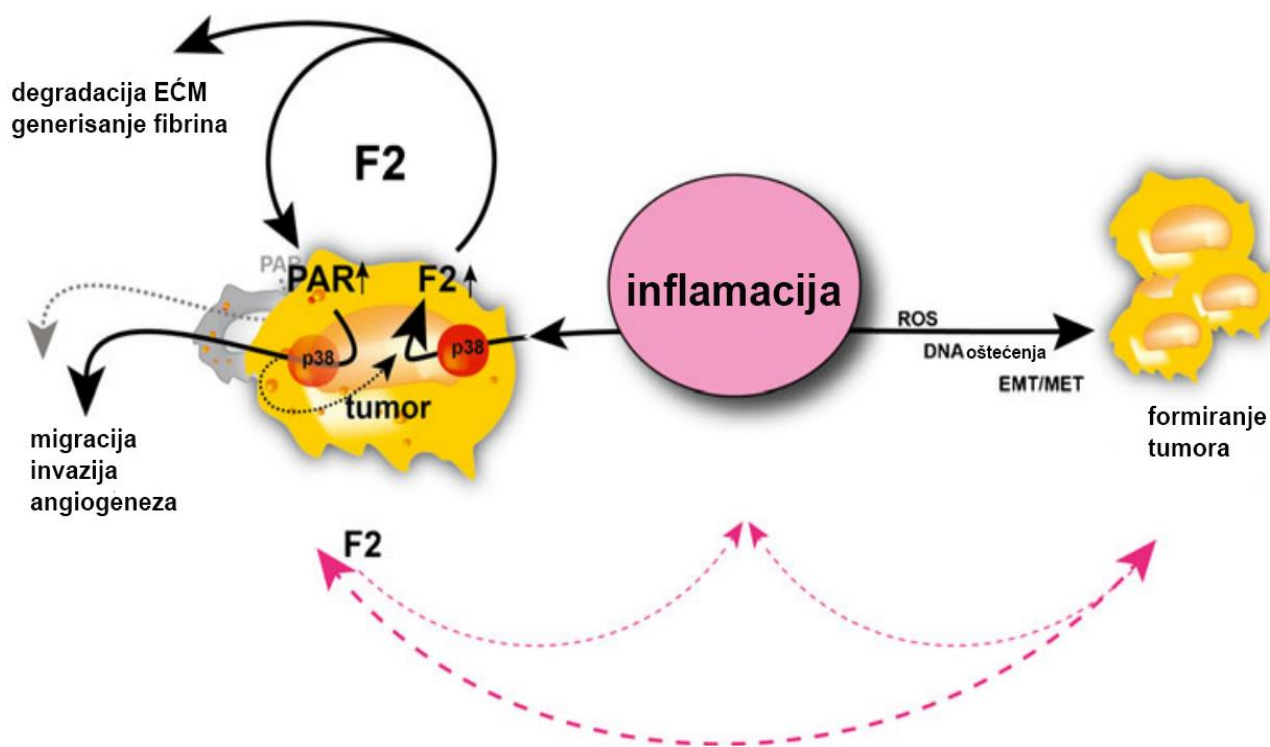
Metastaziranje predstavlja proces odvajanja tumorskih ćelija od primarnog mesta nastanka i kolonizaciju udaljenih tkiva i organa (123). U osnovi procesa leži epitelno-mezenhimalna transformacija (eng. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT), proces u kom dolazi do dediferencijacije epitelnih ćelija kako bi prešle u fenotip nalik mezenhimalnom. Ovakav fenotip omogućava ćeliji da izvrši invaziju u stromalnu mikrosredinu, odakle će intravazacijom u krvne ili limfne sudove stići do udaljenih tkiva i organa i naseliti ih procesom ekstravazacije. Dolaskom na sekundarno mesto, ćelija prolazi proces mezenhimalno-epitelne tranzicije (eng. *Mesenchymal-Epithelial Transition*), odnosno vraćanje epitelnog fenotipa (123,124). Unutar krvnog suda, trombociti i fibrin koji su aktivirani trombinom, formiraju agregate sa tumorskim ćelijama. Ovakvi agregati štite cirkulišuće tumorske ćelije od mehaničkih sila koje ih mogu oštetiti (125), ali i od imunskih ćelija. Aktivirani trombociti oslobađaju TGF $\beta$ , koji inhibira antitumorsku aktivnost NK ćelija (eng. *Natural Killer Cells*), čime im onemogućava prepoznavanje i uklanjanje tumorskih ćelija iz krvi (126,127).

Pokazano je da lekovi koji se koriste u antikoagulantnoj terapiji mogu inhibirati efekte trombina na tumorskim ćelijama. Direktni oralni antikoagulansi (eng. *Direct Oral Anticoagulants*, DOACs) dabigatran i argatroban prepoznaju i vezuju katalitički domen trombina, čime direktno inhibiraju njegovo dejstvo (128,129). *In vitro* tretman MDA-MB231 ćelijske linije invazivnog karcinoma dojke i U87 ćelijske linije glioblastoma, trombinom, kao i kombinacijom trombina i dabigatrana, potvrđuje da trombin povećava proliferaciju i migraciju ovih ćelija, dok dabigatran ovaj efekat poništava (115). Nalik dabigatranu, argatroban je inhibirao trombinom stimulusanu migraciju B16 ćelijske linije melanoma *in vitro*, ali i metastatski potencijal ovih ćelija *in vivo* na modelu miša (109).

Iako je poznato da trombin utiče na brojne procese u tumorima, ostaje otvoreno pitanje njegovog porekla. Protrombin, kao i fibrinogen i ostali proteini plazme, mogu “cureti” iz cirkulacije u TM kroz

visoko propustljive krvne sudove tumora (130). Međutim, postoje dokazi da bi mogao biti sintetisan i u samim tumorima. Dunjić i autori su ispitali ekspresiju protrombina na nivou RNK i proteina *in vitro*, na modelu karcinoma dojke, karcinoma kolona i glioblastoma, korišćenjem odgovarajućih ćelijskih linija. Rezultati studije su pokazali ekspresiju protrombina samo u Caco-2 ćelijskoj liniji, koja je u ovoj disertaciji korišćena kao model kolorektalnog karcinoma (KRK) (131). Takođe, prisutvo iRNK za protrombin, kao i proteinskog produkta, je potvrđeno i u malignim ćelijama, ali i fibroblastima nekih tumora (132). *Ex vivo* je na uzorcima obolelih od karcinoma pankreasa, želuca i larinksa potvrđeno prisustvo fragmenta F1+2, dok u kontrolnim uzorcima neizmenjenog tkiva to nije bio slučaj. Ovaj nalaz ukazuje na mogućnost aktivacije koagulacione kaskade, odnosno trombina, lokalno u tumoru (133).

Danckwardt i autori su postavili hipotezu da bi proinflamatorni uslovi, kakvi vladaju u TM, mogli biti okidač za povećan nivo ekspresije protrombina (**Slika 5.**) (78,134). Pokazali su da proinflamatorni signali, poput hipoksije indukovane sepsom, dovode do aktivacije kinaze p38 MAPK, koja potom vrši fosforilaciju proteina koji inhibiraju posttranskripcionu obradu iRNK za protrombin vezivanjem za njen 3' kraj. Fosforilacijom se ovim proteinima onemogućava vezivanje za iRNK, čime ona postaje dostupna za dalju obradu. Dodatno, mehanizam su potvrdili i na nivou drugih gena koji sadrže nekanonsku organizaciju 3' kraja, kao i protrombin, dok povećanje nivoa ekspresije nije uočeno na kontrolnim genima sa kanonski organizovanim 3' krajem (134).



**Slika 5.** Hipotetički model inflamacijom izazvane ekspresije protrombina. Slika preuzeta i modifikovana iz Danckwardt et al., 2013 (78).

### 1.3. Kolorektalni karcinom (KRK)

#### 1.3.1. Etiologija i klasifikacija KRK

KRK predstavlja heterogenu bolest, treću po incidenci i drugu po mortalitetu obolelih od karcinoma u svetu, sa više od 1,9 miliona novih slučajeva i preko 900 hiljada umrlih godišnje. Učestalost oboljenja je veća u razvijenim zemljama u odnosu na nerazvijene i zemlje u razvoju, mada se kod poslednjih beleži najveći skok u broju obolelih (135). Uočeni fenomen se povezuje sa životnim stilom i sredinskim faktorima poput povećane stope sedentarnog načina života i fizičke neaktivnosti, kao i konzumiranja industrijski prerađenih namirnica i alkohola, pušenja i prekomerne upotrebe antibiotika (135,136). Dodatno, rizik povećava i dugotrajno prisutno stanje inflamatorne bolesti creva (eng. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) (137). Iako se smatra bolešću starijeg životnog doba, poslednjih decenija učestalost KRK je porasla i kod osoba mlađih od 50 godina (138). U nekim visoko razvijenim zemljama, poput SAD, Kanade, Australije i Novog Zelanda, se uočava pad ili stagnacija incidence zahvaljujući sve prisutnijim zdravijim navikama, kao i efikasnijim merama prevencije (135). Prema podacima GLOBOCAN-a (eng. *Global Cancer Observatory*) od 2022. godine, po starosno standardizovanoj stopi (eng. *Age-standardised Rate*), Srbija zauzima 29. mesto po incidenci i 12. mesto po smrtnosti od KRK u svetu, sa 5489 novotkrivenih i 3005 smrtnih slučajeva godišnje (139).

Debelo crevo čoveka je završni deo digestivnog trakta, anatomski sačinjen od kolona i rektuma, i obložen jednoslojnim epitelom koji formira invaginacije – kripte (140). KRK je maligni tumor poreklom od epitelnih ćelija sluznice debelog creva. Više od 90% KRK čine adenokarcinomi poreklom od žlezdanih epitelnih ćelija, dok ostatak čine nediferencirani, skvamozni, adenoskvamozni i karcinom vretenastih ćelija (141). KRK se najčešće razvija sporadično (do 65%), kao posledica nakupljanja različitih genetičkih i epigenetičkih promena tokom života. S druge strane, oko 35% podrazumeva naslednu komponentu, gde spadaju nasledni sindromi poput familijarne adenomatozne polipoze (eng. *Familial Adenomatous Polyposis* – FAP) i Linč sindroma ili naslednog nepolipoznog KRK (eng. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC), postojanje istorije bolesti u porodici, kao i postojanje genetičkih varijacija povezanih sa KRK koje su otkrivene GWAS (eng. *Genome Wide Association Studies*) studijama (142).

Klasifikacija malignih tumora u stadijume omogućava preciznije postavljanje prognoze i adekvatne terapije. Prvenstveno korišćena klasifikacija po Dukes-u klasifikuje KRK u četiri stadijuma: A – tumor zahvata samo epitel sluznice, B – tumor zalazi u mišić, ali ne u okolne limfne čvorove, C – tumor zahvata i okolne limfne čvorove, i D – tumor formira metastaze (143). Danas se pored Dukes sistema klasifikacije koristi i TNM (eng. *Tumor, Node, Metastasis*) sistem klasifikacije malignih bolesti. Navedeni sistem procenjuje stadijum primarnog tumora (T) u odnosu na dubinu penetracije tumora u tkivo debelog creva i okolnih tkiva i organa, limfonodalni stadijum (N) tj. širenje tumora na okolne limfne čvorove, kao i metastatski stadijum (M) tj. prisustvo tumora u drugim tkivima i organima u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora. TNM sistem klasifikacije je dodatno podeljen u kategorije kojima se preciznije može odrediti dijagnoza i usmeriti dalja terapija (144).

#### 1.3.2. Etiopatologija i molekularna genetika KRK

U osnovi nastanka KRK nalazi se postepena akumulacija različitih genetičkih i epigenetičkih promena. Na molekularnom nivou opisane su tri vrste promena – hromozomska nestabilnost (eng. *chromosomal instability*, CIN), mikrosatelitska nestabilnost (eng. *microsatellite instability*, MSI) i fenotip nastao metilacijom CpG ostrvaca (eng. *CpG island methylator phenotype*, CIMP) (145). CIN je najčešći mehanizam nastanka KRK i dešava se u do 85% slučajeva. CIN najčešće podrazumeva disbalans u broju celih ili delova hromozoma i gubitak heterozigotnosti (146). Ovaj mehanizam dovodi do aktivacije različitih onkogena, poput *KRAS* ili *BRAF*, ili do inaktivacije tumor-supresora, poput *APC* i *TP53* (147).

MSI mehanizam obuhvata mutacije u genima čiji produkti učestvuju u sistemu za reparaciju pogrešno sparenih baza (eng. *mismatch repair*) u molekulu DNK (148). Najčešće pogođeni geni su *MHL1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Ukoliko se opisane mutacije u ovim genima jave u germinativnoj liniji, mogu dovesti do razvića Linč sindroma (148). CIMP mehanizam podrazumeva hipermetilaciju CpG ostrvaca u promotorima tumor-supresorskih gena, što za posledicu ima inhibiciju njihove transkripcije (149). Iako zasebno opisani, ovi molekularni mehanizmi ne isključuju jedni druge u procesu tumorogeneze, pa tako u osnovi sporadičnog tipa KRK bogatog sa MSI može biti upravo hipermetilacija CpG ostrvaca koja dovodi do inaktivacije *MLH1* (150).

Akumulacija promena se dešava tokom dužeg vremenskog perioda, čak više decenija, i dovodi do postepene transformacije epitela. Opisana su tri puta transformacije koja vode do razvoja karcinoma – adenom-karcinom sekvenca, seratni put i inflamatorni put. Adenom–karcinom sekvenca se još naziva i klasični put razvoja, s obzirom da je najučestaliji (151). Najčešće se povezuje sa CIN mehanizmom. Kod tumora koji imaju adenom-karcinom sekvencu u osnovi razvoja, kao prvi korak najčešće se dešava inaktivacija tumor-supresorskog gena *APC* (eng. *Adenomatous Polyposis Coli*, *APC*) (152). Ukoliko je mutacija prisutna u germinativnoj liniji, dolazi do razvoja adenomatozne familijarne polipoze, autozomno-dominantnog poremećaja (153). Ova mutacija dovodi do aktivacije Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta, što dovodi do formiranja malog adenoma. Sledeći korak su mutacije u proto-onkogenima poput *KRAS*, koja dovodi do sinteze konstitutivno aktivne forme enzima K-RAS. Ovo za posledicu ima neprestanu aktivaciju RAS signalnog puta i proliferaciju ćelija, čime dolazi do prelaska malog adenoma u veliki adenom. Na kraju, mutacija tumor-supresorskog gena *TP53* vodi u nepovratnu tranziciju iz velikog adenoma u karcinom *in situ* (151,153–155). Pored navedenih gena, otkrivene su mutacije i u drugim tumor-supresorima i proto-onkogenima, poput *PI3KCA*, *BRAF*, *Smad4* itd (154,147).

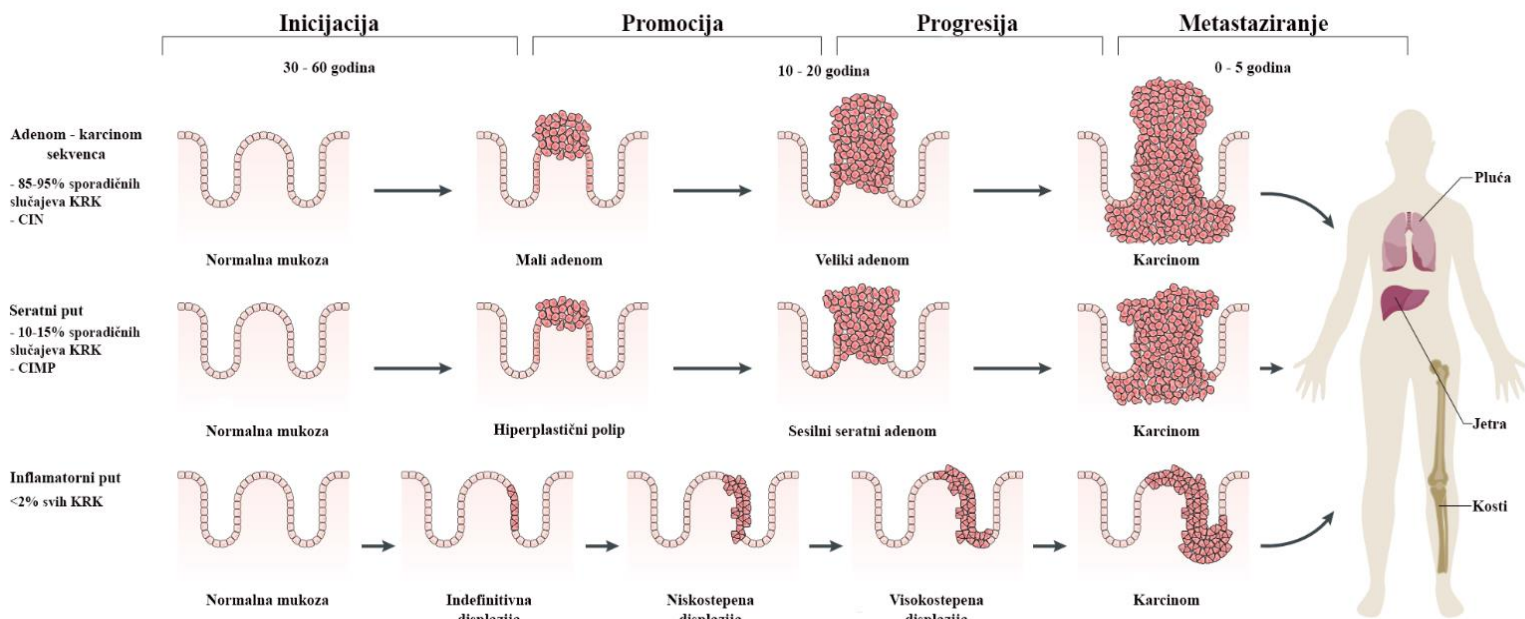
Drugi (alternativni) put razvoja se dešava u oko 10-15% slučajeva KRK. Karakteriše ga transformacija epitela u hiperplastični polip usled mutacije u *BRAF* onkogenu, koja dovodi do konstitutivne aktivacije MAPK signalnog puta i povećane ćelijske proliferacije (156). CIMP mehanizmom potom dolazi do prelaska u sesilni seratni adenom i na kraju karcinom (157).

Treći, inflamatorni put razvića, je najređi (<2% KRK) i opisan je kod bolesnika sa hroničnim IBD, kod kojih se epitel transformiše u indefinitivnu displaziju, potom displaziju niskog i visokog stepena, i na kraju karcinom (158). Mutacije koje pogađaju gene u ovom putu sreću se i kod adenom-karcinom sekvence, ali dok se kod opisane adenom-karcinom sekvence mutacije u *APC* događaju rano, a u *TP53* kasno u karcinogenezi, kod inflamatornog puta mutacije u *TP53* se dešavaju rano, dok u *APC* mogu izostati ili se javiti kasno (158).

Prethodno opisane promene i putevi razvoja se mogu rasporediti i u četiri osnovne faze (**Slika 6.**):

- a. Inicijacija – pojava ireverzibilnih oštećenja koja mogu predodrediti ćeliju za neoplastičnu transformaciju (prelazak zdrave sluznice u mali adenom, hiperplastični polip ili indefinitivnu displaziju),
- b. Promocija – proliferacija ćelija koje su prošle inicijaciju i formiranje abnormalne mase (prelazak u veliki adenom, sesilni seratni adenom ili displaziju),
- c. Progresija – akumulacija dodatnih genetičkih i epigenetičkih promena koje omogućavaju prelazak benigne tumorske ćelije u malignu i formiranje karcinoma,
- d. Metastaziranje (142).

U oko 50% slučajeva jetra je organ gde se razvijaju metastaze KRK, zbog anatomske povezanosti jetre i debelog creva preko portnog venskog sistema. Drugi najčešći organ su pluća, dok se metastaze mogu javiti i na kostima, peritoneumu, udaljenim limfnim čvorovima i centralnom nervnom sistemu (159,160).



**Slika 6.** Putevi razvoja KRK. Slika preuzeta i modifikovana iz Keum i Giovannucci, 2019. (142).

Radi preciznije karakterizacije, međunarodni konzorcijum je klasifikovao KRK u 4 konsenzusna molekularna podtipa – CMS (eng. *Consensus Molecular Subtype*), u zavisnosti od profila ekspresije gena u samom tumoru i njegovih patoloških karakteristika (161). Navedene grupe su:

- CSM1 ili imunski podtip, kojeg karakteriše MSI (14% slučajeva),
- CSM2 ili kanonski podtip, kojeg karakteriše CIN (37% slučajeva),
- CSM3 ili metabolički podtip, kojeg karakteriše poremećaj u metaboličkim signalnim putevima (13% slučajeva),
- CSM4 ili mezenhimalni podtip, kojeg karakteriše CIMP (23% slučajeva).

Ostalih 13% slučajeva pokazuju mešovite karakteristike (161).

### 1.3.3. Trombin u razvoju KRK

Potvrda postojeće veze između trombina i KRK bila je omogućena otkrićem PAR receptora. *In vitro* studije na modelu različitih ćelijskih linija KRK utvrdile su ekspresiju receptora PAR-1, kao i da izlaganje navedenih ćelija trombinu dovodi do povećane proliferacije i mobilnosti ćelija preko MAPK/ERK signalnog puta (108). Dodatno, pokazano je da trombin stimuliše aktivaciju HIF-1 $\alpha$ , čime utiče na HIF-1 $\alpha$  zavisnu ekspresiju Twist regulatornog proteina transkripcije, koji potom stimuliše proces EMT i metastaziranja (162). Iako se ne smatra primarno receptorom za trombin, PAR-2 se pokazao kao potencijalno važan posrednik u razvoju KRK, takođe kroz stimulaciju proliferacije (163). Na modelu HT29 ćelijske linije aktivacijom navedenog receptora inhibirana je doksorubicinom indukovana apoptoza (164), što ukazuje na potencijalnu ulogu ovih receptora u progresiji bolesti i rezistenciji na terapiju. Dodatna *in vitro* istraživanja su pokazala da se navedeni efekat na proliferaciju i migraciju ostvaruje i preko PAR-4 receptora (165).

*In vivo* su vršena ispitivanja na modelu FII $\pm$  miša (miševi sa samo jednom funkcionalnom kopijom gena za protrombin) ili divljeg soja (eng. *wild-type*, WT) sa suprimiranom sintezom protrombina, kako bi se ispitalo značaj trombina na razviće KRK. Miševi su izlagani azoksimetanu i destran-natrijum-sulfatu,

agensima za indukovanje kolitisom-povezanog KRK. Pokazano je da kod ovih miševa dolazi do značajnog smanjenja formiranja adenoma. Međutim, iako manji u broju, ovi adenomi se nisu histološki razlikovali od adenoma kod WT kontrolne grupe (166). Subkutanom injektiranjem MC38 ćelijske linije KRK u WT i različite transgene linije miševa: FII lox/- miševe (sa 10% smanjenim nivoom protrombina), PAR-1 -/- (PAR-1 deficijentni) i Fib-/- (fibrinogen deficijentni), uočeno je da je tumorska masa kod transgenih linija višestruko manja u odnosu na WT, kao i da su metastaze značajno manje prisutne. Pokazano je da trombin vrši značajnu ulogu u rastu i diseminaciji tumora, kao i da je to posredovano preko PAR-1 i fibrinogena (167,168).

Podaci o lokalizaciji fragmenta F1+2 na presecima tkiva karcinoma kolona obolelih, indirektno ukazuju na lokalnu aktivaciju protrombina u trombin. Dodatno, signal poreklom od fragmenta F1+2 je detektovan u kolokalizaciji sa kompleksom VEGF:VEGFR-2, na tumorskim i endotelnim ćelijama sitnih krvnih sudova unutar tumora, što ukazuje na vezu koja može podsticati rast tumora i angiogenezu (169).

Kao što je spomenuto, *in vitro* je potvrđeno da se protrombin može sintetisati u Caco-2 ćelijama, koje vode poreklo od KRK (131). Dodatno, na presecima metastaze KRK na jetri je pokazana statistički veća ekspresija protrombina na obodima (invazivnom frontu) tumorske mase u odnosu na zdravo tkivo jetre i unutrašnji deo tumorske mase, što dodatno potvrđuje da protrombin može imati ulogu u progresiji ovog oboljenja (134).

## 2. CILJEVI

Uzevši u obzir predstavljene literaturne podatke u prethodnom poglavlju, postavka ove disertacije je usmerena ka boljem razumevanju porekla protrombina u KRK, procesa njegove aktivacije od strane tumorskih ćelija, kao i efekata protrombina, trombina i njegovog inhibitora dabigatrana na molekularne mehanizme koji su u osnovi ovog oboljenja.

U skladu sa tim, postavljeni su sledeći ciljevi:

- Ispitivanje 3' kraja gena za protrombin kod obolelih od KRK, kako bi se utvrdio potencijalni značaj varijanti u ovom regionu na razviće KRK.
- Ispitivanje diferencijalne ekspresije protrombina, PAR receptora i fibrinogena u uzorcima tumorskog i neizmenjenog tkiva obolelih od KRK, kao i prostorne ekspresije gena za navedene proteine u tumorskom tkivu.
- Ispitivanje ekspresije protrombina i PAR-1 receptora u permanentnim ćelijama KRK u kulturi.
- Ispitivanje mogućnosti aktivacije protrombina u trombin od strane permanentnih ćelija KRK u kulturi, nakon izlaganja ćelija protrombinu.
- Ispitivanje efekata protrombina *in vitro*, na proliferaciju, migraciju i angiogeni potencijal permanentnih ćelija KRK, kao i na promenu ekspresionog profila navedenih ćelija.
- Ispitivanje efekata trombina i njegovog direktnog inhibitora dabigatrana *in vitro*, na proliferaciju i migraciju permanentnih ćelijskih linija KRK, kao i *in vivo* na modelima ksenografta KRK injektiranih u embrione zebrića.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni materijal

##### 3.1.1. Uzorci humanog tkiva

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćeni su uzorci iz Hrvatske banke tumora poreklom od 93 bolesnika sa sporadičnim adenokarcinomom debelog creva. Korišćeni su uzorci tumorskog tkiva i okolnog neizmenjenog tkiva uzetog na 15 cm od ruba tumora. Prema protokolu Hrvatske banke tumora sveži uzorci tkiva su zamrzavani u tečnom azotu i skladišteni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljeg korišćenja. Paralelno sa uzorcima prikupljani su i kliničko-patološki podaci koji su deponovani u elektronskom obliku u okviru repozitorijuma Hrvatske banke tumora (170).

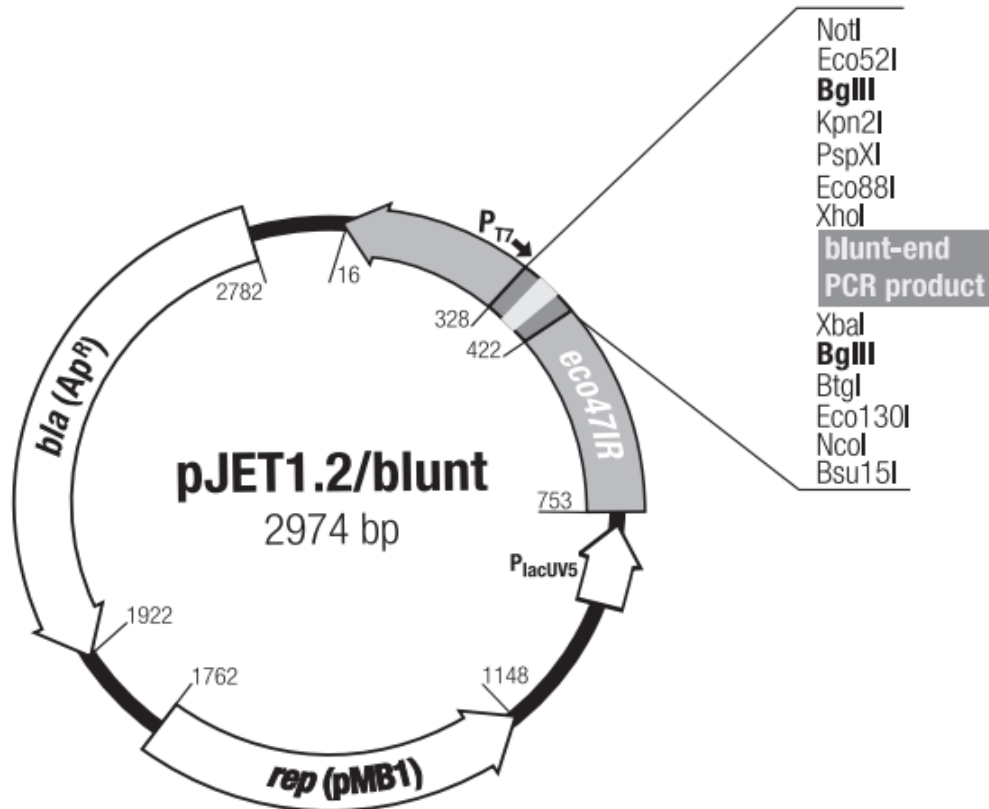
Pisana saglasnost za korišćenje uzoraka tkiva i pratećih podataka je dobijena od svih bolesnika čiji su uzorci uključeni u studiji. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, datuma 27.04.2016. godine i od strane Etičkog odbora Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu 25.11.2020. godine (odluka O-OE-018/2020).

##### 3.1.2. Bakterijski sojevi

Za propagaciju plazmidnih vektora korišćen je *E. coli* soj DH5 $\alpha$  (genotip: *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*).

##### 3.1.3. Plazmidni vektori

U ovoj studiji korišćen je plazmidni vektor *pJET1.2/blunt*, iz kita *CloneJet PCR Cloning Kit* (*Thermo Scientific*, SAD). Ovaj vektor sadrži gen za letalni restrikcioni enzim koji biva prekinut ligacijom molekula DNK inserta u mesto kloniranja. Kao rezultat, samo bakterijske ćelije sa rekombinantnim plazmidom mogu da prežive. Vektori kojima nedostaje insert po recirkularizaciji ekspimiraju letalni restrikcioni enzim, koji ubija ćeliju domaćina nakon transformacije. Vektor sadrži prošireno višestruko mesto kloniranja, kao i T7 promotor za *in vitro* i *in vivo* transkripciju. Cirkularna mapa *pJET1.2/blunt* vektora je prikazana na **Slici 7**.



**Slika 7.** Cirkularna mapa pJET1.2/blunt vektora (Slika iz preuzeta iz kataloga *CloneJet*, *Thermo Scientific*, SAD).

### 3.1.4. Čelijske linije

U ovoj disertaciji korišćeno je pet komercijalno dostupnih permanentnih čelijskih linija poreklom od humanog kolorektalnog karcinoma (171): Caco-2 (ATCC® HTB-37™), SW480 (ATCC® CCL-228™), SW620 (ATCC® CCL-227™), HCT116 (ATCC® CCL-247™) i HT29 (ATCC® HTB-38™), kao i čelijska linija poreklom od humanog hepatocelularnog karcinoma HepG2 (ATCC® HB-8065™). Sve navedene čelijske linije su po poreklu i tipu epitelne.

Caco-2 linija je dobijena imortalizacijom čelija primarnog adenokarcinoma kolona muškarca starosti 72 godine. Ova linija je pogodna za tranfekcije i primenu u istraživanjima karcinoma i toksikologije. SW480 linija (*Dukes' type B*) je dobijena imortalizacijom čelija primarnog adenokarcinoma kolona muškarca starosti 50 godina. Godinu dana kasnije, od iste osobe izolovane su čelije iz metastaze u limfnom čvoru, koje su imortalizacijom dale SW620 (*Dukes' type C*) čelijsku liniju. HCT116 (*Dukes' type D*) je dobijena imortalizacijom čelija primarnog karcinoma kolona muškarca starosti 48 godina. HT29 (*Dukes' type C*) je dobijena imortalizacijom čelija primarnog adenokarcinoma kolona žene starosti 44 godine (171). HepG2 čelijska linija je dobijena imortalizacijom čelija hepatocelularnog karcinoma poreklom od muške osobe starosti 15 godina. Ova čelijska linija je odabrana kao pozitivna kontrola esej za ispitivanje ekspresije protrombina.

U cilju ispitivanja uticaja čelija KRK na proces angiogeneze, korišćena je komercijalno dostupna čelijska linija EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™), hibridna linija nastala fuzionisanjem primarnih čelija pupčane vene čoveka sa tioguanin rezistentnim klonom A549 linije humanog karcinoma pluća. Za *in vivo*

eksperimente inokulacije ksenografta u embrione zebrice, korišćena je ćelijska linija HCT116-GFP (*AcceGen Biotech Cat. #ABC-RC172H*, SAD), koja stabilno eksprimira zeleni fluorescentni protein GFP (eng. *Green Fluorescent Protein*).

### 3.1.5. Zebrice (lat. *Danio rerio*)

Za potrebe eksperimenata korišćene su zebrice divljeg tipa (*Danio rerio*) AB soja. Sva postupanja sa životinjama bila su u skladu sa međunarodnim i nacionalnim propisima, uz etičku saglasnost Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (broj rešenja: 323-07-02116/2020-05/1, datuma 24.02.2020.).

### 3.1.6. Oligonukleotidi

Spisak i sekvence graničnika (svi se vezuju za sekvence u genu *F2*) korišćenih za potrebe eksperimenata nalazi se u **Tabeli 1**.

**Tabela 1.** Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotidnih graničnika.

Naziv	Sekvenca
FII1	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
FII2	5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3'
FII13a	5'-GGAAACGAGGGGATGCCTGT-3'
A6b	5'-CCTGCCATCTTTCCTCTCAC-3'
D3	5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
Pt1	5'-GGATGGGAAATATGGCTTCTAC-3'
Pt2	5'-GAATAGCACTGGGAGCATTGA-3'

### 3.1.7. Antitela

Spisak korišćenih antitela prikazan je u **Tabeli 2**.

**Tabela 2.** Korišćena antitela.

<b>Antitelo</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač (kataloški broj)</b>
Primarno F1, anti-humani (pro)trombin	Mišje monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology (sc-271449)
Primarno 5G9, anti-humani trombin	Mišje monoklonsko	Abcam (ab17199)
Sekundarno anti-mišje IgG HRP*	Zečje poliklonsko	Sigma Aldrich (A9044)

\*Konjugovano sa peroksidazom rena (eng. *Horseradish peroxidase*, HRP)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Analize na uzorcima humanog porekla**

#### **3.2.1.1. Izolacija molekula genomske DNK iz uzoraka tkiva**

Uzorcima tumorskog i okolnog neizmenjenog tkiva creva homogenizovani su u puferu za izolaciju DNK (10 mM Tris Cl, 0,1 M EDTA, pH 8,0, 0,5% SDS), u koji je potom dodata proteinaza K (*Sigma*, SAD), u finalnoj koncentraciji 100 µg/mL. Smeša je inkubirana na 37°C preko noći. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi u smešu je dodat jednak volumen fenola (*Kemika*, Hrvatska) i lagano mešano 10 min. Potom, centrifugiranjem na 1000 x g u toku 10 min razdvojene su faze, i gornja vodena faza izdvojena u novu tubu. Ovaj proces prečišćavanja fenolom je ponovljen još dvaput. Nakon toga, vodena faza je prečišćena u trostrukom volumenu rastvora hloroform-izoamil alkohola (odnos 24:17) (*Kemika*, Hrvatska), pa je DNK precipitirana dodavanjem 1 mL apsolutnog etanola ohlađenog na -20°C (*Kemika*, Hrvatska). Etanol je uklonjen kratkim centrifugiranjem od 1 min, a DNK talog osušen na 37°C, pa rastvoren u TE puferu (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) i čuvan na -20°C do dalje upotrebe.

#### **3.2.1.2. Umnožavanje molekula DNK metodom PCR**

Korišćenjem metode lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), pomoću graničnika F113a i A6b, umnožen je fragment dužine 715 bp, koji obuhvata poslednji intron, poslednji egzon, 3'UTR (eng. *Untranslated Region*) i 3'FR (eng. *Flanking Region*) gena za protrombin.

PCR smeša od 25  $\mu$ L finalne zapremine je sadržala je sledeće reagense (*Qiagen*, Nemačka):

DNK matrica	200-500 ng
10x PCR pufer	2,5 $\mu$ L
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ L
2mM dNTP	2,5 $\mu$ L
10 pmol/ $\mu$ L FII13a	0,5 $\mu$ L
10 pmol/ $\mu$ L A6b	0,5 $\mu$ L
5 U/ $\mu$ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 $\mu$ L

Temperaturni profil reakcije je bio:

- 94°C/5 min
- (94°C/1 min, 61°C/1 min, 72°C/1 min) x 35 ciklusa
- 72°C/10 min

Prinos PCR reakcije je proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu, u koji je dodat etidijum bromid kako bi se omogućila vizualizacija molekula DNK. Elektroforeza je vršena u TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina i 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA). Vizualizacija molekula DNK je vršena osvetljavanjem UV svetlom u komori CCD kamere (*Analytik Jena*, Nemačka) sa *BioDocAnalyze* (*Biometra*, Nemačka) sistemom.

### 3.2.1.3. Kloniranje ciljne sekvence u plazmidni vektor

#### 3.2.1.3.1. Kultivacija bakterija

*E. coli* DH5 $\alpha$  soj bakterija je gajen na 37°C na čvrstoj LA (*Luria Agar*) podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1, 5% agar) ili u tečnom LB (*Luria-Bertani Broth*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca). Nakon sterilizacije autoklaviranjem, LA medijum je razlivan u petri posude i nakon polimerizacije čuvan na 4°C. LB medijum je čuvan na sobnoj temperaturi. Za potrebe selekcije ciljnih klonova u oba tipa medijuma je dodavan ampicilin u finalnoj koncentraciji od 100  $\mu$ g/ml.

#### 3.2.1.3.2. Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija

Za dobijanje kompetentnih bakterijskih ćelija, pojedinačnim bakterijskim kolonijama *E. coli* DH5 $\alpha$  je inokulisano 10 mL tečnog LB medijuma, pa gajeno preko noći na 37°C uz mešanje na 180 rpm. Iz dobijene prekončne kulture je potom uzeto 2 mL i inokulirano 200 mL LB medijuma i kultura gajena na 37°C uz mešanje na 200 rpm, do dostizanja optičke gustine (eng. *Optical Density*, OD) kulture u opsegu 0,3 < OD<sub>600</sub> < 0,5. Kultura je potom centrifugirana 10 min na 660 x g na 4°C. Supernatant je pažljivo odliven, a dobijeni talog resuspendovan u 10 mL rastvora 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubiran 15 min na ledu, nakon čega je ponovljeno centrifugiranje 10 min na 660 x g na 4°C. Supernatant je odliven, a talog je resuspendovan 2 mL RF2 pufera (10 mM MOPS, 1 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol) i inkubiran 15 min na ledu. Dobijena smeša je na ledu alikvotirana u volumenu od 50-200  $\mu$ L, a alikvoti do upotrebe čuvani na -80°C.

Za kloniranje odabranih fragmenta dobijenih u PCR reakciji korišćen je plazmidni vektor *pJET1.2/blunt* u okviru kita *CloneJet* (*ThermoScientific/Fermentas*, SAD).

Prema upustavu proizvođača, korišćen je *Sticky-end Cloning Protocol*. U prvom koraku je urađeno poravnanje krajeva PCR produkta u reakciji ukupnog volumena od 18 $\mu$ L sastava:

2x Reakcioni pufer	10 $\mu$ L
<i>Blunting enzyme</i>	1 $\mu$ L
PCR produkt	3 $\mu$ L

Reakciona smeša je inkubirana 5 min na 70°C. Potom je na ledu u smešu dodato 1 $\mu$ L *pJET1.2/blunt* klonirajućeg vektora (50 ng/ $\mu$ L) i 1  $\mu$ L *T4 DNA* ligaze, do finalne zapremine reakcione smeše od 20  $\mu$ L. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi i potom korišćena za transformaciju bakterijskih ćelija.

Za transformaciju kompetentnih ćelija soja *E. coli* DH5 $\alpha$  korišćen je protokol transformacije toplotnim šokom. U 100  $\mu$ L ćelija dodato je 15  $\mu$ L ligacione smeše. Transformaciona smeša je inkubirana na ledu 1 h, a potom 5 min na 42°C i dodatnih 5 min na ledu. Radi oporavka ćelija, u transformacionu smešu je dodato 200  $\mu$ L LB medijuma i zatim inkubirano 30 min na 37°C na 180 rpm. Nakon perioda inkubacije, smeša je utrljana na šolju sa LA medijumom sa ampicilinom i inkubirano na 37°C preko noći. Nakon prekonoćne inkubacije, uspešnost transformacije željenim plazmidom je proverena metodom PCR-a iz kolonije (eng. *colony PCR*).

Deo kolonije je sterilnim nastavkom ili čačalicom prenesen u 15,3  $\mu$ L sterilne vode i da bi se razbile ćelijske membrane bakterijskih ćelija, prvo je korišćena reakcija sledećeg temperaturnom profilu:

- (98°C/2 min, 55°C/3 min) x 5 ciklusa

Nakon toga, u reakciju je dodata smeša PCR reagenasa (*Qiagen*, Nemačka) sastava:

10x PCR pufer	2,5 $\mu$ L
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ L
2mM dNTP	2,5 $\mu$ L
10 pmol/ $\mu$ L FII1	0,5 $\mu$ L
10 pmol/ $\mu$ L FII2	0,5 $\mu$ L
5 U/ $\mu$ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 $\mu$ L

Reakcija je nastavljena po temperaturnom profilu:

- 95°C/5 min
- (94°C/1 min, 57°C/1 min, 72°C/1 min) x 37 ciklusa
- 72°C/10 min

Produkti PCR reakcije su elektroforetski razdvojeni i vizuelizovani na 2% agaroznom gelu, po prethodno opisanom protokolu.

### 3.2.1.3.3. Izolovanje molekula plazmidne DNK

Odabrane kolonije su inkubirane u LB medijumu sa ampicilinom preko noći na 37°C na 180 rpm.

Prekonoćne kulture su oborene centrifugiranjem i plazmidi izolovani iz taloga pomoću kita *Pure Link HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen, SAD)*, po protokolu proizvođača. Prvo, talog bakterijskih ćelija je resuspendovan u 240 µL rastvora za resuspendovanje (iz kita eng. *Resuspension Solution*) sa dodatkom RNaze A, pa je dodato 240 µL pufera za lizu (iz kita eng. *Lysis buffer*), polako promešano 4-8 puta i inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi. Potom, u smešu je dodato 340 µL pufera za neutralizaciju i vezivanje (iz kita eng. *Neutralisation/Binding Buffer*) i promešano 4-8 puta, pa centrifugirano 10 min na maksimalnoj brzini u mini centrifugi. Supernatant je potom prebačen na kolonu za vezivanje pa centrifugiran 1 minut na 10000-14000 x g. U kolonu je dodato 650 µL pufera za ispiranje (iz kita, eng. *Wash Buffer*) i opet centrifugirano. Kolona je potom prenetu u novu mikrotubu i na nju nanešeno 50 µL sterilna voda. Inkubirano je 1 min na sobnoj temperaturi, pa centrifugirano na maksimalnoj brzini (16000 x g) 1 min, kako bi se plazmidi spustili sa kolone u sterilnu mikrotubu. Koncentracija izolovanih plazmida je merena spektrofotometrijski uz pomoć *NanoVue (GE Healthcare, SAD)*.

#### 3.2.1.4. Sekvenciranje molekula DNK

Reakcija sekvenciranja je vršena pomoću kita *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, SAD)*.

Smeša za sekvenciranje sadržala je finalno 8 µL:

PCR produkta	150-300 ng plazmidne DNK ili 1-2 ng/100 bp dužine PCR produkta
Graničnika	3,2 pmol
<i>Ready Reaction Mix</i>	2 µL

Za sekvenciranje PCR produkta dobijenog umnožavanjem iz uzoraka tumora i okolnog neizmenjenog tkiva bolesnika korišćeni su graničnici D3 i Pt2, dok su za sekvenciranje molekula plazmidne DNK korišćeni Pt1 i FII2 graničnici.

Temperaturni profil reakcije za sekvenciranje je bio:

- 96°C/1min,
- (96°C/10 sek, 50°C/5sek, 60°C/4min) x 25 ciklusa
- 4°C/∞

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćeni natrijum-acetatnom precipitacijom. U 8 µL smeše dodato je 40 µL 0,1 M Na-acetata pH vrednosti 5,2, rastvorenog u etanolu i sterilnoj vodi, i centrifugirano 10 min na 15800 x g. Potom, uklonjen je supernatant i talog ispran dva puta sa po 200 µL 70% etanola, uz centrifugiranje 10 min na 15800 x g. Talog je potom osušen i rastvoren u 20 µL *HiDi Formamide (Applied Biosystems, SAD)* i celokupna zapremina je naneta na aparat za kapilarnu elektroforezu *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD)*. Za analizu sekvenci korišćen je softver *Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems, SAD)*.

#### 3.2.1.5. Analiza diferencijalne ekspresije gena korišćenjem podataka iz javno dostupnih baza

Analiza RNASeq podataka iz javno dostupnih baza obuhvatila je analizu transkriptoma iz uzoraka tkiva bolesnika obolelih od KRK, i analizu javno dostupnih uzoraka prostorne transkriptomike tumorskog tkiva.

Javno dostupni RNASeq podaci su preuzeti iz *ArrayExpress* baze (E-MTAB-12862, publikovani 2024) (172). Podaci su generisani sekvenciranjem 1063 uzoraka primarnog KRK, kao i 120 uzoraka neizmenjenog okolnog tkiva na platformi *BGISEQ-500*. Za dalju analizu obuhvaćeni su samo parovi uzoraka tumorskog i neizmenjenog tkiva koji su uzeti od istog bolesnika (120 parova uzoraka, odnosno 240 uzorka ukupno).

Matrica ekspresije je preuzeta u formatu sirovih *count*-ova sa prethodno anotiranim HGNC (eng. *HUGO Gene Nomenclature Committee*, HGNC) simbolima gena, i podaci su obrađeni u programu R (v4.4.2) paketom *DESeq2* (v1.46.0). (4) Pre obrade, izvršeno je filtriranje nisko ekspimiranih gena, sa kriterijumom zadržavanja od  $\geq 10$  sirovih *count*-ova u najmanje 25 uzoraka. Izuzetak od slučaja su bili unapred definisani geni čija se diferencijalna ekspresija ispitivala (Tabela 3). Kontrola kvaliteta obuhvatila je analizu osnovnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA), kao i vizualizaciju matrice uzoraka posredstvom *dispersion plot*, *MA-plot* i *heatmap*. Analiza diferencijalne ekspresije odabranih gena (**Tabela 3.**) vršena je između pojedinačnih uzoraka tumora i neizmenjenog tkiva iz istog bolesnika. Normalizacija, analiza disperzije i statističko testiranje su urađeni standardnim procedurama paketa *DESeq2*. Diferencijalna ekspresija je testirana *Wald* testom, sa *Benjamini-Hochberg* metodom korekcije za višestruka poređenja. Prag značajnosti bio je FDR (engl. *False Discovery Rate*, FDR)  $< 0,05$ , a pozitivna vrednost  $\log_2FC$  označava povećanu ekspresiju gena u tumorskom tkivu.

**Tabela 3.** Odabrani geni za analizu diferencijalne ekspresije.

Gen	Produkt
<i>F2</i>	Protrombin
<i>F2R</i>	PAR1
<i>F2RL1</i>	PAR2
<i>F2RL2</i>	PAR3
<i>F2RL3</i>	PAR4
<i>FGA</i>	$\alpha$ subjedinica fibrinogena
<i>FGB</i>	$\beta$ subjedinica fibrinogena
<i>FGG</i>	$\gamma$ subjedinica fibrinogena

Set javno dostupnih podataka prostorne transkriptomike preseka tkiva KRK (173) je preuzet sa <https://www.10xgenomics.com/platforms/visium/product-family/dataset-human-crc>. Podaci prostorne transkriptomike su dobijeni pomoću *Visium HD* tehnologije (*10x Genomics*, SAD) i obrađeni pomoću *Space Ranger v3.0* (*10x Genomics*, SAD), čime su generisane gen-barkod matrice. Za analizu u okviru ove disertacije korišćen je jedan od tri dostupna preseka.

Dobijene gen-barkod matrice, veličine opservacije (prostorna jedinica u kojoj se meri ekspresija gena) 16  $\mu\text{m}$ , su potom obrađene u programskom jeziku *Python* (verzija 3.8), koristeći *Scanpy 1.9.1* paket.

Izvršeno je filtriranje opservacija sa manje od 300 transkripata i 200 gena, kao i geni detektovani u manje od 30 opservacija. Vrednosti ekspresije su potom normalizovane na 10000 transkripata po ćeliji i izvršena je log transformacija oblika  $\log(x+1)$ . Nakon toga identifikovani su visoko varijabilni geni pomoću *Cell Ranger* metode, pa su podaci skalirani i izvršena PCA analiza. Na osnovu 30 glavnih komponenti konstruisana je matrica susedstva (engl. *neighbors*) i izračunate međusobne distance između ćelija, da bi nakon toga, primenom *Leiden* algoritma uz rezoluciju 1, bilo izvršeno klasterovanje ćelija. Ćelijski tipovi su anotirani pomoću *Celltypist 1.7.1* paketa, sa modelom humanog KRK, a indeks genske ekspresije ispitan za odabrane gene iz **Tabele 3**. Ekspresija gena od interesa je poređena sa nasumično izabranim kontrolnim genima sličnog nivoa ekspresije, tako da je za svaku prostornu jedinicu izračunat indeks genske ekspresije (odnos odabranog seta gena i kontrolnog seta gena).

### 3.2.2. Analize na permanentnim ćelijskim linijama

*In vitro* eksperimenti su obuhvatili analizu efekta protrombina na promenu ekspresionog profila u odabranim ćelijskim linijama, kao i uticaj protrombina, trombina i direktnog inhibitora trombina na proliferaciju, migraciju i angiogenezu ćelija u kulturi. Takođe, ispitana je i mogućnost aktivacije protrombina u trombin od strane odabranih ćelija u kulturi.

#### 3.2.2.1. Gajenje ćelija

Ćelijske linije poreklom od kolorektalnog karcinoma (Caco-2, SW480, SW620, HCT116 i HT29) su gajene u *Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium* (DMEM, *Sigma*, SAD) sa visokom koncentracijom glukoze (4,5 g/L), dok su HepG2 ćelije gajene u DMEM medijumu sa niskim sadržajem glukoze (1 g/L). Medijumi su obogaćeni tako da finalno sadrže 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS, *Gibco*, SAD) i 1% miksa antibiotika penicilina i streptomcina i antimikotika amfotericina B (eng. *Antibiotic-Antimycotic mix*, *Sigma*, SAD). HCT116-GFP i EA.hy926 linije su gajene u DMEM (*Gibco*, SAD) medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (4,5 g/L), L-glutaminom i piruvatom, obogaćenim da sadrži 10% FBS i 1% miksa antibiotika-antimikotika, a u slučaju EA.hy926 dodavan je i HAT (5 mM natrijum hipoksantin, 20  $\mu$ M aminopterin i 0,8 mM timidin, *Gibco*, SAD) suplement u finalnoj koncentraciji od 2%. Ćelije su gajene u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37°C, poštujući propisane mere sterilnog rada.

Pred kultivaciju ćelija, alikvoti ćelija su izvađeni iz kanistera sa tečnim azotom (-196°C), brzo otopljeni i resuspendovani u kompletnom medijumu, prethodno zagrejanom na 37°C, u sterilnim sudovima za gajenje. Medijum je menjan po potrebi. Ćelije su pasažirane po dostizanju konfluentnosti od približno 80%, tako što je medijum uklanjan, ćelije ispirane u rastvoru 1x PBS-a (eng. *Phosphate Buffer Solution*, 137 mM NaCl, 3,38 mM KCl, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2), a potom tretirane sa 1x tripsin-EDTA (0,5 mg/mL tripsina i 0,2 mg/mL EDTA (eng. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)), u inkubatoru u toku 3-5 min, nakon čega je tripsin inaktiviran dodavanjem medijuma u jednakoj količini u odnosu na dodati tripsin, a ćelije zasejavane u odgovarajuće sudove za dalje gajenje ili zamrzavanje.

Nakon resuspendovanja broj ćelija je određivan na hemocitometru (*Neubauer*, Nemačka). Na pločicu je nanošeno 10  $\mu$ L resuspendovanih ćelija i ćelije su brojane u 2 do 4 polja. Broj ćelija je određivan po formuli: broj ćelija/mL = (broj ćelija/broj prebrojanih polja) x 10<sup>4</sup>.

Ćelije su pripremane za zamrzavanje centrifugiranjem 5 min na 350 x g, i resuspendovanjem ćelijskog taloga u medijumu za zamrzavanje koji sadrži 90% FBS-a i 10% dimetilsulfoksida (DMSO), kao krioprotektivnog agensa. Suspenzija ćelija je čuvana u kriotubama, u tečnom azotu.

### 3.2.2.2. Analiza ekspresije i aktivacije protrombina

#### 3.2.2.2.1. Tretmani ćelija u kulturi protrombinom

U prvom koraku ćelije su prebrojane i zasejane u odgovarajuće sudove, u standardnom medijumu za gajenje.

Nakon dostizanja konfluentnosti od 70%, ćelije su ispirane u 1x PBS-u, i dodavan je DMEM/F12 medijum (*Sigma*, SAD) sa dodatkom antibiotik-antimikotik miksa i vitaminom K u finalnoj koncentraciji 5 µg/mL. U okviru tretmana u medijum ćelija je dodavan protrombin u finalnoj koncentraciji od 0,1 mg/mL koja odgovara prosečnoj fiziološkoj koncentraciji protrombina u humanoj plazmi. Kako je korišćen komercijalni protrombin (*Thermo Scientific*, SAD) koji je rastvoren u 50% rastvoru glicerola, ćelije su paralelno tretirane i 50% glicerolom (dodavan u istoj zapremini kao protrombin), kao kontrolom rastvarača. Kao kontrole korišćeni su uzorci netretiranih ćelija. Tretmani su trajali 24 h i 48 h, nakon čega su prikupljeni medijumi i proteinski lizati ćelija, i izolovana RNK.

#### 3.2.2.2.2. Izolacija RNK iz ćelija u kulturi

Pred izolaciju RNK, medijum iznad ćelija je pokupljen i ćelije su oprane dva puta sa 1x PBS-om. U sud sa ćelijama nanet je *TRIzol* reagens (*Invitrogen*, SAD) u kome su ćelije resuspendovane nastavkom i prenete u tube. Uzorci su potom korišćeni odmah nakon resuspendovanja ili čuvani na -80°C. Ukoliko su zamrzavani, uzorci su prvo otopljeni na ledu pa korišćeni dalje po protokolu. Po resuspendovanju, uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi nakon čega je dodat hloroform (1/5 zapremine korišćenog *TRIzol* reagensa), smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 x g na temperaturi od 4°C. Posle centrifugiranja u tubi su se izdvojile vodena faza u kojoj se nalazi RNK, kao i interfaza i organska faza u kojima se nalaze DNK i proteini. Vodena faza je prebačena u novu tubu i dodat je izopropanol (1/2 zapremine korišćenog *TRIzol* reagensa). Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani na 12000 x g, 10 min na 4°C. Supernatant je odbačen i talog je resuspendovan u hladnom 75% etanolu (u jednakom odnosu na korišćeni *TRIzol* reagens), nakon čega su uzorci centrifugirani 10 min na 10000 x g na temperaturi od 4°C. Odliven je supernatant i ponovljen prethodni korak dodavanja etanola. Nakon centrifugiranja supernatant je uklonjen i talog kratko osušen na vazduhu, na sobnoj temperaturi. Precipitirana RNK resuspendovana je u 50 µL *nuclease-free* ili 0, 1% DEPC (dietilpirokarbonat) tretirane vode. Izolati RNK su čuvani na -80°C.

Prinos i kvalitet izolovane RNK je određen merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm, na spektrofotometru *BioNanoSpec* (*Shimatzu*, Japan).

#### 3.2.2.2.3. Sinteza molekula cDNK

Celokupna iRNK je prevođena u cDNK korišćenjem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*, SAD). Kit sadrži reverznu transkriptazu i nasumične (engl. *random*) graničnike. RNK izolovana iz ćelija korišćena je kao matrica u reakciji reverzne transkripcije (RT), finalne zapremine 20 µL.

Sastav reakcione smeše je bio:

RNK	1 µg
10x <i>RT Buffer</i>	2 µL
25x dNTP	0,8 µL
10x <i>random</i> graničnici	2 µL
50 U/µL <i>MultiScribe</i> reverzna transkriptaza	1 µL

Temperaturni profil reakcije je bio:

- 25°C/25 min
- 37°C/120 min
- 85°C/5 s
- 4°C ∞

Po završetku reakcije, cDNK su čuvane na -20°C.

#### 3.2.2.2.4. Kvantifikacija genske ekspresije metodom PCR-a u realnom vremenu

Relativni nivo ekspresije ciljanih gena određen je metodom PCR-a u realnom vremenu (eng. *Real-Time PCR*, *Quantitative PCR*, qPCR), korišćenjem *TaqMan Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems*, SAD). Gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (eng. *Glyceraldehyde-2-Phosphate Dehydrogenase*, GAPDH) je odabran kao referentni gen jer je konstitutivno eksprimiran u svim ćelijama.

Za detekciju ekspresije gena za protrombin i PAR-1 korišćene su odgovarjuće *TaqMan* MGB probe obeležene FAM-om, a za GAPDH *TaqMan* TAMRA proba obeležena VIC-om. Reakcije su rađene u finalnoj zapremini od 10 µL. Sastav reakcione smeše je bio:

2x univerzalni PCR <i>MasterMix</i>	5 µL
20x <i>TaqMan Gene Expression Assays</i>	0,5 µL
cDNK	1,5 µL

Temperaturni profil reakcije je bio:

- 50°C/2 min
- 95°C/10 min
- (95°C/15 s, 60°C/1 min) x 40 ciklusa

Reakcije PCR-a u realnom vremenu vršene su na aparatu *7500 Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*, SAD) i *Line-Geno 9600 Plus Real-Time PCR* (*Hangzhou Bioer Technology*, Kina). Dobijeni podaci obrađeni su uz pomoć softvera *ABI Prism 7500* (*Applied Biosystems*, SAD) i *Microsoft Office Excel* (*Microsoft Office*, SAD).

### 3.2.2.2.5. Određivanje diferencijalne ekspresije ciljnih gena metodom RNASeq

RNK korišćene za sekvenciranje transkriptoma izolovane su iz Caco-2 ćelija metodom opisanom u poglavlju 3.2.2.2.2. Uzorci su obuhvatili RNK izolovane iz netretiranih ćelija i ćelija tretiranih glicerolom i protrombinom (u finalnoj koncentraciji 0, 1 mg/mL), u periodu od 24 h i 48 h.

Prvi korak u pripremi biblioteke obuhvatio je “obogaćivanje” uzorka uklanjanjem ribozomalne RNK (rRNK) korišćenjem *MGIEasy rRNA Depletion* (MGI, Kina) kita, čime se značajno povećava udeo informativnih transkripata u RNA-seq analizi. Prvo, uzorak RNK se inkubirao sa puferom za hibridizaciju i smešom rRNK proba po protokolu (95°C 2 min, 95°C do 22°C se spušta 0.1°C/s, 22°C 5 min) kako bi se probe vezale za rRNK. Nakon toga, u uzorak je dodavana digestiona smeša sačinjena od *RNase H* i pufera, kako bi se uklonila rRNK iz hibridi rRNK i probe, i inkubirano je 30 min na 37°C. U sledećem koraku dodata je digestiona smeša sačinjena od *DNase I* i pufera, koja uklanja probe kao i ostatke genomske DNK, na temperaturi od 37°C u trajanju od 30 min. Na kraju, RNK je prečišćena pomoću magnetnih kuglica i 80% etanola. Nakon uklanjanja supernatanta, kuglice sa vezanom RNK su eluirane u TE puferu, kako bi se oslobodila RNK.

Nakon uklanjanja rRNK, za dalje korake u pripremi biblioteke korišćen je kit *MGIEasy Fast RNA Library Prep Set* (MGI, Kina). Prvi korak je podrazumevao fragmentaciju RNK dodavanjem fragmentacionog pufera i inkubaciju na 87°C u toku 6 min. U sledećem koraku izvršena je reverzna transkripcija dodavanjem odgovarajuće smeše, na temperaturnom profilu 25°C 10 min, 42°C 15 min, 70°C 15 min, 4°C do sledećeg koraka, čime se sintetiše cDNK korišćenjem postojeće RNK kao matrice. Potom, izvršena je sinteza drugog lanca (engl. *Second-strand synthesis*) i poravnavanje krajeva (engl. *End-repair*). U prethodnu smešu dodata je smeša pufera i miksa enzima, i izvršena reakcija na odgovarajućem temperaturnom profilu (16°C 30 min, 65°C 15 min, 4°C do sledećeg koraka). Time su dobijeni dvolančani DNK fragmenti koji se koriste u sledećim reakcijama.

U daljem koraku sledi ligacija adaptera. U smešu iz prethodne reakcije dodate su komponente za ligaciju (adapteri i smeša pufera i DNK ligaze), zatim se izvršena inkubacija u toku 15 min na 23°C, a potom na 4°C do sledećeg koraka. Nakon toga, uzorci su prečišćeni pomoću magnetnih kuglica i 80% etanola. Kuglice sa vezanom DNK su potom eluirane u TE puferu, kako bi se oslobodila DNK. U dobijeni uzorak dodata je PCR smeša koja sadrži barkodirane graničnike, i umnoženi ciljni fragmenti korišćenjem odgovarajućeg temperaturnog profila (95°C 3 min, 14x (95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s), 72°C 5 min, 4°C do sledećeg koraka). Ovim su dobijeni uzorci obeleženi individualno barkodovima, čime se omogućava razlikovanje uzoraka prilikom bioinformatičke analize rezultata. PCR produkti su prečišćeni pomoću magnetnih kuglica i 80% etanola, a kuglice eluirane u TE puferu kako bi se oslobodila DNK. Nakon prečišćavanja, određen je kvalitet dobijenog produkta: merenjem koncentracije na *Qubit4* fluorometru (*ThermoFisher Scientific, SAD*) pomoću *Qubit dsDNA Assay* kita (*ThermoFisher Scientific, SAD*) i određivanjem veličine fragmenata korišćenjem aparata *4200 TapeStation* (*Agilent Technologies, SAD*).

Sledeći korak je bilo objedinjavanje uzoraka radi pripreme jedinstvene biblioteke sa ujednačenom količinom DNK svakog uzorka (2,1 pmol fragmenata dužine od 350 bp do 500 bp). Nakon toga, izvršena je denaturacija uzoraka 3 min na 95°C, pa cirkularizacija jednolančane DNK. Denaturisanom uzorku je dodata smeša za cirkularizaciju, pa se inkubirano 10 min na 37°C. Nakon cirkularizacije, u uzorke je dodata digestiona smeša i inkubirano 10 min na 37°C, pa na 4°C do sledećeg koraka. Ovime se uklanjaju delovi DNK koji nisu cirkularizovani. Dobijeni produkt digestije je prečišćen pomoću magnetnih kuglica i 80% etanola, i kuglice su eluirane u TE puferu kako bi se oslobodila DNK. Korišćenjem *Qubit ssDNA Assay* kita na *Qubit 4* fluorometru je potom izmerena koncentracija uzoraka.

Dobijeni uzorak korišćen je za dalju sintezu DNK nanokuglica (eng. *DNA Nano-Ball, DNB*). Prvi korak je bio dodavanje smeše koja sadrži graničnik i njegova hibridizacija (po temperaturnom profilu: 95°C 1 min, 65°C 1 min, 40°C 1 min, 4°C do sledećeg koraka), a potom je dodata smeša enzima koja omogućava umnožavanje po principu “kotrljajućeg obruča” (eng. *Rolling Circle Amplification, RCA*), na 30°C 25 min, pa potom na 4°C do sledećeg koraka. Koncentracija dobijenih DNK nanokuglica je izmerena na *Qubit 4* fluorometru kitom *Qubit ssDNA Assay Kit*.

Dobijene biblioteke su nanešene na protočnu ćeliju *FCL PE150*. Reagensi za sekvenciranje (*dNTP mix, dNTP mix II, Sequencing Enzyme Mix, MDA Enzyme Mix, MDA Enzyme Reagent*) su nanešeni na odgovarajuće pozicije na kertridžu. Protočna ćelija i kertridž su postavljeni u *DNBSeq G400* sekvencer (*BGI, Kina*) i reakcija je vršena po protokolu za *PE150 (paired-end* očitavanja). Kontrola kvaliteta sirovih *FASTQ* fajlova je sprovedena alatom *FastQC* (v.0.12.1). Uklanjanje adaptera i filtriranje prema kvalitetu je urađeno alatom *Fastp* (v0.23.4), pri čemu su uklonjena očitavanja lošeg kvaliteta, i očitavanja kraća od 60 nukleotida. Očitavanja koja su prošla kontrolu kvaliteta su poravnata na humani referentni genom *hg38 (Ensembl release 113)*, pomoću alata *STAR*.

Kvantifikacija očitavanja po genima sprovedena je alatom *featureCounts* (v2.0.4), čime je formirana sirova *count* matrica (eng. *raw count matrix*). Anotacija gena je izvršena mapiranjem *Ensembl ID*-jeva na HGNC simbole. Kontrola kvaliteta je obuhvatila PCA analizu i *dispersion plot*. Kao i kod obrade podataka iz javnih baza, ispitana je diferencijalna ekspresija gena iz **Tabele 3.**, paketom *DESeq2* u programu R, korišćenjem *Wald* testa uz *Benjamini-Hochberg* korekciju za višestruka poređenja (FDR). Nakon toga, sprovedeno je funkcionalno obogaćenje metodom *pre-ranked GSEA* (eng. *Gene Set Enrichment Analysis, GSEA*) na *Gene Ontology* terminima iz kategorije bioloških procesa.

#### **3.2.2.2.6. Prikupljanje medijuma i izolacija proteina iz ćelija u kulturi**

Po završetku tretmana, medijumi su prikupljeni u sterilne tube i centrifugirani 10 min na 400 x g na 4°C kako bi se uklonile mrtve ćelije i debris. Potom, supernatant je prebačen u nove tube i sonifikovan 3x10 sek kako bi se razbile vezikule sa proteinima koje su ćelije oslobađale u medijum. Medijumi su potom razdeljeni u tube i čuvani na -80°C do dalje upotrebe. Nakon prikupljanja medijuma ćelije su isprane 1x PBS-om i odvojene od površine suda korišćenjem 1x tripsin-EDTA, a zatim resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija. Centrifugiranjem 10 min na 400 x g na 4°C ćelije su oborene, supernatant je odliven, a talog ćelija je resuspendovan u 1x PBS-u i opet centrifugiran 10 min na 400 x g na 4°C. Posle centrifugiranja, supernatant je opet uklonjen, a talog ćelija resuspendovan u puferu za lizu (10mM Tris pH8.0, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, koktel proteaznih inhibitora (*Roche, Švajcarska*)). Lizati ćelija su inkubirani na ledu 1 h, a zatim sonifikovani 3x10 sek i centrifugirani 30 min na 18000 x g na 4°C. Dobijeni supernatanti sa ukupnim proteinima ćelija su raspodeljeni u tube i čuvani na -80°C do upotrebe.

#### **3.2.2.2.7. Merenje koncentracije ukupnih proteina**

Koncentracija ukupnih proteina u ćelijskom lizatu korišćenih za ELISA eseje određivana je metodom po *Bradford*-u. Ova metoda se zasniva na vezivanju komazi plavo boje (eng. *Coomassie Brilliant Blue*) za proteine, pri čemu je intenzitet boje proporcionalan koncentraciji proteina (174).

Za potrebe metode, napravljena je serija standardnih razblaženja BSA (albumin iz seruma govečeta, eng. *Bovine Serum Albumin*) u sterilna voda koncentracija od 0,0625 do 1 mg/mL. Po 10 µL standardnih razblaženja i uzoraka je resuspendovano u 200 µL *BioRad Protein Assay Dye* reagensa (*BioRad, SAD*) nakon čega je spektrofotometrijski merena apsorbancija na talasnoj dužini od 595 nm. Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbancije standardnih razblaženja BSA poznate koncentracije konstruisana je standardna kriva i sa nje određena koncentracija proteina u ćelijskim lizatima na spektrofotometru *Infinite 200 PRO multiplate reader (TECAN, Švajcarska)*.

Koncentracija ukupnih proteina u ćelijskom lizatu korišćenim za *Western blot* i esej aktivacije fluorescentnog supstrata određivana je pomoću kita *Qubit™ Protein BR Assay Kit (Invitrogen, SAD)*, po protokolu proizvođača. Esej se zasniva na fluorescentnoj detekciji proteina i merenju njihove koncentracije na osnovu standardne krive sa opsegom detekcije od 0 do 10 mg/mL. U sterilnim tubama pravljena je smeša 150 µl *Qubit* pufera iz kita i 20 µl standarda iz kita ili uzorka lizata. U tube je potom dodato 30 µl *Qubit* reagensa i vorteksovano, pa inkubirano na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon inkubacije, intenzitet fluorescence standarda i uzoraka je meren na *Qubit 4* fluorometru (*ThermoFisher Scientific, SAD*), na osnovu čega su određene koncentracije proteina.

### 3.2.2.2.8. ELISA eseji

Za određivanje koncentracije ciljnih proteina: protrombina i F1+2 korišćeni su odgovarajući ELISA eseji (eng. *Enzyme-Linked Immosorbent Assay*). Po principu kolorimetrijski, korišćeni eseji se baziraju na kvantifikaciji ciljanog molekula pomoću njegovog vezivanja za dva antitela preko različitih epitopa, takozvani kvantitativni "sendvič" enzimski imunoesej. Jedno antitelo je fiksirano za dno bunarića, dok je drugo antitelo vezano za enzim i omogućava razviće signala u vidu boje koja se detektuje na određenoj talasnoj dužini (175).

Za određivanje koncentracije protrombina korišćen je *Human Prothrombin ELISA Kit (Novus Biologicals, SAD)* dizajniran za detekciju protrombina u različitim tipovima uzoraka. Svi reagensi i uzorci su pripremljeni po uputstvu proizvođača. Reagensi su temperirani i esej postavljen na sobnoj temperaturi. U bunariće je dodato 50 µL blanka, standarda i uzorka. Nakon inkubacije 2 h na sobnoj temperaturi, bunarići su isprani pet puta sa 200 µL pufera za ispiranje. U bunariće je zatim dodato 50 µL biotinihovanog humanog antitela za protrombin razblaženog po uputstvu proizvođača i inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi. Bunarići su opet isprani pet puta sa 200 µL pufera za ispiranje, i inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi sa 50 µL konjugata (*SP Conjugate* iz kita, rastvoren po uputstvu proizvođača). Bunarići su zatim isprani pet puta sa 200 µL pufera za ispiranje i u bunariće dodato 50 µL hromogenog supstrata (*Chromogen substrate* iz kita). Nakon 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi, u bunariće je dodato 50 µL rastvora za zaustavljanje reakcije (*Stop Solution* iz kita) i apsorbancija svakog uzorka merena na 450 nm, sa optičkom korekcijom na 570 nm. Koncentracije pojedinih uzoraka određene su preko standardne krive kontruisane pomoću apsorbanci i koncentracija blanka i standardnih rastvora.

Za detekciju fragmenta F1+2 korišćen je ELISA kit *Enzygnost F1+2 (Siemens, Nemačka)*. U svaki bunarić je naneto 50 µL pufera (*Sample Buffer F 1+2* iz kita), pa zatim 50 µL standarda, kontrolne plazme i uzorka, uz mešanje nastavkom. Nakon inkubacije 30 min na 37°C, bunarići su isprani dva puta sa 300 µL rastvora za ispiranje (*Washing Solution* iz kita). U bunariće je potom dodato 100 µL konjugata (*Conjugate Solution - Anti-Human Prothrombin/POD-Conjugate + Conjugate Buffer* iz kita) i inkubirano 15 min na 37°C. Potom, bunarići su isprani tri puta sa 300 µL rastvora za ispiranje, i inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi sa 100 µL hromogenog supstrata (*Chromogen Buffer/Supstrate working solution - Chromogen TMB + Buffer/supstrate TMB* iz kita). Nakon inkubacije je u bunariće dodato 100 µL rastvora za zaustavljanje reakcije (*Stopping Solution POD* iz kita) i apsorbancija svakog uzorka merena na 450 nm, uz referentnu talasnu dužinu na 650 nm. Koncentracije pojedinih uzoraka određene su preko standardne krive kontruisane pomoću apsorbanci i koncentracije blanka i standardnih rastvora.

### 3.2.2.2.9. Western blot

Za potvrdu prisustva protrombina i trombina u uzorcima lizata i medijuma korišćena je i metoda *Western blot*. Ova metoda je bazirana na elektroforetskom razdvajanju proteina na dvokomponentnom denaturišućem poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu sa natrijum dodecil sulfatom, eng. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), na osnovu razlike u molekularnoj masi (176).

Na gel je nanošeno 74 µg ukupnih proteina lizata netretiranih ćelija, tretiranih 50% glicerolom kao i komercijalnim humanim protrombinom (*Thermo Scientific*, SAD) u koncentraciji 0,1 mg/mL. Nanešena količina proteina je preračunata na osnovu koncentracije proteina u lizatu, dobijenih merenjem na *Qubit 4* fluorometru (*Thermo Scientific*, SAD). U slučaju ćelijskih medijuma, nanošena je maksimalna količina uzorka koja staje na gel (22,5 µl). Kao pozitivne kontrole su korišćeni humani protrombin (2,25 µg), goveđi trombin (*Sigma-Aldrich*, SAD) (0,75 U) i fragment F1+2 (*Thermo Scientific*, SAD) (2,25 µg). Dodatno, nanet je i proteinski marker poznatih molekularskih težina (*Thermo Scientific*, SAD). Uzorci su pripremljeni dodavanjem 4x razblaženog pufera za nanošenje na gel (50 mM Tris pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,1% bromfenolplavo) i denaturisanjem 5 min na 95°C, i nakon toga nanošeni na gel.

Dvokomponentni gel se sastojao od gela za koncentrovanje (6% poliakrilamid; 0,5 M Tris HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED (tetrametiletildiamin)), koji omogućava koncentrisanje uzoraka, i gela za razdvajanje (12% poliakrilamid; 375 mM Tris HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED), koji omogućava razdvajanje proteina na osnovu molekularske mase, pri čemu manji proteini putuju brže kroz gel. Elektroforeza se vršila u TGB puferu (25 mM Tris HCl, pH 8,8; 250 mM glicin; 0,1% SDS) pri konstantnom naponu od 100 V tokom elektroforezi uzoraka u gelu za koncentrovanje, a 180 V u gelu za razdvajanje.

Nakon razdvajanja, proteini su prenošeni na membranu od poliviniliden fluorida *Immobilon-P* (*Millipore*, SAD), sistemom za polusubi transfer (*Biometra*, Nemačka). Prvo, membrana je par sekundi potopljena u metanol kako bi se aktivirala, a potom ispirana 5 min u destilovanoj vodi i inkubirana 5 min u anodnom puferu II (25 mM Tris HCl, pH 10,4; 20% metanol), dok je gel sa uzorcima inkubiran u katodnom puferu (25 mM Tris HCl, pH 9,4; 40 mM glicin; 20% metanol). U sistemu za prenošenje proteina, anodna ploča je pokvašena anodnim puferom I (300 mM Tris HCl, pH 10,4; 20% metanol), na nju stavljena dva 3MM papira za hromatografiju (*Whatman*, UK) natopljena anodnim puferom I, a preko njih je stavljen jedan 3MM papir natopljen anodnim puferom II. Preko toga papira je stavljana aktivirana membrana, a preko nje gel sa uzorcima. Preko gela stavljana su tri 3MM papira natopljena katodnim puferom. Transfer je vršen 60 min pri stalnoj struji od 2,5 mA/cm<sup>2</sup> membrane.

Membrana je potom inkubirana u rastvoru za blokiranje tokom noći na 4°C, kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela, i potom isprana TBST puferom (1 M Tris HCl, pH 7,5; 5 M NaCl, 0,1% Tween 20) pre inkubacije sa primarnim antitelom. Nakon inkubacije u rastvoru za blokiranje od 5% BSA u TBST puferu, membrana je inkubirana u TBST puferu sa mišjim monoklonskim primarnim protrombinskim antitelom (*F1*, *Santa Cruz Biotechnology*, SAD) u razblaženju od 1:3000, dok je nakon inkubacije u rastvoru za blokiranje od 5% mleka u TBST puferu, membrana inkubirana sa mišjim monoklonskim antitelom (*5G9*, *Abcam*, UK) razblaženim u odnosu 1:5000 u 5% mleku rastvorenom u TBST puferu. Membrane su inkubirane u rastvoru sa primarnim antitelom, tokom noći na 4°C, uz lagano mešanje. Nakon inkubacije, membrane su isprane tri puta po 10 min u TBST puferu, zatim inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u rastvoru sa sekundarnim zečjim poliklonskim antitelom *Anti-Mouse IgG peroxidase conjugate* (*Sigma Aldrich*, Nemačka), u razblaženju 1:80000. Rastvor za razblaživanje antitela je bio 2% BSA u TBST puferu (nakon *F1* primarnog antitela) ili 5% mleko u TBST puferu (nakon *5G9* primarnog antitela). Nakon toga, membrane su isprane tri puta po 10 min sa TBST puferom. Hemiluminiscentni ECL supstrat (eng. *Enhanced ChemiLuminescence reagent; Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate*, *Sigma Aldrich*, SAD) je potom inkubiran sa membranom u trajanju od 1 min, a signal detektovan korišćenjem *ChemiDoc* (*BioRad*, SAD) aparata.

### 3.2.2.2.10. Određivanje enzimske aktivnosti primenom fluorescentnog supstrata

Kako bi se utvrdilo da li se u lizatima i medijumima Caco-2 ćelija tretiranih protrombinom dolazi do aktivacije protrombina u trombin, korišćen je fluorescentni supstrat specifičan za trombin. Kao

pozitivna kontrola korišćen je komercijalni trombin (napravljen rastvor koncentracije 10 U/mL; *Sigma*, SAD), a kao negativna komercijalni protrombin (napravljen rastvor koncentracije 0,1 mg/mL). Kao i za WB, je i uzorak komercijalnog fragmenta F1+2 (koncentracije 0,1 mg/mL). U bunariće crnih mikrotitar ploča sa 96 bunarića sa providnim dnom (*ThermoScientific*, SAD) dodavana je smeša fluorescentnog supstrata trombina Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-metilkumarin hidrohlorida (*Sigma*, SAD) u finalnoj koncentraciji 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ L uzoraka ili kontrola i 88  $\mu$ l sterilne vode. Fluorescenca je merena na 37°C svakog minuta tokom 1 h, na aparatu *FLUOstar Omega* (*BMG LABTECH*, Nemačka). Talasna dužina ekscitacije je bila 350 nm, a emisije 460 nm.

### 3.2.2.3. MTT esej

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) test je kolorimetrijska metoda koja se koristi za merenje vijabilnosti i proliferacije ćelija, i citotoksičnosti primenjenih tretmana. Zasniva se na sposobnosti mitohondrijskih enzima NAD(P)H-zavisnih oksidoreduktaza da u mitohondrijama redukuju žuti MTT u ljubičasti formazan, koji se rastvara u DMSO (177). Kako se ova reakcija odigrava samo u živim ćelijama, merenjem količine dobijenog formazana moguće je odrediti vijabilnost ćelija, a time indirektno i proliferaciju.

Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su isprane dva puta sa 1x PBS i odlepljene od podloge, pa prebrojane. Ćelije su potom zasejane u definisanom broju (**Tabela 4.**) u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (*Sarstedt*, Nemačka), u kompletnom DMEM medijumu, i ostavljene 24 h da se zalepe.

**Tabela 4.** Broj ćelija zasejan po bunariću.

Ćelijska linija	Broj ćelija
Caco-2	6000
SW480	3000
SW620	15000
HCT116	12000
HT29	10000

Nakon toga, medijum je uklonjen, ćelije isprane sa 1x PBS i u bunariće dodat DMEM/F12 medijum sa dodatkom antibiotik-antimikotik miksa (finalne koncentracije 1%) i odgovarajućeg tretmana. Za svaki tretman postavljena je i kontrola rastvarača, kao i medijum bez tretmana, kao kontrola netretiranih ćelija. Koncentracije tretmana su prikazane u **Tabeli 5.**

**Tabela 5.** Pregled primenjenih tretmana i kontrola.

<b>Tretman</b>	<b>Koncentracija (finalno)</b>	<b>Kontrola rastvarača (u istoj zapremini kao odgovarajući tretman)</b>
Humani protrombin ( <i>ThermoFisher</i> , SAD)	0,02 mg/mL (PT1) 0,1 mg/mL (PT2) 0,5 mg/mL (PT3)	50% glicerol u koncentraciji koja odgovara PT3
Goveđi trombin ( <i>Sigma</i> , SAD)	0,1 U/mL (T1) 0,5 U/mL (T2) 2,5 U/mL (T3)	0,1% BSA u koncentraciji koja odgovara T3
Dabigatran ( <i>Sigma</i> , SAD)	100 nmol/L (D1) 500 nmol/L (D2) 1500 nmol/L (D3)	0,1 M HCl u koncentraciji koja odgovara D3
Trombin + Dabigatran	T3+D1 T3+D3	/

Ćelije su inkubirane sa odgovarajućim tretmanom 24 h i 48 h. MTT (*Sigma*, SAD) je rastvaran do koncentracije 5 mg/mL u 1x PBS-u, pa potom u čistom DMEM medijumu do koncentracije 0,5 mg/mL. Nakon tretmana, medijum iznad ćelija je uklonjen i dodat svež DMEM medijum sa rastvorenim MTT-om. Ćelije sa MTT-om su inkubirane 2 h na 37°C, potom je medijum uklonjen i ćelije lizirane u 100 µL DMSO tokom 20 min. Apsorbanca je merena na 570 nm, sa pozadinom na 630 nm, na spektrofotometru (*Infinite 200 PRO Microplate Reader*, *Tecan*, Austrija). Svaki tretman je minimalno rađen u triplikatu, a svaki eksperiment ponovljen minimalno tri puta.

#### 3.2.2.4. Test zarastanja povrede

Test zarastanja povrede (eng. *wound healing assay* ili *scratch assay*) se koristi za ispitivanje *in vitro* migracionog potencijala ćelija. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su odlepljene od podloge i prebrojane, pa potom zasejane u petri sudove prečnika 35 mm (*Sarstedt*, Nemačka). Ćelije su gajene u kompletnom DMEM medijumu do dostizanja konfluentnosti veće od 90%, pa su potom u jednom delu suda mehanički odstranjene plastičnim nastavkom od 200 µL, tj. napravljena je vertikalna povreda. Ćelije su potom isprane sa 1x PBS kako bi se uklonile ćelije koje su se odlepili od površine suda. Ćelijama je potom dodat medijum DMEM/F12 sa dodatkom 1% antibiotik-antimikotik smeše i odgovarajućim koncentracijama tretmana. Za svaki tretman postavljena je i kontrola rastvarača, kao i opšta kontrola ćelija u DMEM/F12 medijumu sa 1% antibiotik-antimikotik smeše. Primenjeni tretmani su bili protrombin u koncentraciji 0,1 mg/mL (kontrola nosača je 50% glicerol u istoj koncentraciji), trombin u koncentraciji 0,5 U/mL (kontrola nosača je 0,1% BSA u istoj koncentraciji) i dabigatran u koncentraciji od 500 nM (kontrola nosača je 0,1 M HCl), kao i kombinacija 0,5 U/mL trombina i 500 nM dabigatrana. Ista zona povrede je fotografisana u momentu nanošenja povrede (0 h) i nakon 24 h i 48 h tretmana, upotrebom invertnog mikroskopa *DM IL LED* (*Leica Microsystems*, Nemačka), na uveličanju 10X. Površina praznog prostora u svakoj vremenskoj tački je analizirana primenom softvera *ImageJ* (verzija 1, 53; *NIH*, SAD). Svaka povreda je rađena u triplikatu, a svaki eksperiment ponovljen minimum tri puta.

### 3.2.2.5. Efekat tretmana na proces angiogeneze

U cilju ispitivanja angiogenog potencijala ćelija tretiranih protrombinom, analiziran je efekat ćelijskog medijuma Caco-2 ćelija na proliferaciju i migraciju ćelijske linije EA.hy926, MTT testom i testom zarastanja povrede. Na mikrotitar ploču sa 6 bunarića (*Sarstedt*, Nemačka) zasejano je 750000 ćelija Caco-2 po bunariću, u 2 mL kompletnog DMEM medijuma. Nakon 24 h medijum je zamenjen sa DMEM/F12 medijumom sa 1% antibiotik-antimikotik smeše i 1% L-glutamina, sa dodatkom protrombina u finalnoj koncentraciji 0,1 mg/mL. Kao kontrole korišćeni su medijum bez tretmana i medijum sa dodatkom 50% glicerola (u istoj zapremini kao protrombin, kao kontrola nosača). Nakon 24 h odnosno 48 h tretmana, medijumi iznad ćelija su pokupljeni i centrifugirani 10 min na 800 g kako bi se oborile mrtve ćelije i ćelijski debris. Ovi medijumi su obeleženi kao kondicionirani medijumi (KM). Dodatno, pripremljen je medijum sa protrombinom koji je inkubiran na 37°C u trajanju tretmana, ali bez ćelija. Spisak i sastav medijuma u kojima su tretirane ćelije se nalazi u **Tabeli 6**.

**Tabela 6.** Sastav medijuma u kojima su tretirane ćelije EA.hy926 ćelije.

Medijum (oznaka)	Sastav
DMEM/F12	DMEM/F12 medijum sa dodatkom antibiotik-antimikotik smeše i L-glutamina
PT37°C	DMEM/F12 medijum sa dodatkom antibiotik-antimikotik smeše i L-glutamina i protrombina u koncentraciji 0, 1 mg/mL, inkubiran bez ćelija na 37°C u trajanju tretmana Caco-2 ćelija
KM N	Kondicionirani DMEM/F12 medijum sa dodatkom antibiotik-antimikotik smeše i L-glutamina, pokupljen sa Caco-2 ćelija nakon 24h ili 48h
KM G	Kondicionirani DMEM/F12 medijum sa dodatkom 1% antibiotik-antimikotik smeše, L-glutamina i 50% glicerola (zapremine kao protrombin), pokupljen sa Caco-2 ćelija nakon 24h ili 48h
KM PT	Kondicionirani DMEM/F12 medijum sa dodatkom antibiotik-antimikotik smeše, L-glutamina i protrombina (0, 1 mg/mL finalno), pokupljen sa Caco-2 ćelija nakon 24h ili 48h

Za ispitivanje efekta na proliferativnost, EA.hy926 ćelije gajene su do konfluentnosti, nakon čega su isprane, pasażirane i prebrojane. Odgovarajući broj ćelija je potom podeljen u mikrotube, oboren 5 min na 300 x g i resuspendovan u medijumu za tretman (**Tabela 6**), pa zasejan na mikrotitar ploču sa 96 bunarića (*Sarstedt*, Nemačka), sa 12500 ćelija u 100 µL medijuma po bunariću. Ćelije su inkubirane 20 h u na 37°C sa 5% CO<sub>2</sub>. Nakon tretmana, medijum je zamenjen sa 100 µL čistog DMEM medijuma sa 0, 5 mg/mL MTT reagensa, i ćelije inkubirane 2 h na 37°C sa 5% CO<sub>2</sub>. Medijum sa MTT reagensom je potom zamenjen sa 100 µL DMSO u kome su ćelije lizirane 20 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca razvijene boje izmerena je na 570 nm sa pozadinom od 630 nm na aparatu *Infinite 200 PRO Microplate Reader* (*Tecan*, Austrija).

Za ispitivanje efekta na migratorni potencijal, EA.hy926 ćelije sejane su u mikrotitar ploče sa 24 bunarića (*Sarstedt*, Nemačka), u gustini od 70000 ćelija po bunariću u 500  $\mu$ L kompletnog DMEM medijuma. Nakon 24 h, po formiranju monosloja, nastavkom od 200  $\mu$ L po sredini bunarića je celom dužinom napravljena vertikalna povreda. Medijum je uklonjen i ćelije isprane 1x PBS puferom i dodat je medijum za tretmane (**Tabela 6.**) u zapremini od 500  $\mu$ L. Po postavljanju tretmana (0 h tretmana), povrede su slikane na invertno faznom kontrastnom mikroskopu *Zeiss Axiovert* (*Karl Zeiss*, Nemačka), na uveličanju 10X. Nakon 20 h tretmana, povrede su opet uslikane na istom mestu kao na 0 h. Površina praznog prostora u svakoj vremenskoj tački je analizirana primenom softvera *ImageJ*.

### 3.2.3. Analize na model sistemu zebrice

Za ispitivanje efekta trombina i inhibitora trombina na ponašanje KRK ćelija *in vivo*, korišćeni su ksenografti ćelija u model sistemu zebrice.

#### 3.2.3.1. Gajenje i mrešćenje zebrica

Zebrice su gajene na temperaturi vode od 28°C, uz neprekidnu aeraciju i filtraciju vode. Ciklus dana/noći je održavan veštački pod svetlom, u odnosu 14 h svetlo: 10 h mrak. Jedinke su hranjene komercijalno dostupnom hranom (*Sparos*, Portugal) sa dodatkom živih račića artemija (lat. *Artemia nauplii*).

Prilikom mrešćenja, u mrestilicu su stavljane ženke i mužjaci odvajani pregradom, koja je uklanjana narednog dana po paljenju svetla u uzgajalištu. Ovim je omogućeno da dobijena jaja budu istovremeno oplodena u određenom momentu. Sat vremena nakon uklanjanja pregrada, jaja su skupljana u petri posude sa rastvorom *Instant Ocean* (SAD) sa dodatkom metilen plavog (finalna koncentracija 0,04%; *Sigma*, SAD). Neoplođena i jaja sa nedostatkom u razviću su uklanjana. Oplodena jaja su inkubirana na 28°C do daljeg korišćenja.

#### 3.2.3.2. Inokulacija ćelija KRK u embrione zebrica

Kako bi bilo utvrđeno potencijalno dejstvo odabranih reagenasa na razviće samih embriona, postavljen je test toksičnosti. Embrioni stari 72 h su razvrstani u bunariće mikrotitar ploče sa 24 bunarića (*Sarstedt*, Nemačka), od 7 do 12 embriona po bunariću, ili u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (*Sarstedt*, Nemačka), jedan embrion po bunariću, a 10 embriona po tretmanu. U bunariće je nanet *Instant Ocean* rastvor za embrione sa rastvorenim odgovarajućom količinom tretmana, a potom je ploča prebačena u inkubator na 34°C (isti uslovi za eksperimente sa ksenograftima). Sledećih 72 h, praćeno je razviće embriona korišćenjem stereo mikroskopa.

Injektiranje ćelija vršeno je 48 h nakon oplodjenja. Ukoliko se nisu izlegli, embrioni su prvo bili dehorionisani ručno pincetama ili korišćenjem pronaze (*Sigma-Aldrich*, SAD), i pravilno razvijeni embrioni izabrani za injektiranje.

Ćelije HCT116-GFP su gajene u flaskovima površine 75 cm<sup>2</sup>, u DMEM medijumu. Po dostizanju konfluentnosti oko 80%, ćelije su ispirane dva puta sa 1x PBS, pa u rastvoru EDTA, a zatim "izgrebane" sa površine suda i pokupljene u sterilnu tubu. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a ćelije u talogu isprane sa 1x PBS i opet centrifugirane. Talog ćelija je potom rastvoren u 1x PBS-u.

Embrioni su anestetizirani u vodi sa dodatkom 0, 4 mg/mL *Tricaine-S* (*Western Chemicals Inc*, SAD) i pozicionirani na 3% agaroznom nosaču za inokulaciju ćelija. Oko 500-1000 HCT116-GFP ćelija su potom injektirane u perivitelinski prostor embriona, pomoću mikroinjektora *PV820* (*World Precision Instruments*, SAD). Embrioni su potom inkubirani na 34°C.

Nakon 24 h tj. jedan dan nakon injektiranja ćelija (eng. *day post injection*, dpi), uklonjeni su embrioni koji nisu preživeli, a odabrani embrioni su uslikani na fluorescentnom mikroskopu *THUNDER Imager Model Organism* sa *Las X* softverom (*Leica*, Nemačka), kako bi izgled i veličina ksenografta bili zabeleženi pre tretmana. Potom, embrioni su podeljeni u grupe sa tretmanima i inkubirani na 34°C. Četvrtog dana nakon inokulacije (4 dpi), odnosno nakon 72 h tretmana, embrioni su ponovo slikani na fluorescentnom mikroskopu, sa istim podešavanjima softvera. Intenzitet fluorescence u ksenograftima kvantifikovan je u *ImageJ* softveru. Uticaj tretmana na veličinu tumorske mase izražen je kroz promenu intenziteta fluorescence po formuli: promena intenziteta fluorescence = intenzitet fluorescence na 4 dpi/intenzitet fluorescence na 1 dpi.

#### **3.2.4. Statistička analiza podataka**

Eksperimentalni rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su statistički obrađeni korišćenjem softvera *Graphpad Prism* (verzija 9.0, SAD). Normalnost distribucije podataka analizirana je *Shapiro-Wilk* testom. Podaci koji su pokazali normalnu raspodelu, analizirani su parametarskim *ANOVA* testom, praćen *Tukey post-hoc* testom višestrukog poređenja. Za podatke koji nisu pokazali normalnu raspodelu korišćen je neparametarski *Kruskal-Wallis* test, praćen *Dunn's pos-hoc* testom višestrukog poređenja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% interval poverenja (eng. *Confidence Interval*, CI) za podatke sa normalnom raspodelom, odnosno medijana  $\pm$  95% interval poverenja za podatke koji nisu imali normalnu raspodelu.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati analize 3' kraja gena za protrombin kod obolelih od kolorektalnog karcinoma

Prvi deo ove studije obuhvatio je analizu 3' kraja gena za protrombin kod obolelih od sporadičnog adenokarcinoma debelog creva, u uzorcima tumorskog tkiva (TT) i neizmenjenog okolnog tkiva (NOT). Analiza je izvršena na uzorcima 93 bolesnika (54 muškaraca i 39 žena), prosečne starosti 66 godina (opseg = 34-90 godina). Dostupni kliničko-patološki podaci bolesnika obuhvatili su pol, godine, stupanj tumora po Dukes-u, veličinu i gradus tumora (178). Navedeni podaci su prikazani u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Kliničko-patološke karakteristike bolesnika sa sporadičnim adenokarcinomom debelog creva.

		Broj slučajeva	% slučajeva
Ukupan broj		93	100,0
Pol	Muški	54	58,1
	Ženski	39	41,9
Stupanj po Dukes-u	A	18	19,4
	B	26	28
	C	43	46,2
	D	6	6,5
Veličina tumora†	≤ 5cm	49	59,8
	> 5cm	33	40,2
Gradus (diferenciranost) ‡	Visok	7	10,1
	Srednji	43	62,3
	Nizak	19	27,5

†podaci dostupni za 82 bolesnika;

‡podaci dostupni za 69 bolesnika.

Izolovana DNK iz oba tipa tkiva korišćena je u lančanoj reakciji polimeraze kao matrica za sintezu fragmenata dužine 715 bp, koji sadrže 3' kraj gena za protrombin. Dobijeni fragmenti su zatim sekvencirani metodom sekvenciranja po Sangeru. U oba tipa tkiva detektovane su tri varijante: FII A19911G (FII c.\*1726-59A>G), FII G20210A (FII c.\*97G>A) i FII c.1824C>T (178). Analizirane su učestalosti alela i genotipova. Učestalost alela FII 19911G je bila 46,77% u TT, odnosno 47,85% u NOT. Učestalost alela FII 20210A je bila 2,15% u TT, odnosno 1,61% u NOT. Učestalost alela FII c.1824T je bila 0,54% u oba tipa tkiva. Što se tiče varijante FII A19911G, učestalost heterozigotnog genotipa (FII 19911AG) u TT je bila 41,9%, a u NOT 47,85%, dok je učestalost homozigotnog genotipa (FII 19911GG) bila 25,8% u TT, odnosno 24,7% u NOT. U slučaju varijante FII G20210A, heterozigotni genotip (FII

20210GA) je bio prisutan sa učestalošću 2,2% u TT i 3,2% u NOT, dok je učestalost homozigotnog genotipa (FII 20210AA) u TT bila 1,1%, a u NOT nije detektovano. Različite kombinacije genotipova detektovanih kod bolesnika prikazane su u **Tabeli 8**.

**Tabela 8.** Kombinacije genotipova detektovane kod bolesnika sa adenokarcinomom debelog creva

Genske varijante u 3' kraju gena za FII			Broj bolesnika
FII A19911G	FII G20210A	FII c.1824C>T	N (%)
AG	GG	CC	40 (43,0)†
GG	GG	CC	23 (24,7)
AA	GA	CC	1 (1,1)
AG	GA	CC	2 (2,2)‡
AG	GG	CT	1 (1,1)
AA	GG	CC	26 (28,0)

†tri bolesnika su imala različit genotip u TT u poređenju sa NOT;  
‡jedan bolesnik je imao različit genotip u TT u poređenju sa NOT.

Kod četiri bolesnika uočene su razlike u genotipu između TT i NOT (178). Tri bolesnika su nosila različite genotipove za varijantu FII A19911G - dva bolesnika u TT nisu bili nosioci varijante, dok su u NOT bili heterozigonti nosioci, a jedan bolesnik je bio homozigotni nosilac varijante u TT, a heterozigotni u NOT. Četvrti bolesnik je bio nosilac različitih varijanti i za FII A19911G - nenosilac u TT i heterozigot u NOT, i za FII G20210A - homozigotni nosilac u TT, tj. heterozigotni u NOT. Zabeleženi genotipovi i klinički podaci opisanih bolesnika prikazani su u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Kliničko-patološki podaci za bolesnike sa adenokarcinomom debelog creva koji nose različite genotipove u tumorskom tkivu u poređenju sa neizmenjenom okolnim tkivom.

Bolesnik br.	Genske varijante u 3' kraju gena za protrombin				Karakteristike tumora				
	FII A19911G		FII G20210A		Starost	Pol	Stadijum po Dukes-u	Gradus	Veličina tumora (cm)
	TT	NOT	TT	NOT					
1	AA	AG	GG	GG	75	M	C	3	4
2	AA	AG	GG	GG	68	Ž	C	2	4
3	GG	AG	GG	GG	71	M	A	2	4
4	AA	AG	AA	GA	76	M	C	/	5

Sva četiri bolesnika nisu nosila varijantu FII c.1824C>T. M: Muški; Ž: ženski;

Kako je bolesnik 4 iz **Tabele 9.** nosilac različitih genotipova u varijantama FII A19911G i FII G20210A, tačnije heterozigotni nosilac u NOT za obe varijante, analiziran je haplotip uzorka NOT navedenog bolesnika (178). Region DNK od interesa datog uzorka je umnožen lančanom reakcijom polimeraze i ukloniran u plazmidni vektor, kako bi se analizirale zasebne sekvence koje potiču sa različitih hromozoma. Nakon toga, dobijeni klonovi su sekvencirani. U 16 analiziranih klonova detektovano je prisustvo četiri različita haplotipa: **19911A-20210G** (6 klonova), **19911A-20210A** (5 klonova), **19911G-20210G** (4 klona), **19911G-20210A** (1 klon).

#### 4.2. Rezultati analize ekspresije ciljnih gena iz javno dostupnih baza

Korišćenjem podataka iz javno dostupnih baza, analizirana je ekspresija gena za protrombin, PAR receptore i fibrinogen u tkivu obolelih od KRK. Korišćena su dva tipa dostupnih podataka – RNAseq podaci za TT i NOT (172), i podaci prostorne transkriptomike za TT (173).

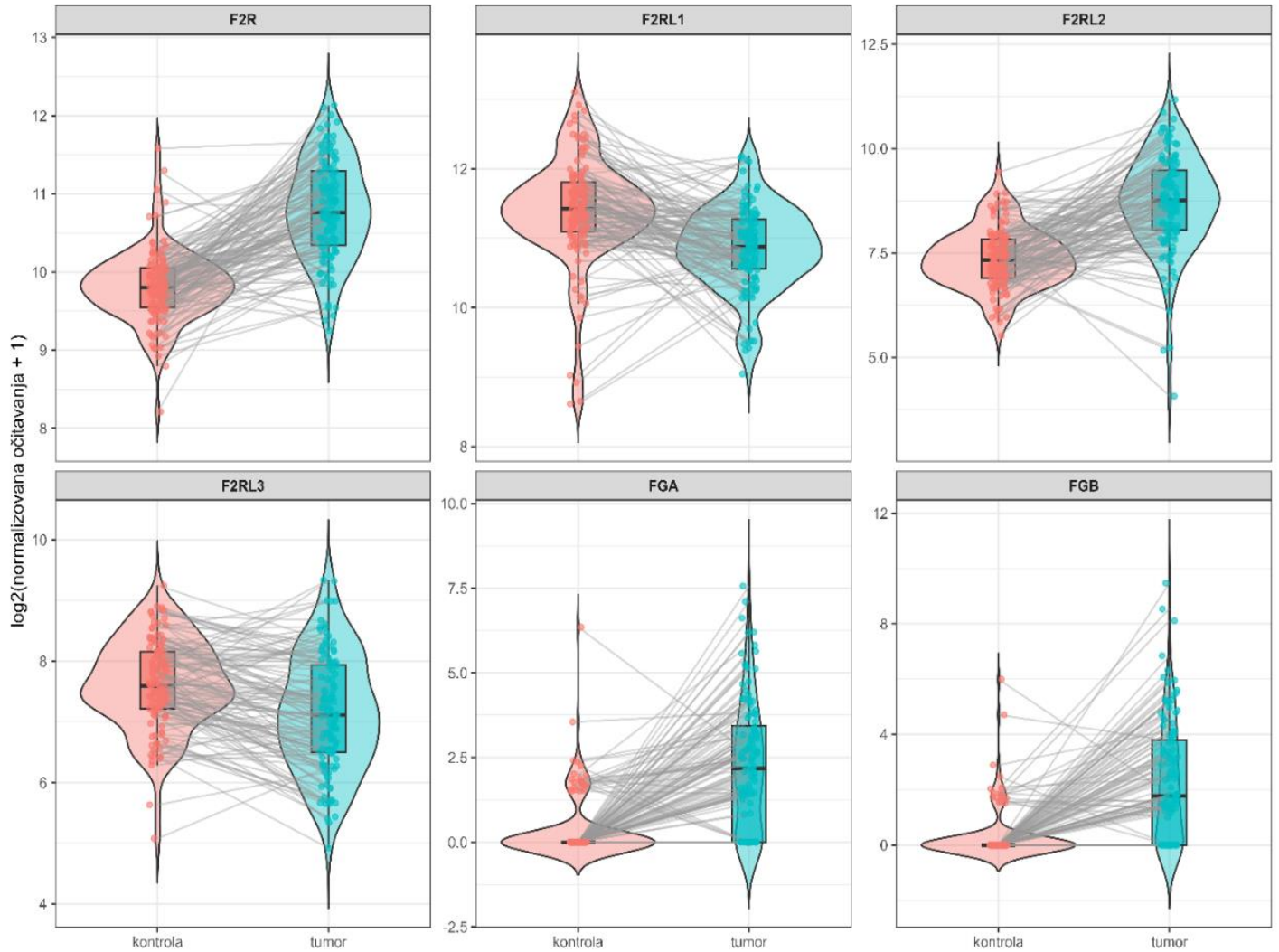
Diferencijalna ekspresija gena između TT i NOT urađena je na parovima uzoraka 120 bolesnika. Rezultati analize diferencijalne ekspresije ispitivanih gena prikazani su u **Tabeli 10.**

**Tabela 10.** Podaci analize diferencijalne ekspresije gena u tumorskom tkivu KRK u odnosu na neizmenjeno okolno tkivo.

<b>Gen</b>	<b>log2FC</b>	<b>FDR</b>
<i>F2</i>	0.51	6.79E-02
<i>F2R</i>	0.99	6.36E-48
<i>F2RL1</i>	-0.54	1.64E-10
<i>F2RL2</i>	1.39	3.15E-33
<i>F2RL3</i>	-0.49	1.15E-10
<i>FGA</i>	3.09	2.08E-12
<i>FGB</i>	2.96	2.53E-06
<i>FGG</i>	0.27	9.32E-01

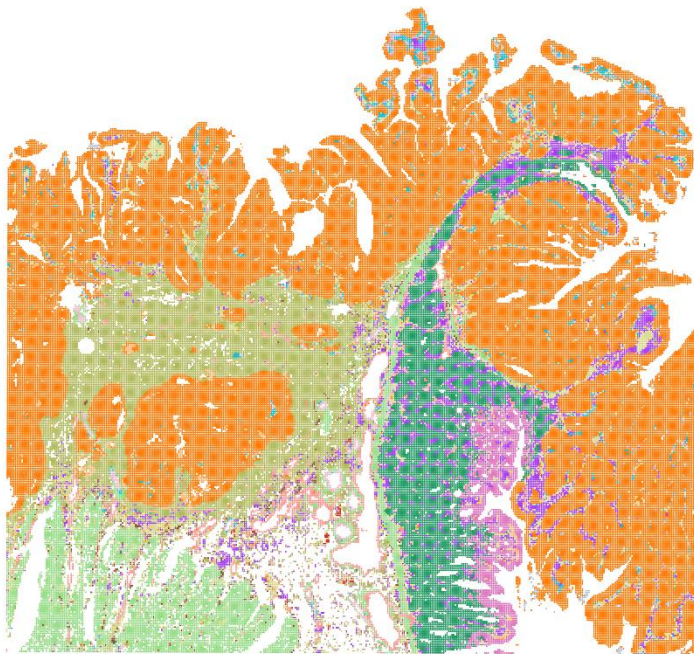
log2FC – logaritamski prikaz promene  
u ekspresiji

Analizom diferencijalne ekspresije gena od interesa, pokazano je da do značajne promene u nivou ekspresije (FDR<0,001) u tumorskom tkivu dolazi kod svih gena izuzev gena za protrombin i gama lanac fibrinogena, za koje detektovane promene u ekspresiji nisu dostigle statističku značajnost. Statistički značajno povećanje nivoa ekspresije detektovano je kod gena za PAR-1 i PAR-3, kao i kod gena za alfa i beta lance fibrinogena, dok je u slučaju gena za PAR-2 i PAR-4 ekspresija gena statistički značajno smanjena u TT u odnosu na NOT. Grafički prikaz značajno izmenjenih nivoa ekspresija gena dat je na **Slici 8**.

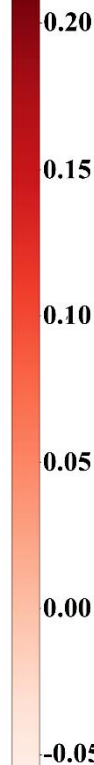
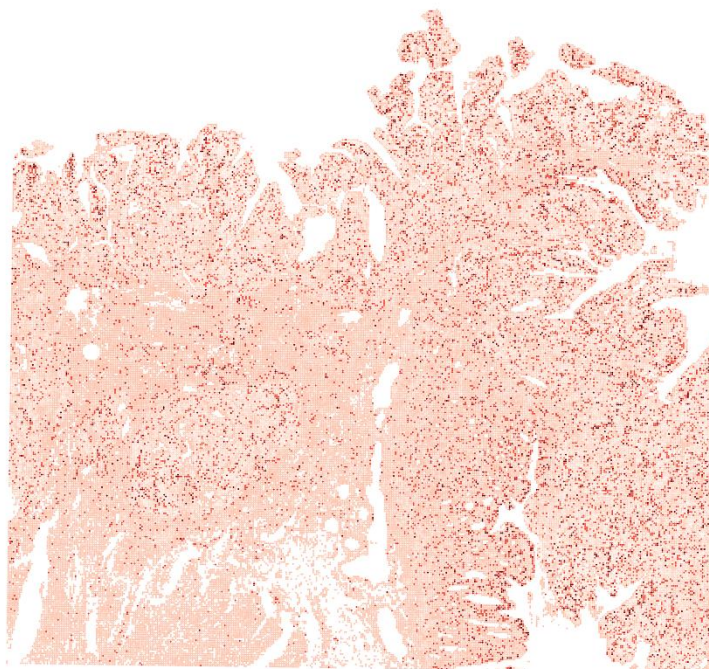


**Slika 8.** Normalizovani rezultati diferencijalno eksprimiranih gena između tumorskog tkiva (tumor - plavo) i neizmenjenog okolnog tkiva (kontrola - crveno). Linije povezuju uzorke poreklom od istog bolesnika.

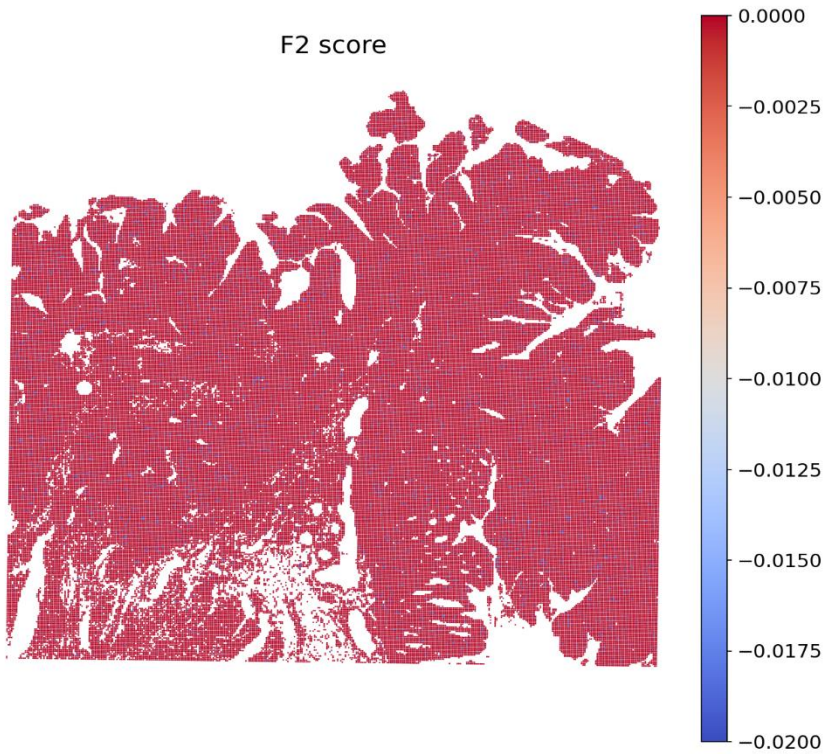
Rezultati analize podataka dobijenih prostornom transkriptomikom na uzorku tumorskog tkiva KRK prikazana je na **Slici 9**. Automatskom anotacijom ćelijskih tipova na model humanog kolorektalnog karcinoma (173) je dobijeno 17 tipova ćelija (**Slika 9, A**). Indeks genske ekspresije odabranih gena (**Tabela 3**) je mapiran na sliku preseka tkiva (**Slika 9, B**), i po rasporedu crvenih tačaka najviše se poklapa sa regionom mapiranim na CMS2 i CMS3 tip. Dodatno, analiziran je i indeks ekspresije svakog ciljnog gena pojedinačno, i prikazana njegova zastupljenost na preseku zasebno (**Slika 10.-17.**). U slučaju gena za protrombin i fibrinogen, razlika u nivou ekspresije se ne mapira ni na jedan region posebno, odnosno podaci pokazuju ravnomeran raspored u analiziranom tkivu. Međutim, razlike se uočavaju kod PAR receptora.

**A**

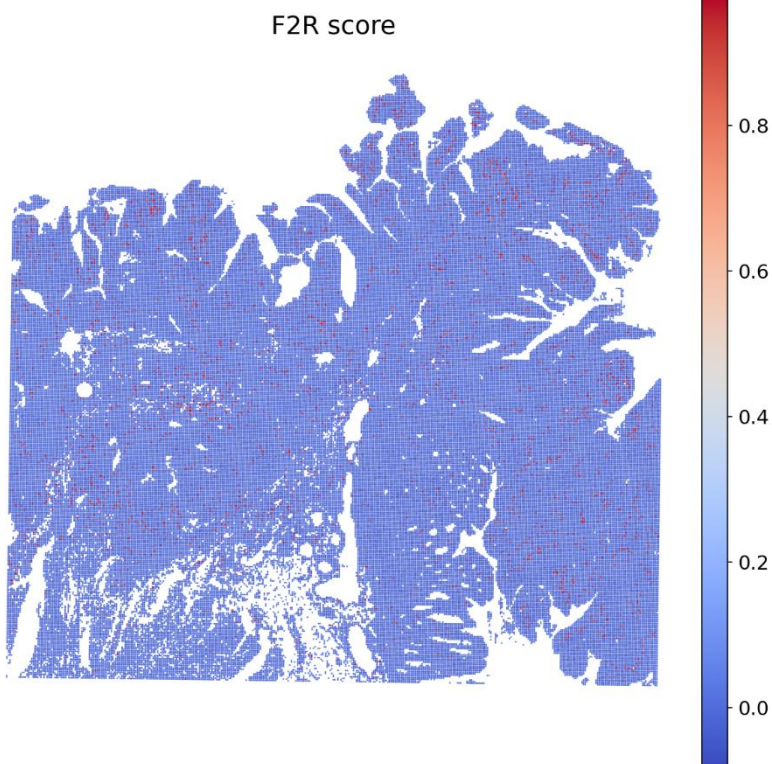
- CD4+ T ćelije
- CMS2
- CMS3
- EGĆ
- IgG+ plazma ćelije
- LEĆ
- ZE2
- Miofibroblasti
- Periciti
- Proinflamatorne ćelije
- SPP1+
- Glatke mišićne ćelije
- “Stalk” EĆ
- Ćelije strome 2
- Ćelije strome 3
- “Tip” EĆ
- Nepoznato

**B**

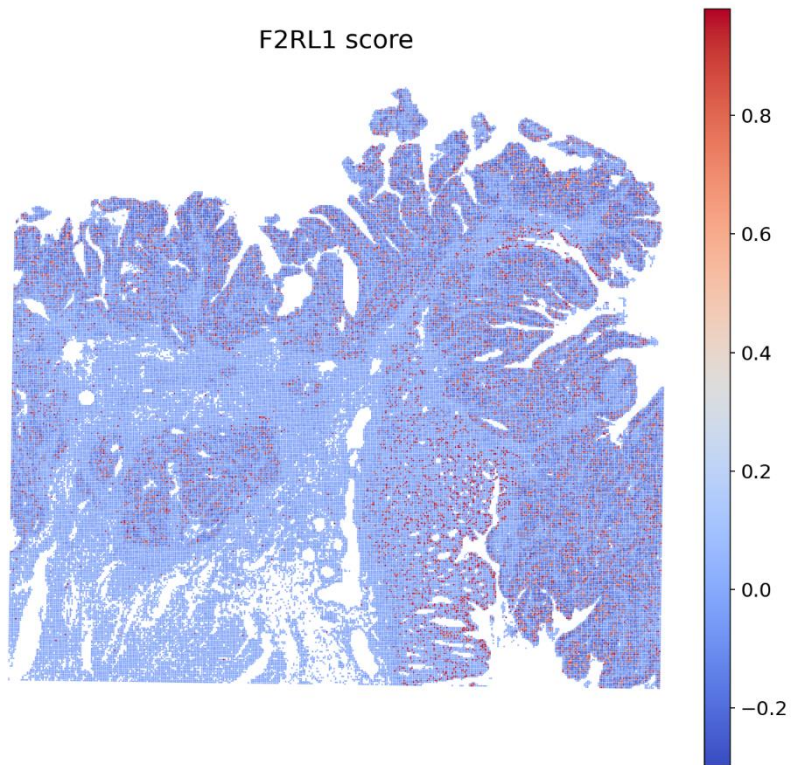
**Slika 9.** Prostorna transkriptomika tkiva KRK. **A** – Ćelijski tipovi prisutni u analiziranom uzorku tumora (173). EGĆ – enterične glijalne ćelije, LEĆ – limfatične endotelne ćelije, ZE2 – zreli enterociti tip 2, SPP1+ - SPP1/osteopontin eksprimirajući makrofagi, EĆ – endotelne ćelije. **B** – Prikaz zbirne ekspresije ispitivanih gena u analiziranom uzorku tumora.



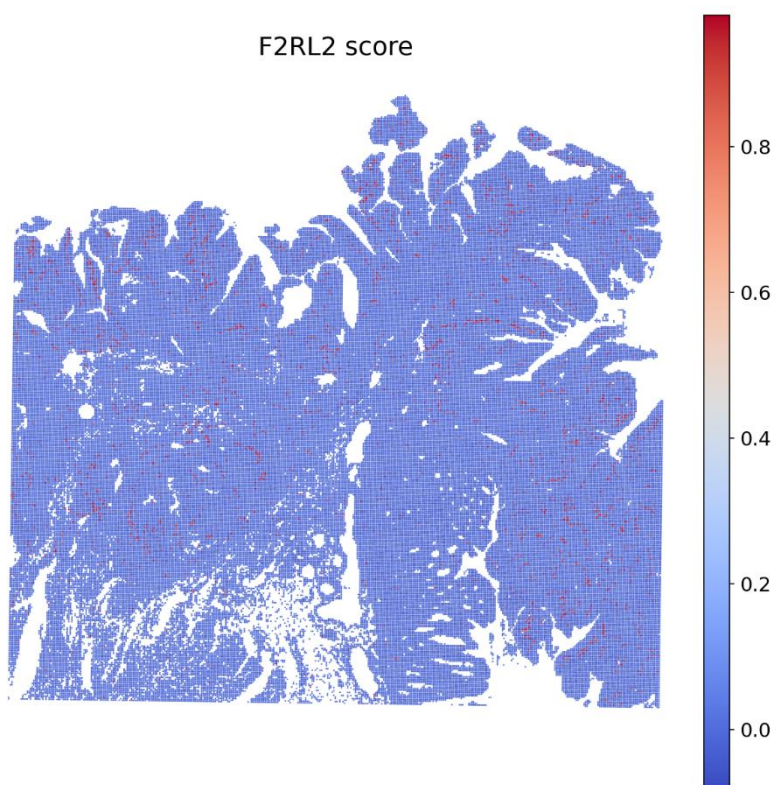
**Slika 10.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija gena za protrombin (*F2*) u analiziranom uzorku tumora.



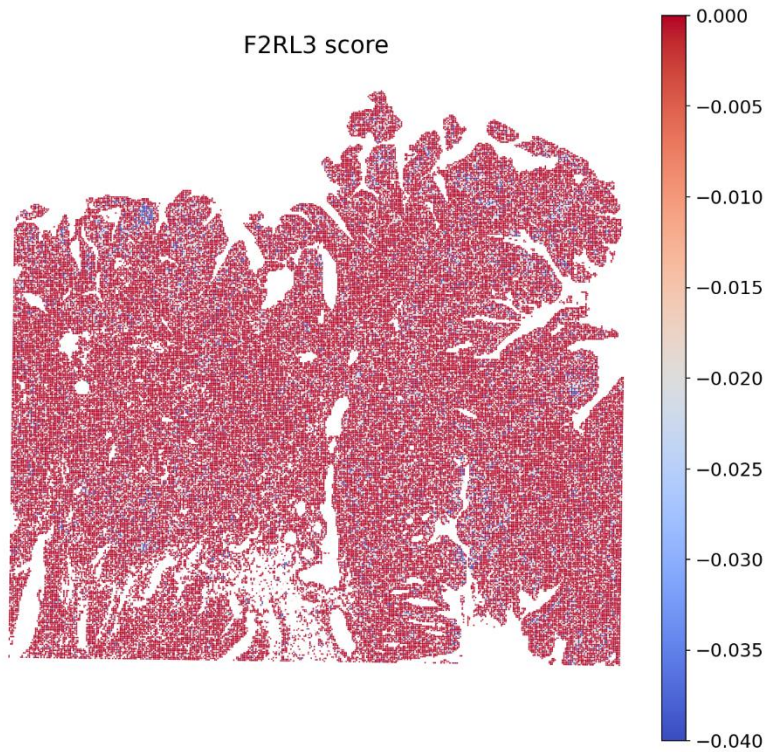
**Slika 11.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija gena za PAR-1 (*F2R*) u analiziranom uzorku tumora.



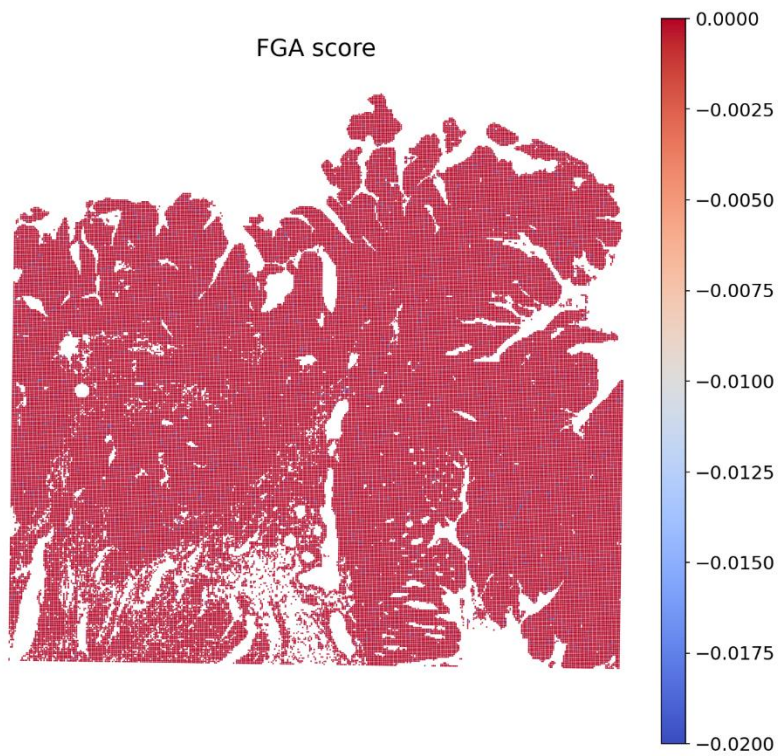
**Slika 12.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija gena za PAR-2 (*F2RL1*) u analiziranom uzorku tumora.



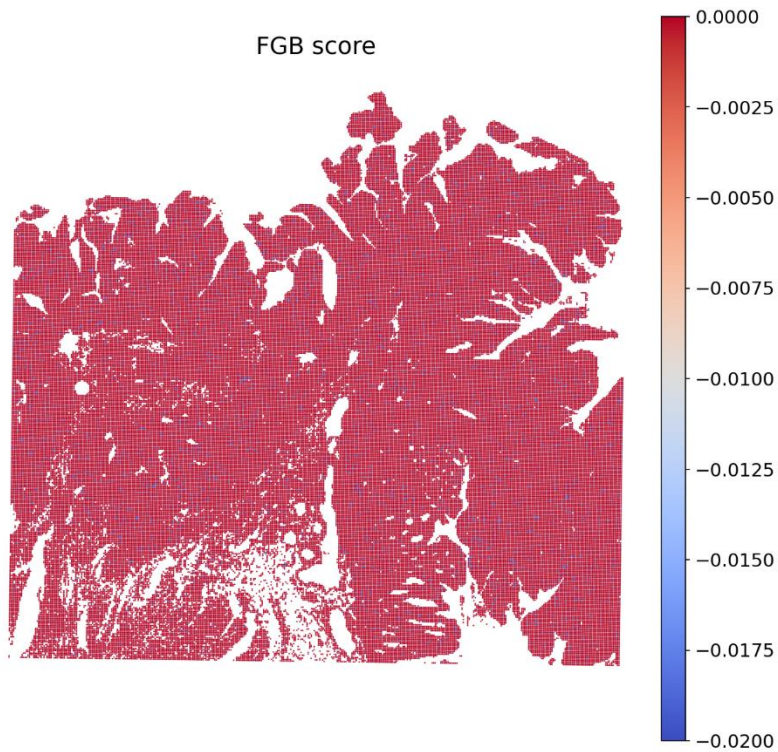
**Slika 13.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija gena za PAR-3 (*F2RL2*) u analiziranom uzorku tumora.



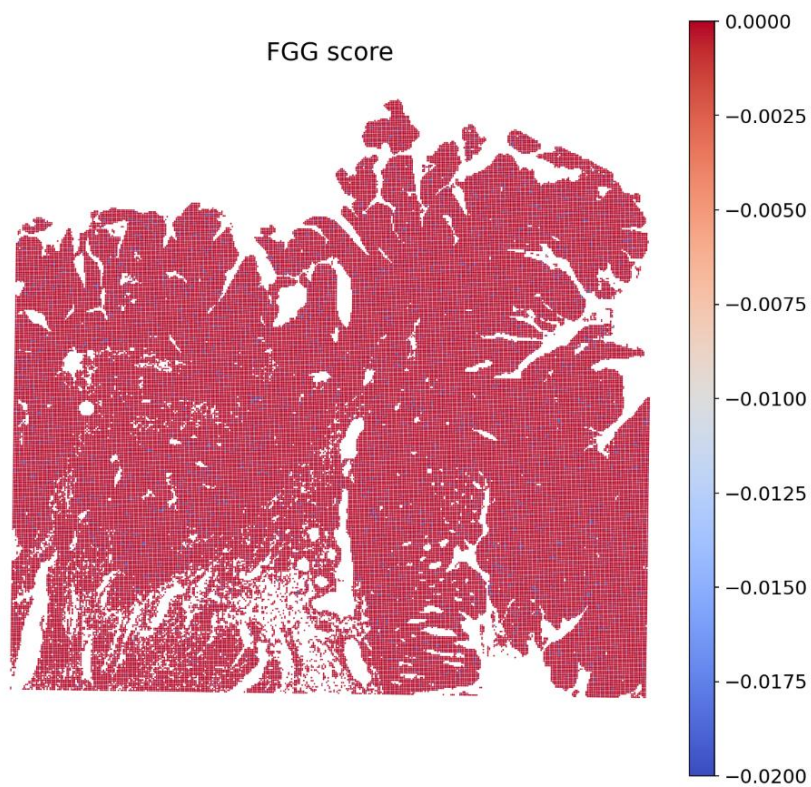
**Slika 14.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija gena za PAR-4 (*F2RL3*) u analiziranom uzorku tumora.



**Slika 15.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija gena za  $\alpha$  subjedinicu fibrinogena (*FGA*) u analiziranom uzorku tumora.



**Slika 16.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija  $\beta$  subjedinicu fibrinogena (*FGB*) u analiziranom uzorku tumora.



**Slika 17.** Pojedinačno prikazana prostorna ekspresija  $\gamma$  subjedinicu fibrinogena (*FGG*) u analiziranom uzorku tumora.

### 4.3. Rezultati analize ekspresije protrombina i PAR1 *in vitro*

Ekspresija protrombina u ćelijama KRK praćena je na nivou iRNK i proteina. Kako je protrombin sekretorni protein, prisustvo proteina praćeno je i u ćelijskom lizatu i u medijumu u kome su ćelije gajene.

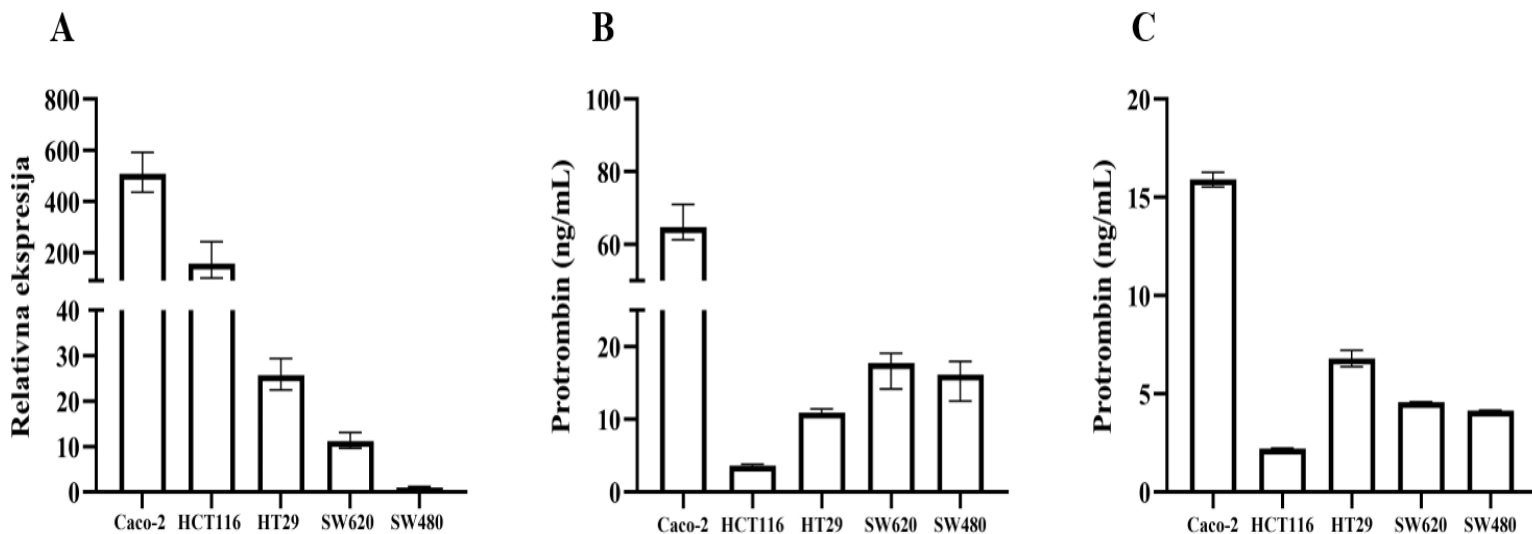
Izolovana iRNK korišćena je kao matrica za sintezu cDNK, koja je potom analizirana PCR-om u realnom vremenu, metodom relativne kvantifikacije (engl. *Relative Quantification*, RQ), a koncentracija protrombina u lizatima i medijumima ćelija određivana je pomoću ELISA eseja. Podaci o relativnom nivou ekspresije protrombina prikazani su u **Tabeli 11.** i na **Slici 18 (A).** Detektovane količine protrombina u lizatima i medijumima ćelija prikazane su na **Slici 18 (B, C).** Dobijeni rezultati potvrđuju da sve ispitivane ćelijske linije ekspimiraju gen za protrombin, kao i da sintetišu i sekreću u spoljnu sredinu protein, pri čemu je nivo ekspresije najviši kod linije Caco-2 (179).

Kao pozitivna kontrola za ekspresiju protrombina korišćena je linija HepG2, kod koje je na nivou iRNK pokazana vrednost relativne kvantifikacije RQ 6614,73 (RQ min 4807,66, RQ max 9101,02), a na nivou proteina 414,6 ng/mL (95% CI 374,9-454,3) u lizatu i 101,9 ng/mL (95% CI 95,6-108,1) u medijumu.

**Tabela 11.** Vrednosti analize relativnog nivoa ekspresije iRNK za protrombin u analiziranim ćelijama KRK.

	KRK ćelijske linije				
	Caco-2	HCT116	HT29	SW620	SW480*
<b>Avg Ct</b>	23, 53	33, 94	28, 03	27, 88	31, 79
<b>Avg dCt</b>	4, 78	6, 47	9, 08	10, 28	13, 77
<b>RQ</b>	<b>508, 16</b>	<b>156, 77</b>	<b>25, 69</b>	<b>11, 21</b>	<b>1, 00</b>
<b>RQ min</b>	435, 95	101, 42	22, 47	9, 59	0, 84
<b>RQ max</b>	592, 32	242, 34	29, 36	13, 10	1, 20

\*Kalibrator; Avg – Prosečno; Ct – prag detekcije; RQ – vrednosti relativne kvantifikacije



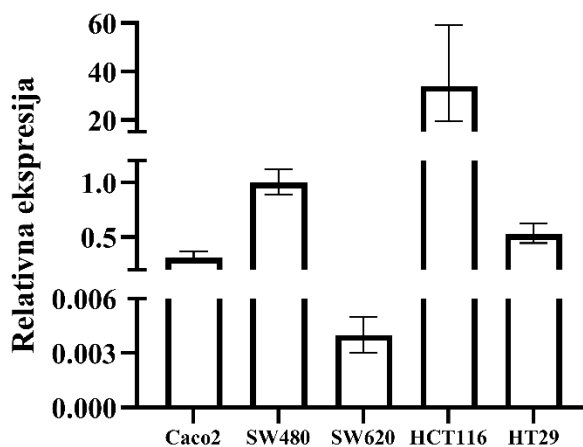
**Slika 18.** Analiza ekspresije protrombina u različitim ćelijskim linijama KRK. **A** – Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije iRNK za protrombin. SW480 linija, sa najnižim nivoom ekspresije, je iskorišćena kao kalibrator. Rezultati su prikazani kao RQ sa 95% CI. **B** – Koncentracija protrombina u ćelijskom lizatu. **C** –Koncentracija protrombina u ćelijskom medijumu. Rezultati ELISA eseja su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI.

Dobijene vrednosti relativnog nivoa ekspresije PAR-1 na RNK nivou prikazane su u **Tabeli 12.** i **Slici 19.** Ekspresija gena za PAR-1 receptor je detektovana kod svih ćelijskih linija, sa višestruko većim nivoom ekspresije kod HCT116 u odnosu na ostale linije.

**Tabela 12.** Vrednosti analize relativnog nivoa ekspresije iRNK za PAR-1 u analiziranim ćelijama KRK.

	KRK ćelijske linije				
	Caco-2	HCT116	HT29	SW620	SW480*
<b>Avg Ct</b>	23, 53	22, 83	21, 84	28, 04	20, 71
<b>Avg dCt</b>	5, 03	-1, 74	4, 27	11, 28	3, 35
<b>RQ</b>	<b>0, 31</b>	<b>34, 00</b>	<b>0, 53</b>	<b>0, 004</b>	<b>1, 00</b>
<b>RQ min</b>	0, 26	19, 49	0, 45	0, 003	0, 89
<b>RQ max</b>	0, 37	59, 30	0, 62	0, 005	1, 13

\*Kalibrator; Avg – Prosečno; Ct – prag detekcije; RQ – vrednosti relativne kvantifikacije

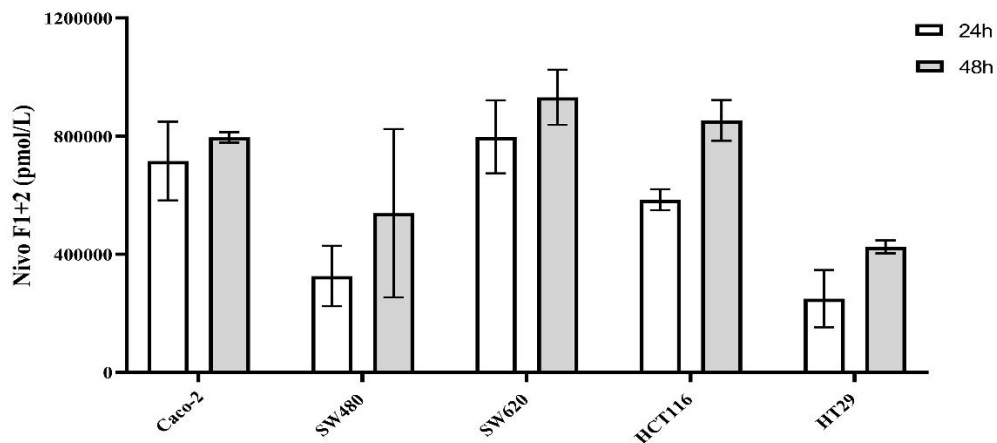


**Slika 19.** Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije iRNK za PAR-1. Kao kalibrator iskorišćena je ćelijska linija SW480. Rezultati su prikazani kao RQ sa 95% CI.

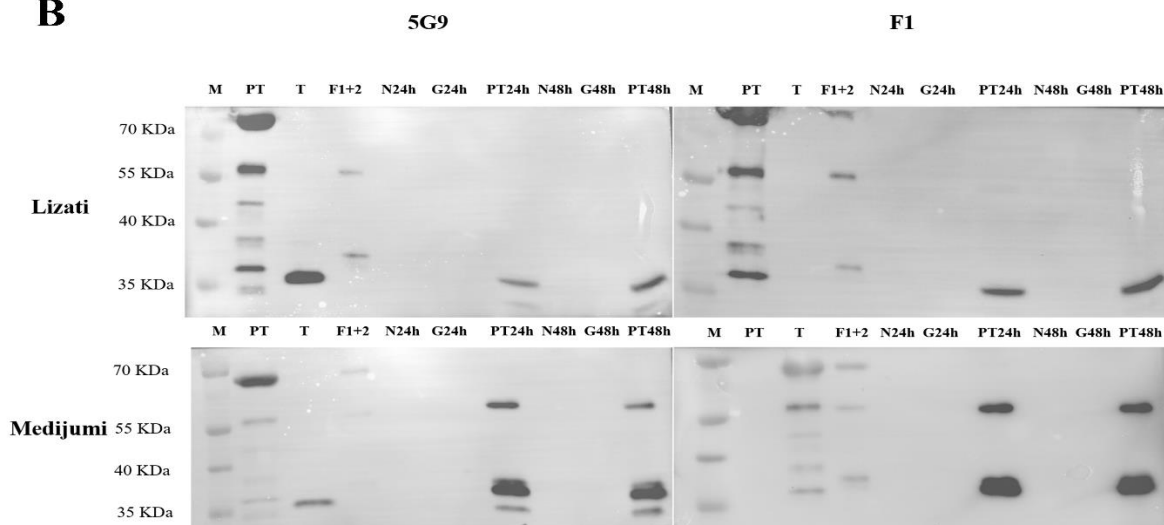
#### 4.4. Rezultati ispitivanja aktivacije protrombina u trombin

Kako bi se utvrdilo da li ćelije poreklom od KRK mogu aktivirati protrombin u trombin u svom neposrednom okruženju, ćelije su tretirane fiziološkom koncentracijom protrombina 24h i 48h, nakon čega su medijumi pokupljeni i ispitano je prisustvo produkta aktivacije - fragmenta F1+2. Izmerene vrednosti nivoa fragmenta F1+2 u medijumu ćelija tretiranih protrombinom prikazane su na **Slici 20-A**. U uzorcima Caco-2 ćelijske linije, aktivacija je ispitana i metodama WB (**Slika 20-B**) i esejom aktivacije fluorescentnog supstrata trombina (**Slika 21**).

**A**



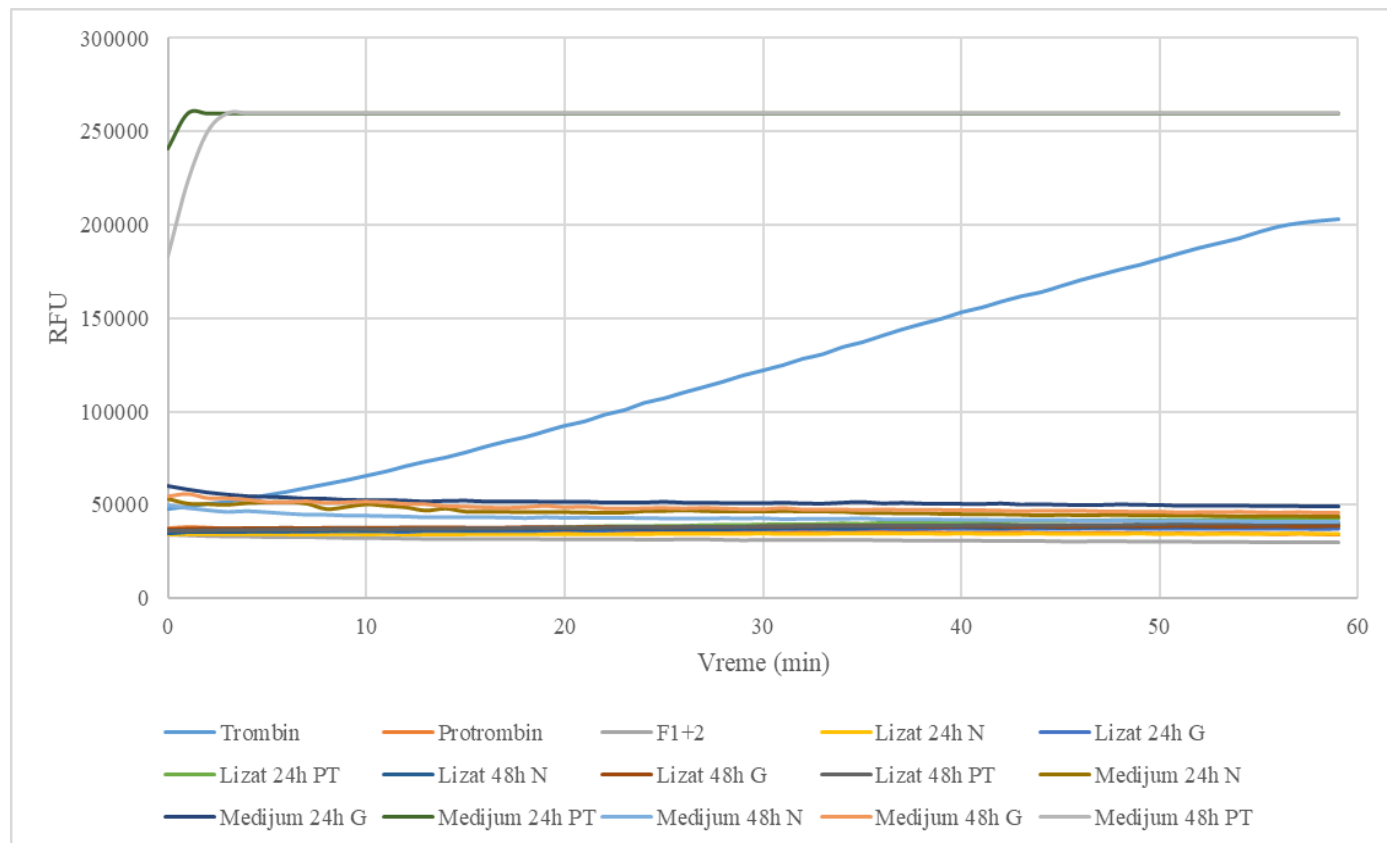
**B**



**Slika 20. Analiza aktivacije protrombina od strane ćelija KRK. A** - Koncentracija fragmenta F1+2 u medijumu ćelija tretiranih protrombinom., određena ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. **B** – Analiza uzoraka lizata i medijuma Caco-2 ćelija WB metodom, korišćenjem dva primarna antitela (5G9 i F1). M – marker, PT – komercijalni protrombin, T- komercijalni trombin, F1+2 – komercijalni F1+2, N – uzorci netretiranih ćelija, G – uzorci ćelija tretiranih glicerolom, PT – uzorci ćelija tretiranih protrombinom.

Analizom rezultata ELISA esej za fragment F1+2 uočava se razlika između ćelijskih linija, kao i da nivo i odnos nivoa fragmenta u medijumu KRK ćelija raste kroz vreme. WB metodom se u uzorcima medijuma, kao i u uzorku komercijalnog trombina, u visini markera od 35 kDa uočava signal koji bi odgovarao trombinu, na membranama koje su inkubirane sa 5G9 antitelom koje detektuje trombin. Na membrana inkubiranim sa F1 antitelom, koje detektuje protrombin, trake izostaju. Međutim, na obe membrane sa uzorcima medijuma se uočava izražen signal koji bi po svom položaju (između traka 35 i

40 kDa) mogao da odgovara formi pretrombina-2, kao i signal koji bi po svom položaju (iznad trake od 55 kDa) mogao da odgovara pretrombinu-1. U uzorcima lizata se na obe membrane uočava traka na istoj visini oko 35 kDa, ali kako F1 antitelo ne vezuje trombin (što je potvrđeno nedostatkom trake u uzorku komercijalnog trombina), i u uzorcima lizata je možda detektovan pretrombin-2.



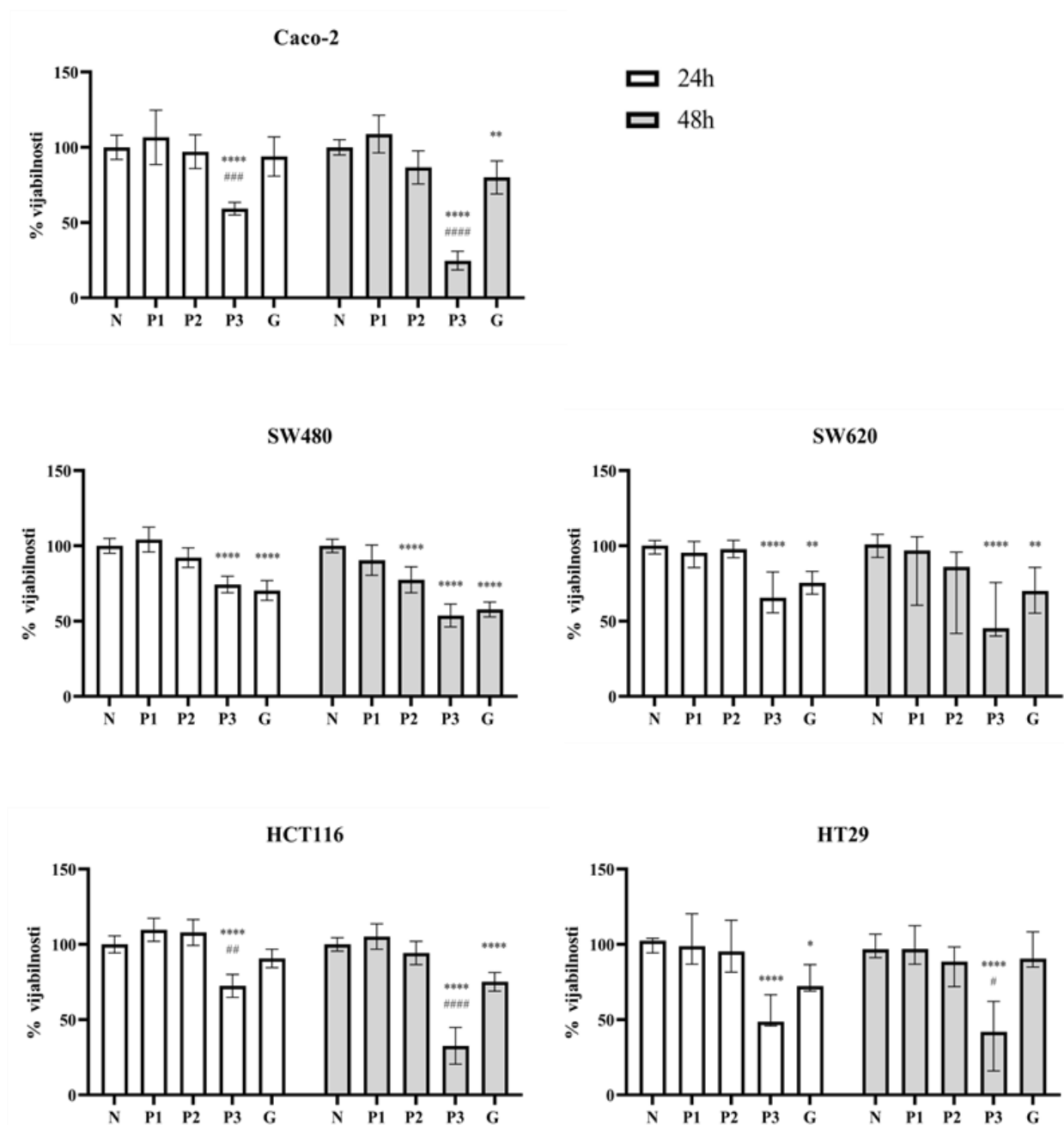
**Slika 21.** Određivanje aktivnosti trombina u medijumu i lizatu Caco-2 ćelija korišćenjem fluorescentnog supstrata. N – uzorci netretiranih ćelija, G – uzorci ćelija tretiranih glicerolom, PT – uzorci ćelija tretiranih protrombinom. RFU – relativna fluorescentna jedinica, eng. *Relative Fluorescent Unit*.

Rezultati eseja sa fluorescentnim supstratom pokazuju da je signal detektovan samo u uzorcima medijuma ćelija tretiranih protrombinom, dok u lizatima tretiranih ćelija signal izostaje.

#### 4.5. Rezultati ispitivanja efekata protrombina *in vitro*

##### 4.5.1. Rezultati uticaja protrombina na vijabilnost i proliferaciju ćelija KRK

Kako bi se ispitao efekat protrombina na vijabilnost ćelija KRK, i indirektno njihovu proliferaciju, upotrebljen je MTT test. Ćelije su izložene tretmanu protrombinom u koncentracijama 0,02 mg/mL, 0,1 mg/mL (fiziološka koncentracija iz plazme) i 0,5 mg/mL, tokom 24h i 48h. Kako je komercijalni protrombin rastvoren u 50% rastvoru glicerola, kao kontrola rastvarača korišćen je glicerol u koncentraciji koja odgovara 0,5 mg/mL protrombina. Efekat tretmana protrombinom, u različitim koncentracijama i različitim vremenskim intervalima, na vijabilnost ćelija prikazan je na **Slici 22**.



**Slika 22.** Efekat protrombina na vijabilnost i proliferaciju ćelija. Sve vrednosti tretmana su prikazane kao % u odnosu na kontrolu - netretirane ćelije (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI (Caco-2, SW480 i HCT116), odnosno kao medijana  $\pm$  95% CI (SW620 i HT29). N - netretirane ćelije, P1 - protrombin 0,02 mg/mL, P2 - protrombin 0,1 mg/mL, P3 - 0,5 mg/mL, G - 50% glicerol (kontrola nosača) koji odgovara P3. \* - poređenje sa netretiranim ćelijama, # - poređenje sa ćelijama tretiranim glicerolom. \*/#  $p < 0,05$ , \*\*/##  $p < 0,01$ , \*\*\*/###  $p < 0,001$ , \*\*\*\*/####  $p < 0,0001$ .

Analizom efekata tretmana protrombinom uočava se značajan inhibicioni efekat tretmana u koncentraciji 0,5 mg/mL u obe vremenske tačke (179). U slučaju za 24 h p vrednosti su: za Caco-2 u odnosu na netretirane  $p < 0,0001$  i u odnosu na tretman glicerolom  $p = 0,0001$ , kod HCT116 u odnosu na

netretirane  $p < 0,0001$  i u odnosu na tretman glicerolom  $p = 0,0044$ , kod HT29 u odnosu na netretirane  $p < 0,0001$ , dok u odnosu na tretman glicerolom nema statističke značajnosti i pored vidljivog trenda inhibicije. Kad je u pitanju 48 h tretmana, p vrednosti su: za Caco-2 i HCT116 je  $p < 0,0001$  i u odnosu na netretirane i u odnosu na tretman glicerolom, dok je kod HT29 u odnosu na netretirane  $p < 0,0001$  i  $p = 0,0115$  u odnosu na tretman glicerolom. Takođe, uočen je inhibitorski efekat glicerola kod Caco-2 na 48 h ( $p = 0,0042$  u odnosu na netretirane), HCT116 na 48h ( $p < 0,0001$  u odnosu na netretirane) i HT29 na 24 h ( $p = 0,0114$  u odnosu na netretirane).

Međutim, kod linija SW480 i SW620 inhibitorski efekat protrombina nije se statistički značajno razlikovao od inhibitorskog efekta samog glicerola, pri čemu su oba tretmana ostvarila značajan efekat u odnosu na netretirane ćelije, i na 24h i na 48h (kod SW480 sve vrednosti  $p < 0,0001$ , kod SW620 za protrombin je  $p < 0,0001$  u obe tačke, a za glicerol  $p = 0,0030$  i  $p = 0,0082$ ).

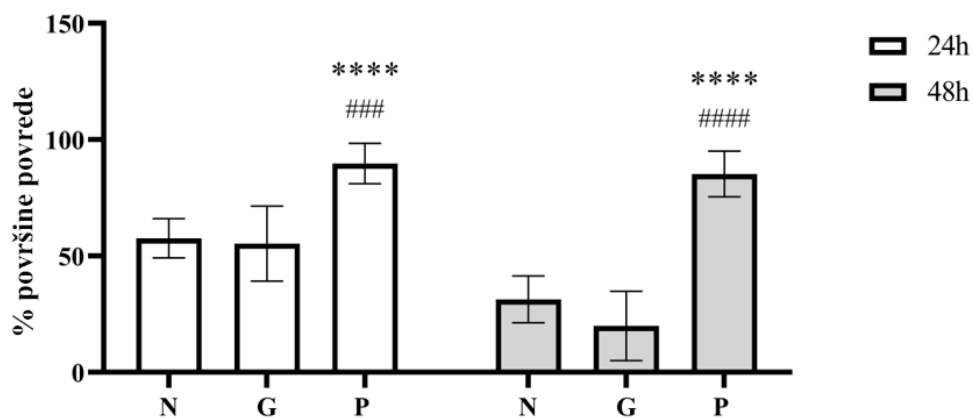
Tretman protrombinom u koncentracijama 0,02 mg/mL i 0,1 mg/mL nije ostvario statistički značajan efekat, s izuzetkom kod SW480, gde je uočena značajna inhibicija proliferacije u koncentraciji 0,1 mg/mL nakon 48 h tretmana ( $p < 0,0001$ ).

S obzirom na dobijene rezultate, koncentracija protrombina od 0,1 mg/mL, koja odgovara i koncentraciji u plazmi, odabrana je za dalje *in vitro* eksperimente.

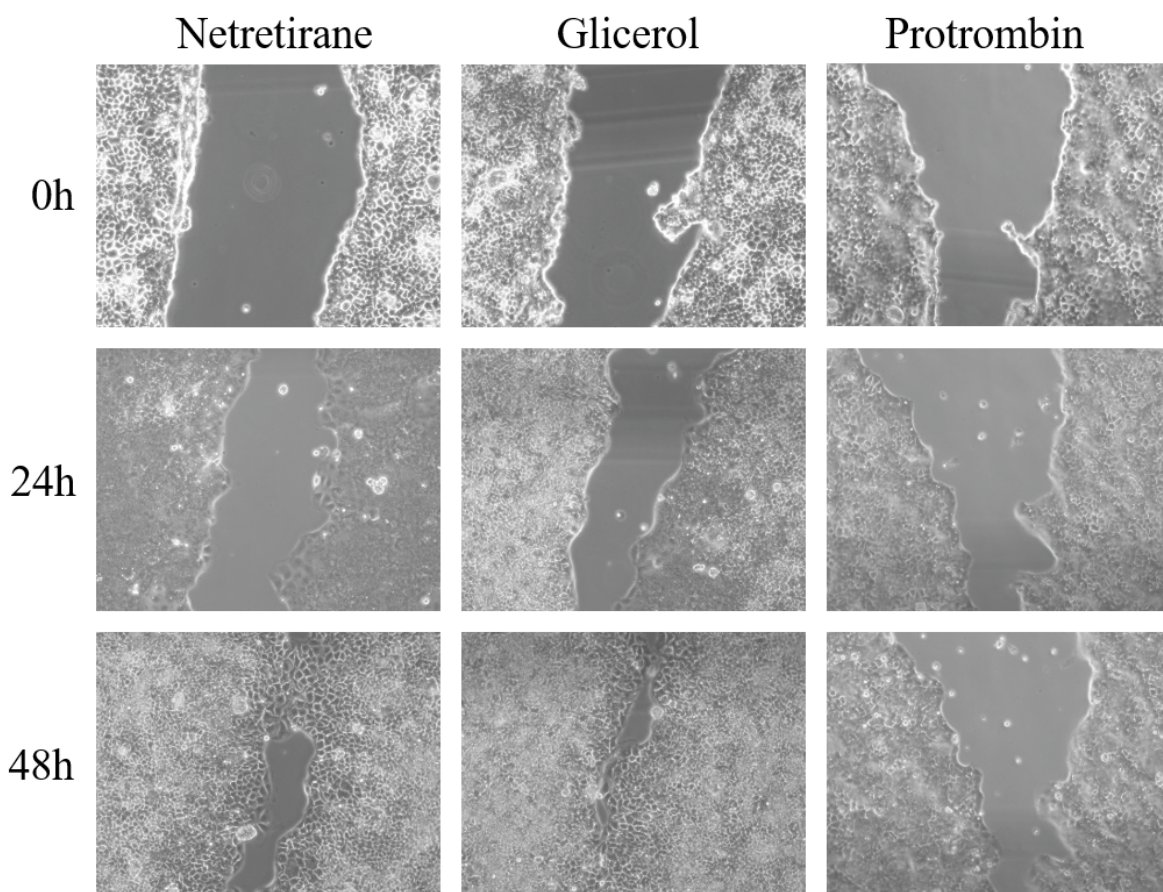
#### **4.5.2. Rezultati uticaja protrombina na migraciju ćelija KRK**

Efekat protrombina na migracioni potencijal ćelija ispitan je esejom zarastanja povrede. Rezultati zatvaranja površine povrede nakon 24 h i 48 h tretmana protrombinom u koncentraciji 0,1 mg/ml prikazani su na **Slikama 23-27**. Kod Caco-2 ćelijske linije se u obe vremenske tačke uočava statistički značajna inhibicija migracije kod ćelija tretiranih protrombinom u poređenju sa netretiranim ( $p < 0,0001$  za obe tačke) i ćelijama tretiranim glicerolom ( $p = 0,0001$  za 24h,  $p < 0,0001$  za 48h). Kod ostalih ćelijskih linija ovaj efekat nije uočen (179).

**A**

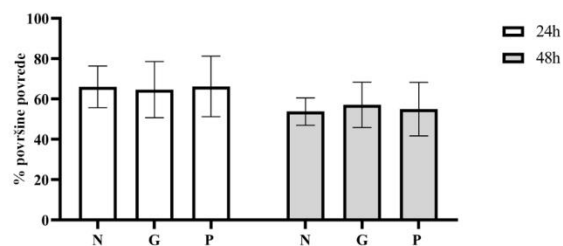


**B**

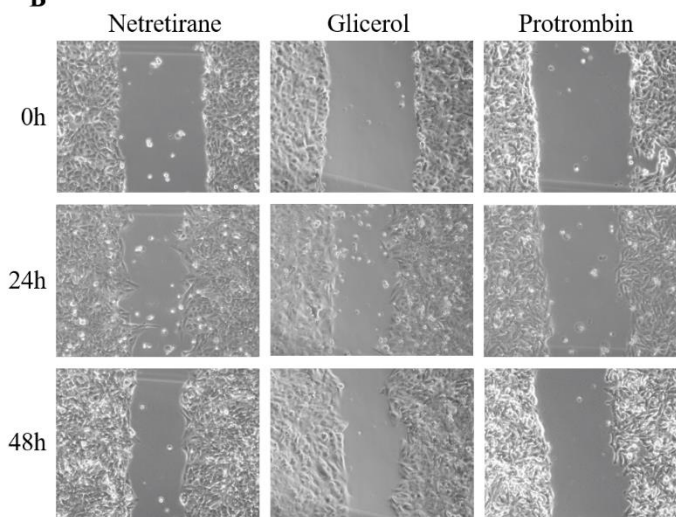


**Slika 23.** Efekat protrombina na migracioni potencijal Caco-2 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, P - protrombin 0,1 mg/mL, G - 50% glicerol. \* - poređenje sa netretiranim ćelijama, # - poređenje sa ćelijama tretiranim glicerolom. \*/#  $p < 0,05$ , \*\*/###  $p < 0,01$ , \*\*\*/####  $p < 0,001$ , \*\*\*\*/#####  $p < 0,0001$ . B - Reprezentativne fotografije povrede.

**A**

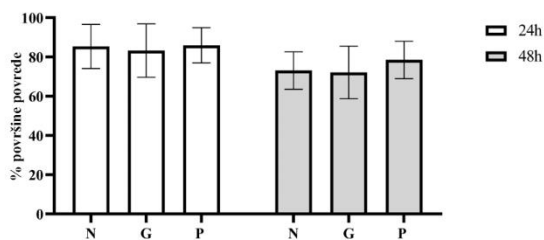


**B**

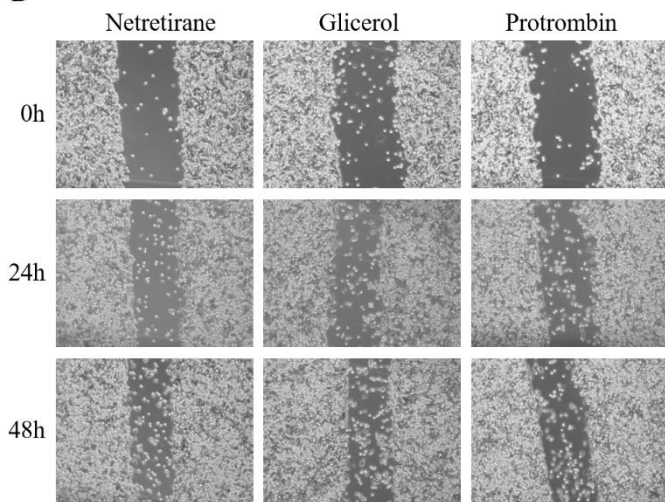


**Slika 24.** Efekat protrombina na migratorni potencijal SW480 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, P - protrombin 0,1 mg/mL, G - 50% glicerol koji odgovara P. B - Reprezentativne fotografije povrede.

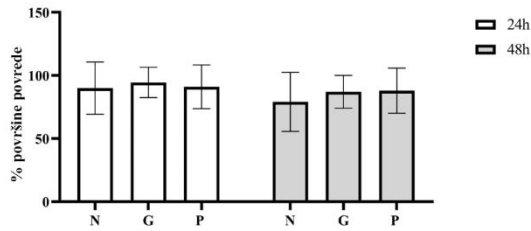
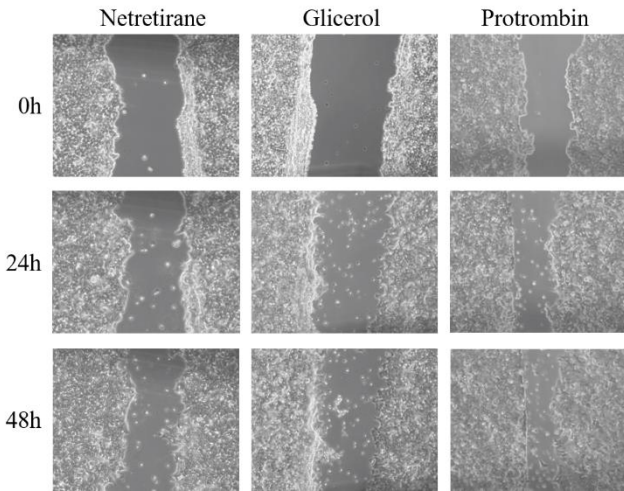
**A**



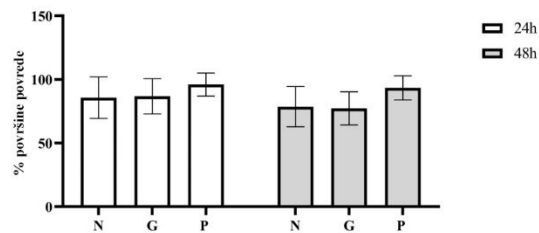
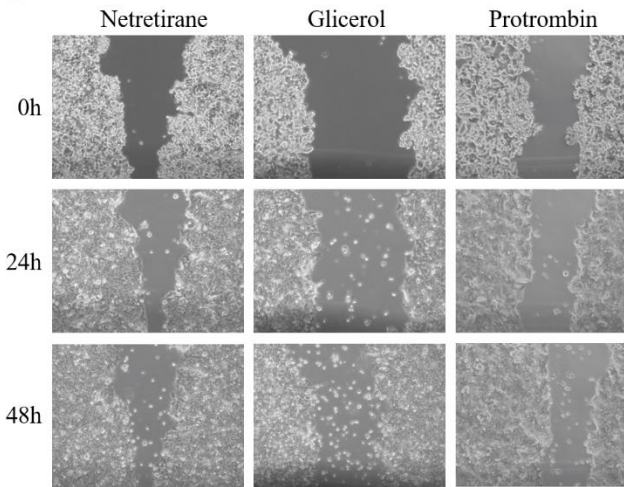
**B**



**Slika 25.** Efekat protrombina na migratorni potencijal SW620 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, protrombin 0,1 mg/mL, G - 50% glicerol koji odgovara P. B - Reprezentativne fotografije povrede.

**A****B**

**Slika 26.** Efekat protrombina na migratorni potencijal HCT116 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, protrombin 0,1 mg/mL, G - 50% glicerol koji odgovara P. B - Reprerzentativne fotografije povrede.

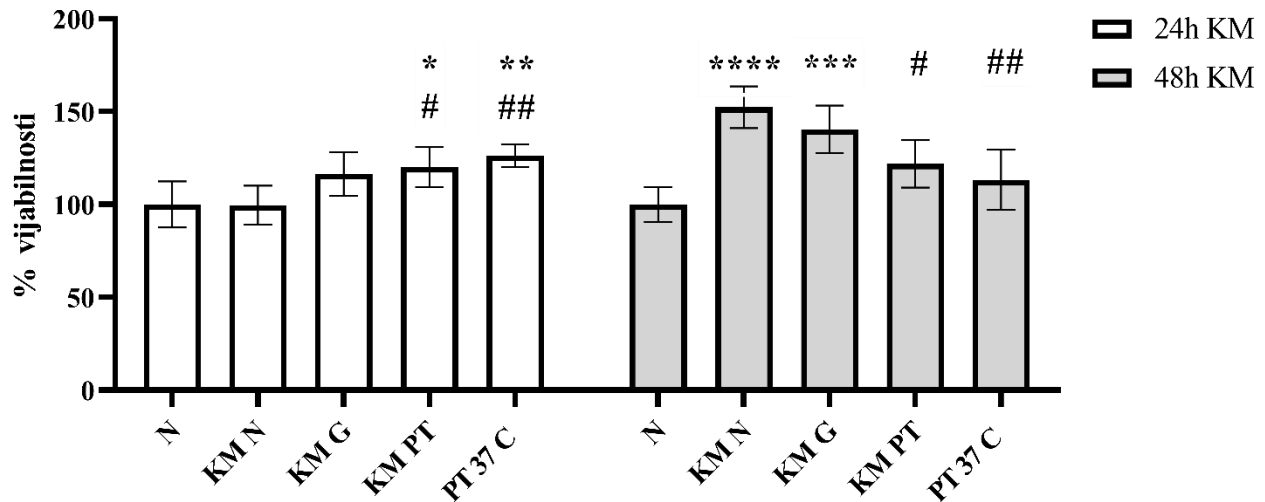
**A****B**

**Slika 27.** Efekat protrombina na migratorni potencijal HT29 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, protrombin 0,1 mg/mL, G - 50% glicerol koji odgovara P. B - Reprerzentativne fotografije povrede.

#### 4.5.3. Rezultati uticaja protrombina na angiogeni potencijal ćelija KRK

Kako bi se ispitaio uticaj ćelija KRK na proces angiogeneze, endotelne ćelije EA.hy926 su tretirane medijumom pokupljenim sa Caco-2 ćelija nakon tretmana protrombinom (kondicioni medijumi- KM).

U cilju određivanja efekta na vijabilnost i proliferaciju, korišćen je MTT esej. Nakon prikupljanja KM i kontrolnih medijuma, EA.hy926 su u njima resuspendovane i njihov rast je praćen tokom 20h. Dobijeni rezultati prikazani su na **Slici 28**.

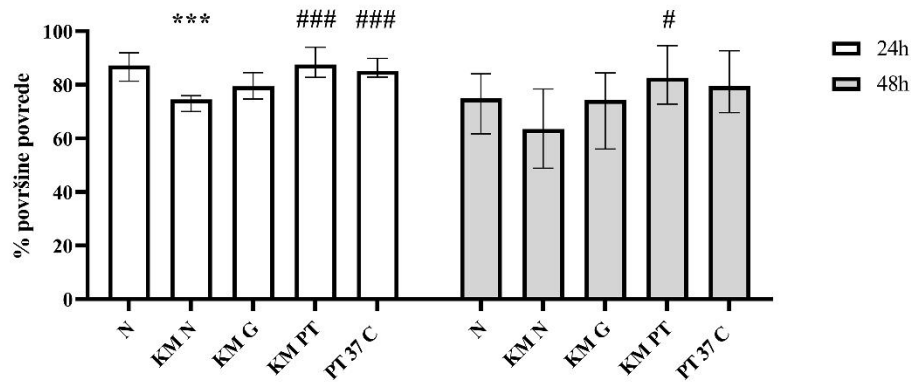


**Slika 28.** Efekat kondicioniranog medijuma sa Caco-2 ćelija tretiranih protrombinom u finalnoj koncentraciji od 0, 1 mg/mL na vijabilnost i proliferaciju EA.hy926 ćelija. Sve vrednosti tretmana su prikazane kao % u odnosu na netretirane ćelije- N (100%). Rezultati su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, KM N – ćelije tretirane kondicioniranim medijumom sa netretiranih Caco-2 ćelija, KM G - ćelije tretirane kondicioniranim medijumom sa Caco-2 ćelija tretiranih glicerolom, KM PT - ćelije tretirane kondicioniranim medijumom sa Caco-2 ćelija tretiranih protrombinom u koncentraciji 0,1 mg/mL, PT 37C - ćelije tretirane medijumom inkubiranim na 37°C sa protrombinom u koncentraciji 0,1 mg/mL. \* - poređenje sa N, # - poređenje sa KM N. \*/#  $p < 0,05$ , \*\*/##  $p < 0,01$ , \*\*\*/###  $p < 0,001$ , \*\*\*\*/####  $p < 0,0001$ .

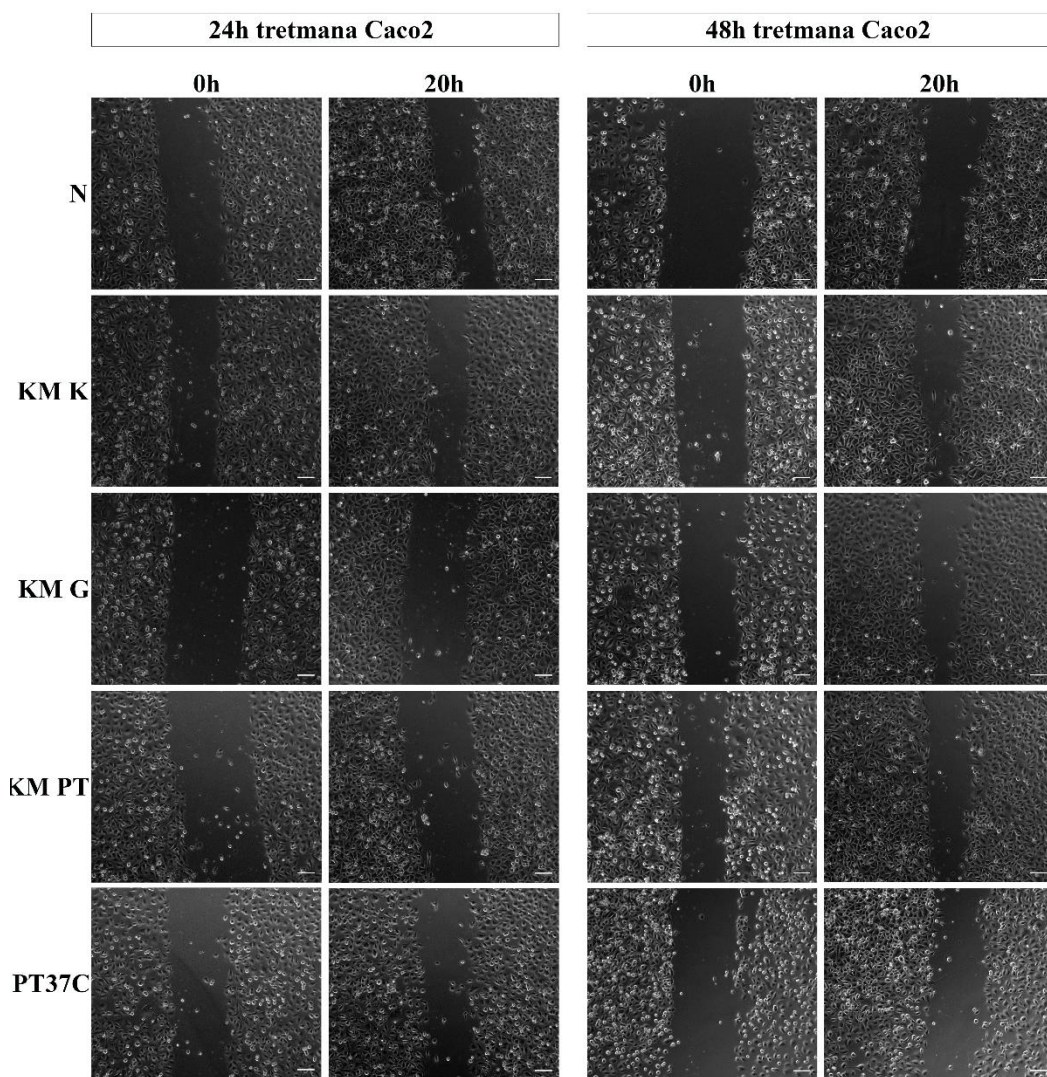
Prilikom tretmana ćelija sa kontrolnim i medijumom kondicioniranim tokom 24 h, uočava se povećana proliferacija ćelija u medijumima koji sadrže protrombin (KM PT i PT37C) u odnosu na netretirane ćelije N ( $p=0,0478$  za KM PT i  $p=0,0024$  za PT37C) i ćelije tretirane KM netretiranih Caco-2 - KM N ( $p=0,0381$  za KM PT i  $p=0,0018$  za PT 37°C). Što se tiče tretmana medijumima kondicioniranim tokom 48h, uočava se da je inhibirana proliferacija ćelija u medijumima koji sadrže protrombin (KM PT i PT37C) u odnosu na ćelije tretirane KM netretiranih Caco-2 - KM N ( $p=0,0392$  za KM PT i  $p=0,0019$  za PT37C), kao i povećana proliferacija kod ćelija tretiranih KM sa netretiranih Caco-2 - KM N i tretiranih glicerolom KM G u odnosu na netretirane ćelije N ( $p<0,0001$  za KM N i  $p=0,0010$  za KM G).

Za ispitivanje efekta ćelija KRK na migraciju endotelnih ćelija korišćen je esej zarastanja povrede. EA.hy926 ćelije su tretirane navedenim medijumima tokom 20 h. Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 29**.

A



B



**Slika 29.** Efekat kondicioniranog medijuma sa Caco-2 ćelija tretiranih protrombinom u koncentraciji od 0, 1 mg/mL na migratorni potencijal EA.hy926 ćelija. A - Odnos površine povrede (%) nakon 20 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. B - Reprezentativne fotografije povrede. N - netretirane ćelije, KM N - ćelije tretirane kondicioniranim medijumom sa netretiranih Caco-2 ćelija, KM G - ćelije tretirane kondicioniranim medijumom sa Caco-2 ćelija tretiranih glicerolom, KM PT - ćelije tretirane kondicioniranim medijumom sa Caco-2 ćelija tretiranih protrombinom u finalnoj koncentraciji 0,1 mg/mL, PT 37C - ćelije tretirane medijumom inkubiranim na 37°C sa protrombinom u finalnoj koncentraciji 0,1 mg/mL. \* - poređenje sa N, # - poređenje sa KM N. \*/# p < 0,05, \*\*/## p < 0,01, \*\*\*/### p < 0,001, \*\*\*\*/#### p < 0,0001.

Nakon tretmana 24h, uočava se da je povećana migracija ćelija u kondicioniranom medijumu netretiranih Caco-2 - (KM N) u odnosu na netretirane ćelije N (p=0,0002), kao i u odnosu na ćelije tetirane

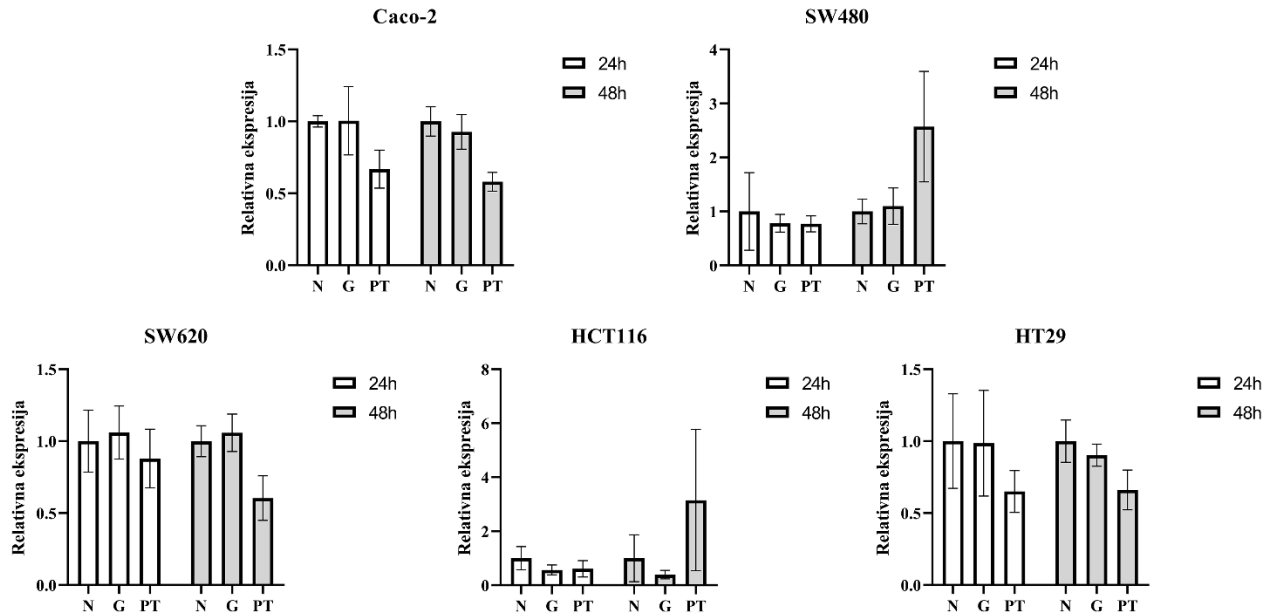
medijumima koji sadrže protrombin KM PT i PT37°C ( $p=0,0006$  za KM PT i  $p=0,0003$  za PT37°C). Kada je u pitanju tretman medijumima kondicioniranim 48 h, uočava se trend povećane migracije ćelija u KM N kao u slučaju 24 h tretmana, ali statistička značajnost postoji samo u odnosu na KM PT ( $p=0,0240$ ).

#### **4.5.4. Rezultati uticaja tretmana protrombinom na ekspresiju gena u KRK ćelijskim linijama**

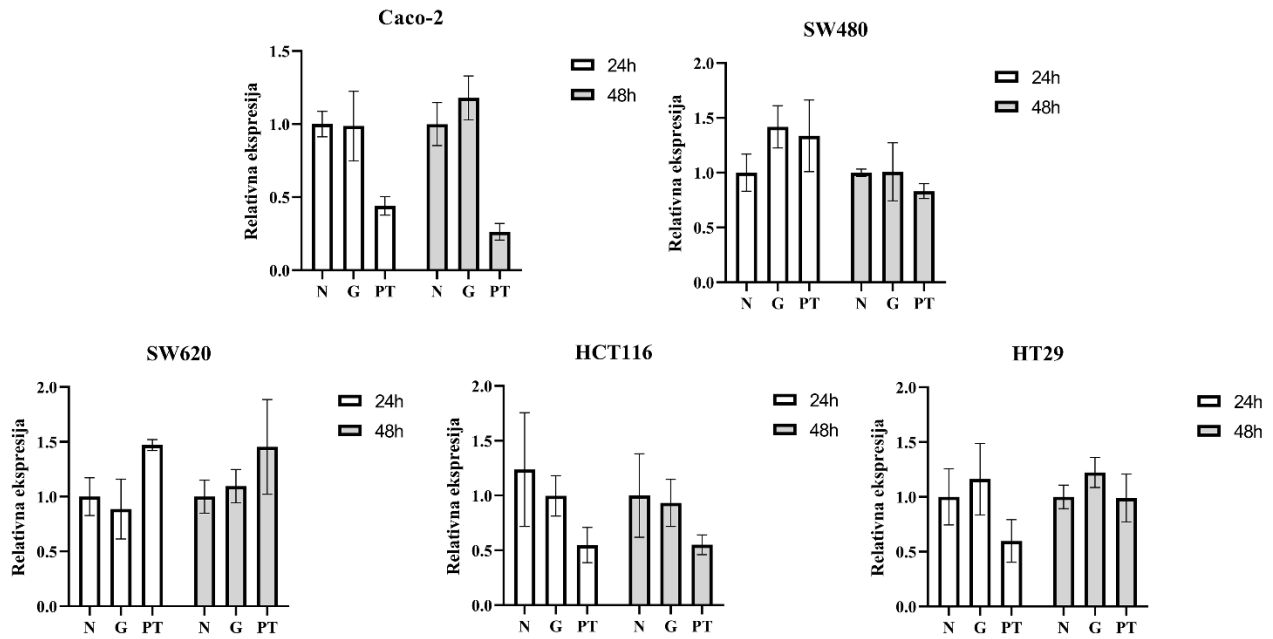
Kako je uočeno da protrombin ostvaruje efekat na biologiju KRK ćelijskih linija, ispitan je efekat protrombina na promenu u ekspresiji gena kod navedenih ćelija. Ćelije su tretirane protrombinom 24h i 48h nakon čega je ispitan efekat na promenu ekspresije metodama qPCR i ELISA (sve ćelijske linije), kao i metodom RNASeq (samo Caco-2 linija).

Kako bismo direktno ispitali uticaj protrombina na promenu u nivou ekspresije sopstvenog gena, kao i receptora PAR-1, izolovana RNK iz ćelija je korišćena kao matrica za reakciju qPCR-a. Analiza dobijenih rezultata ukazuje na postojanje trenda u smanjenju nivoa ekspresije gena za protrombin i PAR-1 nakon tretmana, s izuzetkom SW480 i HCT116 kod kojih dolazi do povećanja nivoa genske ekspresije protrombina, i SW620, kod kojih dolazi do povećanja nivoa genske ekspresije za PAR-1 (**Slika 30**).

**A**

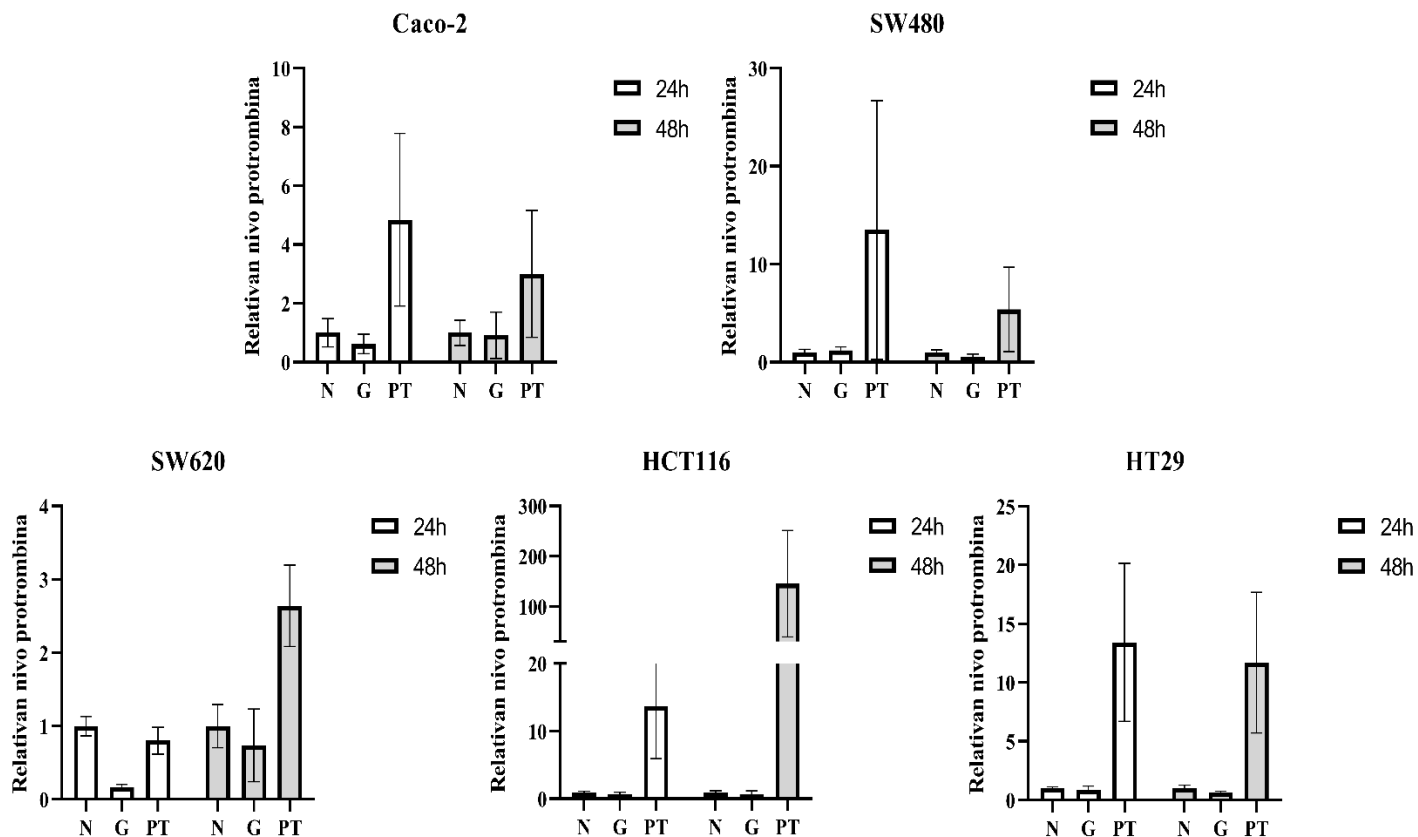


**B**



**Slika 30.** Efekat tretmana protrombinom na ekspresiju gena za protrombin i PAR-1. Prikazan je relativni nivo ekspresije iRNK u odnosu na netretirane ćelije A – protrombin, B - PAR-1. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N – netretirane ćelije, G – ćelije tretirane glicerolom, PT- ćelije tretirane protrombinom.

Nivo ekspresije protrombina u tretiranim ćelijama ispitan je ELISA metodom. Kod svih ćelijskih linija se uočava povećan nivo protrombina u lizatu tretiranih ćelija u odnosu na netretirane ćelije (**Slika 31**).



**Slika 31.** Nivo protrombina u ćelijskim lizatima posle tretmana protrombinom. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. N – netretirane ćelije, G – ćelije tretirane glicerolom, PT- ćelije tretirane protrombinom.

Efekat tretmana protrombinom u trajanju 24 h i 48 h na ekspresioni profil odabranih gena u Caco-2 ćelijama u odnosu na netretirane ćelije i ćelije tretirane glicerolom, ispitan je metodom sekvenciranja transkriptoma. Promene ekspresionog profila prikazane su u **Tabeli 13**.

**Tabela 13.** Panel diferencijalne ekspresije odabranih gena u Caco-2 ćelijama zavisno od tretmana.

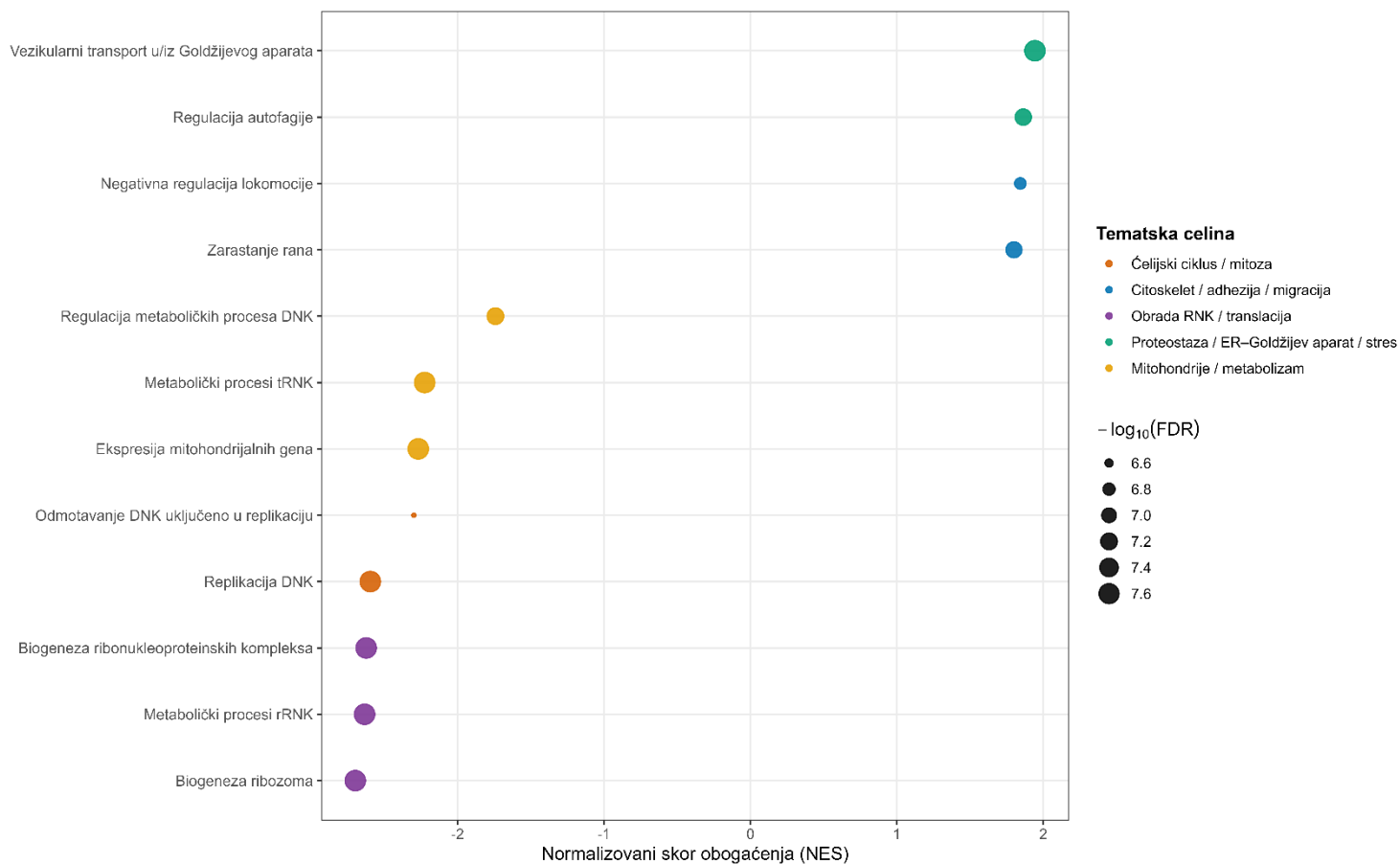
Gen	G vs N				PT vs N				PT vs G			
	24h		48h		24h		48h		24h		48h	
	log2FC	FDR	log2FC	FDR	log2FC	FDR	log2FC	FDR	log2FC	FDR	log2FC	FDR
<i>F2</i>	0.089	1	-0.214	0.631	-0.103	0.775	-0.367	0.231	-0.192	5.56E-01	-0.153	0.651
<i>F2R</i>	0.086	1	0.195	0.424	-0.552	0.001	-1.028	6.2E-10	-0.638	6.76E-05	-1.223	1E-13
<i>F2RL1</i>	0.148	1	-0.121	0.615	0.706	1.2E-07	0.406	0.00336	0.557	3.36E-05	0.526	7E-05
<i>F2RL2</i>	-0.139	1	0.022	NA	-0.849	0.161	-0.913	0.193	-0.71	2.49E-01	-0.935	0.177
<i>F2RL3</i>	0	1	0.639	NA	0	NA	0.69	NA	0	NA	0.051	NA
<i>FGA</i>	0.585	1	-0.296	NA	0.231	0.732	0.339	0.608	-0.354	5.48E-01	0.635	0.306
<i>FGB</i>	0.667	1	0.726	NA	0.475	0.632	0.029	0.983	-0.192	8.49E-01	-0.696	0.494
<i>FGG</i>	0.871	1	0.733	NA	1.207	0.0151	1.102	0.0209	0.337	5.30E-01	0.369	0.492

\*NA = FDR nije izračunat (*DESeq2 independent filtering* / nedovoljna informacija u podacima, najčešće zbog vrlo niske ekspresije). N – netretirane ćelije, G – ćelije tretirane glicerolom, PT- ćelije tretirane protrombinom.

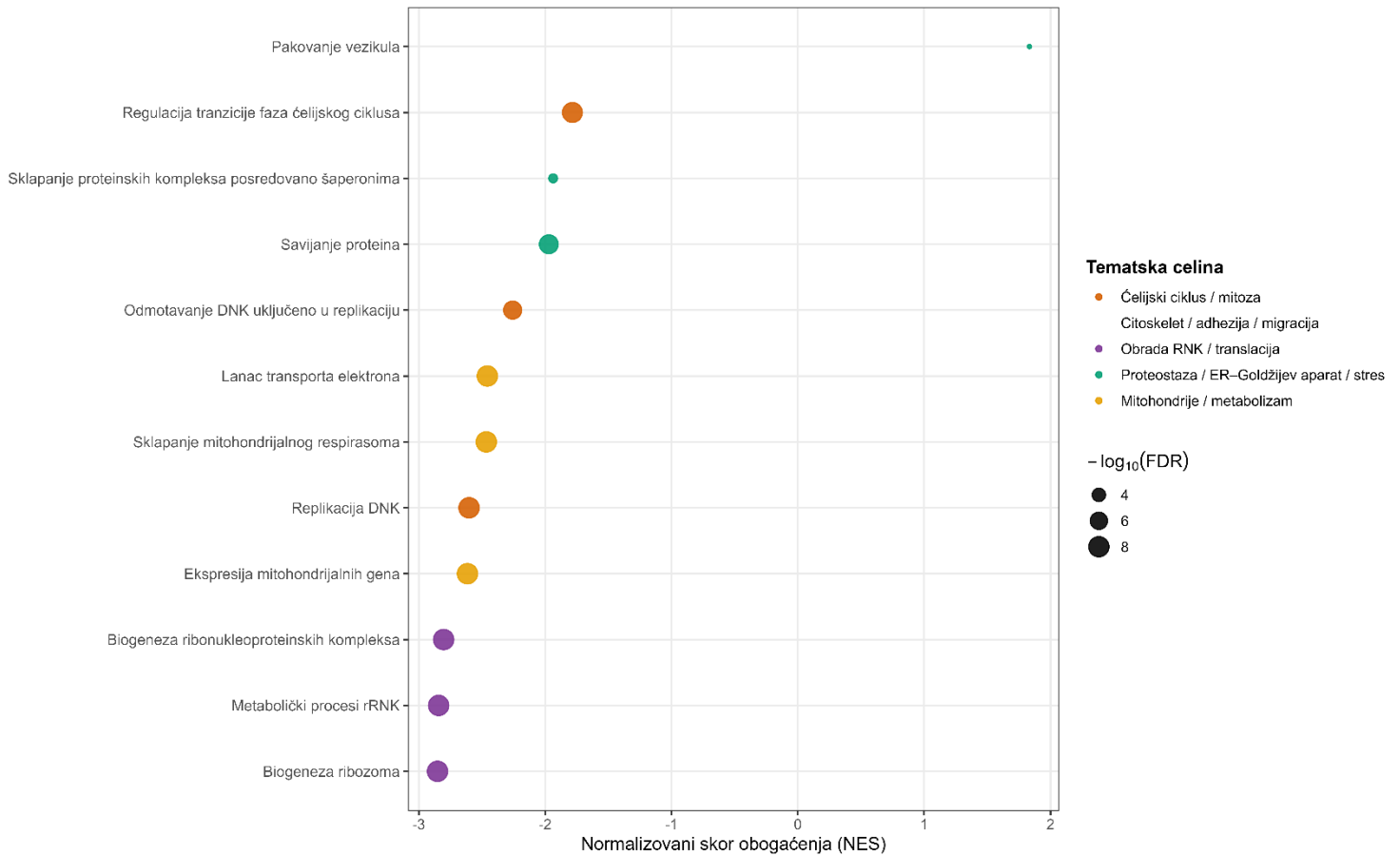
Nakon tretmana glicerolom, nije uočena promena u nivou ekspresije ispitivanih gena. Nakon tretmana protrombinom uočava se značajan pad u nivou ekspresije gena za PAR-1 receptor i porast u nivou ekspresije gena za PAR-2 receptor, pri čemu je pad u nivou ekspresije gena za PAR-1 receptor i vremenski zavisna, odnosno više je izražen na 48 h u odnosu na 24 h. Takođe, uočava se i povećanje u nivou ekspresije gena za gama lanac fibrinogena kod ćelija tretiranih protrombinom u odnosu na netretirane, ali ne i u odnosu na ćelije tretirane glicerolom.

Nakon analize diferencijalne ekspresije odabranih gena, sprovedeno je funkcionalno obogaćenje kroz GSEA metodu. Analizirani su vremenski profili unutar istog tretmana (isti uzorak na 48 h upoređen sa uzorkom na 24 h), kako bi se ispitala promene u ekspresiji kroz trajanje tretmana. Rezultati funkcionalnog obogaćenja, izraženi kao normalizovani skor obogaćenja (engl. *Normalised Enrichment Score*, NES), prikazani su na **Slikama 32-34**.

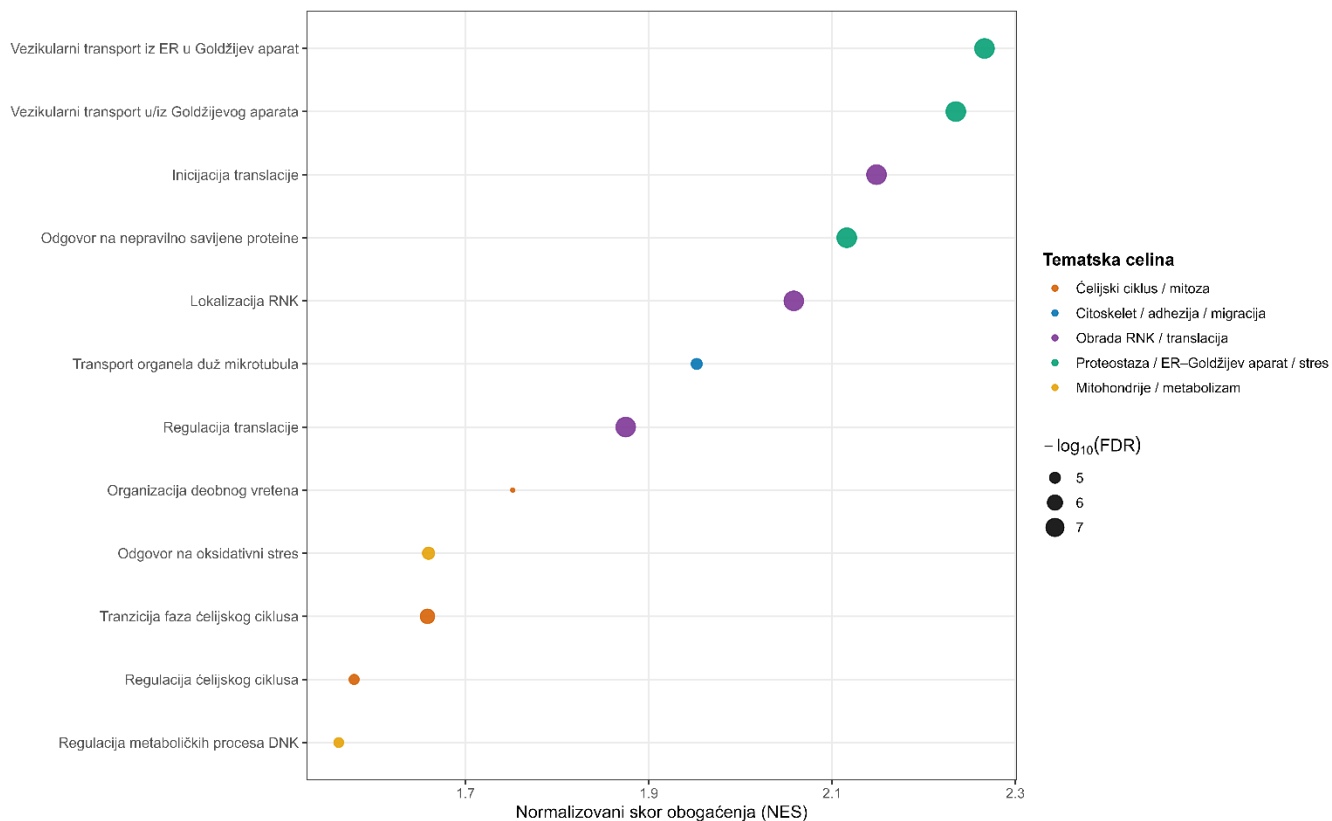
U oba kontrolna tretmana (netretirane i ćelije tretirane glicerolom) uočava se tokom trajanja tretmana pad u nivou ekspresije gena ( $NES < 1$ ) povezanih sa procesima biogeneze ribonukleoproteinskih kompleksa, metaboličkih procesa rRNK i tRNK, odmotavanja DNK i replikacije i ekspresije mitohondrijalnih gena. Kod netretiranih ćelija na 48h dolazi do povećanja nivoa ekspresije gena povezanih sa procesima autofagije i migracije, a kod obe kontrole je uočena veći nivo ekspresije gena čiji su produkti povezani sa vezikularnim transportom. S druge strane, kod ćelija tretiranih protrombinom nakon 48h dolazi do povećanja nivoa ekspresije gena ( $NES > 1$ ) povezanih sa procesima odgovora na oksidativni stres i nepravilno savijene proteine, regulaciju translacije i vezikularnog transporta.



**Slika 32.** Funkcionalno obogaćenje ekspresije gena u uzorcima netretiranih ćelija, poređenje 48h sa 24h. Rezultati su prikazani kao normalizovani rezultat obogaćenja. Veličina tačke je izražena kao  $-\log_{10}(\text{FDR})$ .



**Slika 33.** Funkcionalno obogaćenje ekspresije gena u uzorcima ćelija tretiranih glicerolom, poređenje 48h sa 24h. Rezultati su prikazani kao normalizovani rezultat obogaćenja. Veličina tačke je izražena kao  $-\log_{10}(\text{FDR})$ .

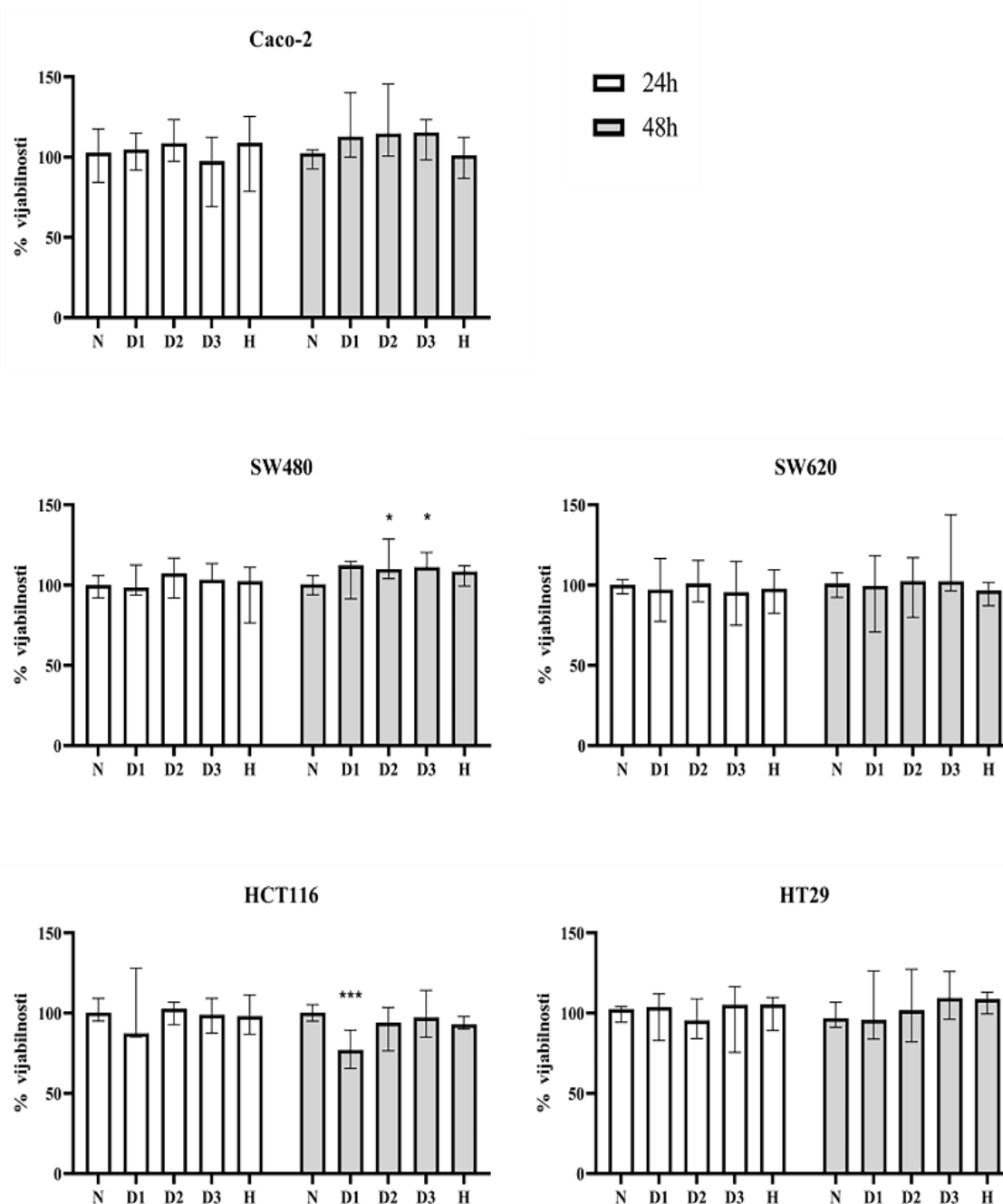


**Slika 34.** Funkcionalno obogaćenje ekspresije gena u uzorcima ćelija tretiranih protrombinom, poređenje 48h sa 24h. Rezultati su prikazani kao normalizovani rezultat obogaćenja. Veličina tačke je izražena kao  $-\log_{10}(\text{FDR})$ .

## 4.6. Rezultati ispitivanja efekata trombina i dabigatrana *in vitro* i *in vivo*

### 4.6.1. Rezultati uticaja trombina i dabigatrana na vijabilnost i proliferaciju ćelija KRK

MTT testom je analizirana vijabilnost ćelija KRK nakon tretmana dabigatranom, u cilju ispitivanja potencijalnog toksičnog efekta, i njegovog isključivanja u daljim eksperimentima. Primjenjene su koncentracije od 100 nmol/L, 500 nmol/L i 1500 nmol/L. Koncentracije dabigatrana su odabrane pregledom literature. Kako je dabigatran rastvoren u 0,1 M rastvoru HCl, ovaj rastvor je korišćen kao kontrola rastvarača, u koncentraciji koja odgovara 1500 nmol/L dabigatrana. Rezultati efekta dabigatrana u različitim koncentracijama na vijabilnost i proliferaciju ćelija, prikazani su na **Slici 35**.

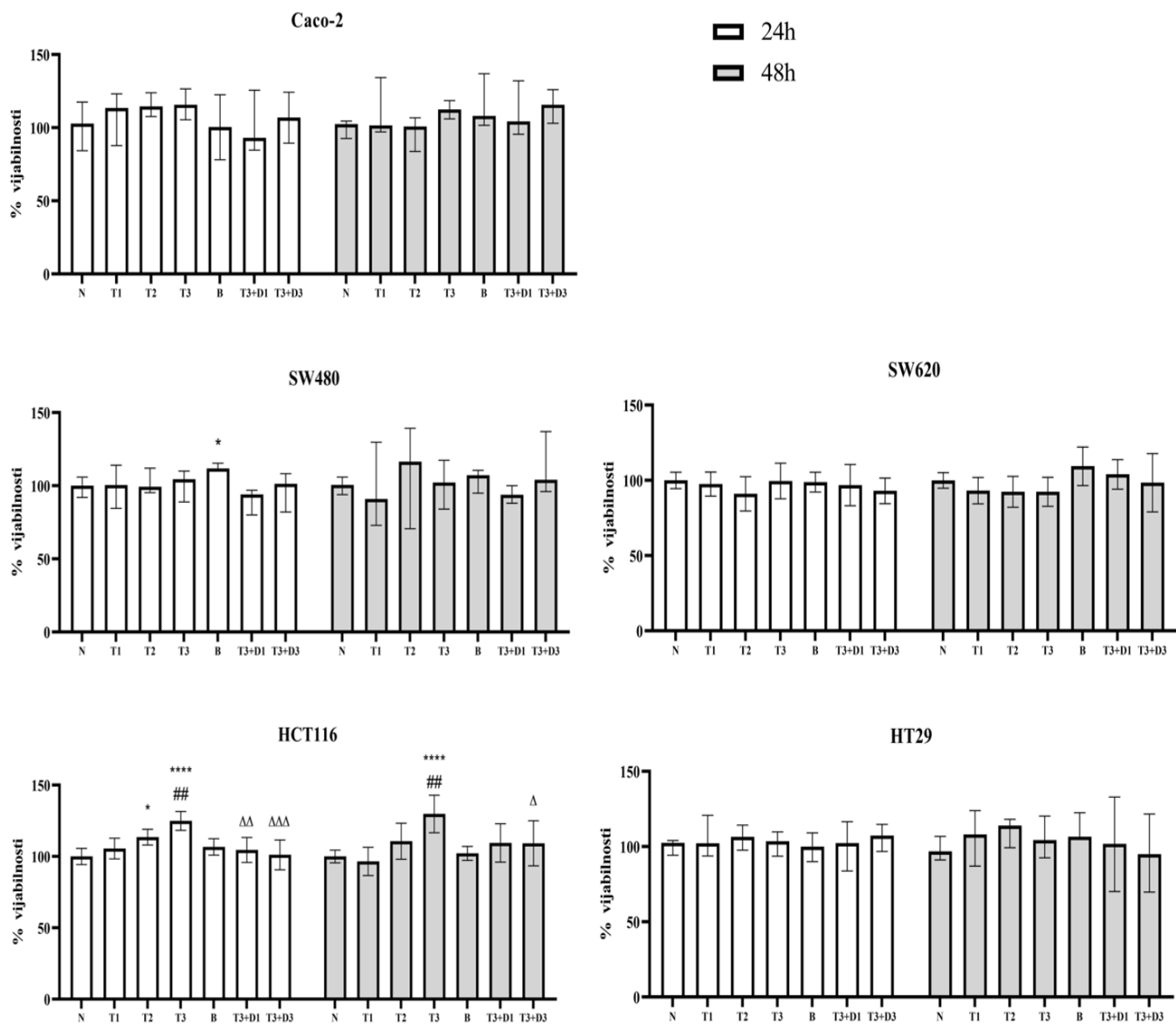


**Slika 35.** Efekat dabigatrana na vijabilnost i proliferaciju ćelija. Sve vrednosti tretmana su prikazane kao % u odnosu na netretirane ćelije (100%). Rezultati su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI. N - netretirane ćelije, D1 - dabigatran 100 nmol/L, D2 - dabigatran 500 nmol/L, D3 - dabigatran 1500 nmol/L, H - 0, 1M rastvor HCl koji odgovara D3 (kontrola nosača). \* - poređenje sa netretiranim ćelijama. \*/# P < 0,05, \*\*/### P < 0,01, \*\*\*/#### P < 0,001, \*\*\*\*/##### P < 0,0001.

Analizom dobijenih rezultata uočava se da dabigatran ne ostvaruje statistički značajan efekat na vijabilnost ćelija. Kod SW480 na 48 h koncentracije dabigatrana od 500 nmol/L i 1500 nmol/L dovele su do povećane proliferacije u odnosu na netretirane ćelije (p=0,0187 i p=0,0280), međutim taj efekat nije

ostvaren u odnosu na kontrolu rastvarača. Takođe, kod HCT116 na 48h dabigatran u koncentraciji od 100 nmol/L doveo je inhibicije proliferacije u odnosu na netretirane ćelije ( $p=0,0005$ ). Kako koncentracija dabigatrana od 500 nmol/L ne ostvaruje toksičan efekat na ćelije, odabrana je za eksperimente ispitivanja migracionog potencijala ćelija.

Kako bismo ispitali efekat trombina na odabranim ćelijama, kao i udružen efekat trombina i dabigatrana, ćelije su tretirane trombinom u koncentracijama od 0,1 U/mL, 0,5 U/mL i 2,5 U/mL, kao i kombinacijom 2,5 U/mL trombina sa 100 nmol/L, odnosno 1500 nmol/L dabigatrana (**Slika 36**). Kako je trombin rastvoren u smeši BSA finalne koncentracije 0,1%, kao kontrola rastvarača korišćen je ovaj rastvor u koncentraciji koja odgovara 2,5 U/mL trombina.



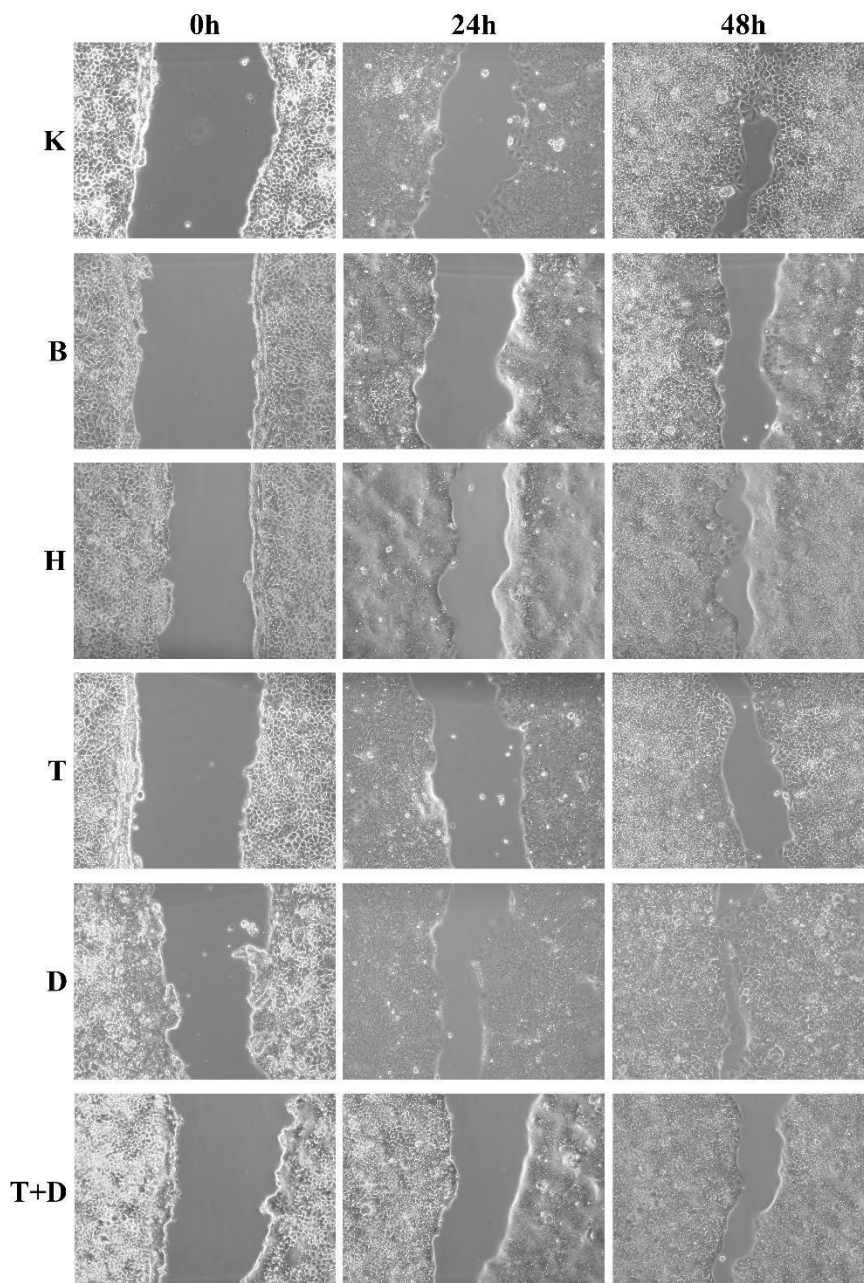
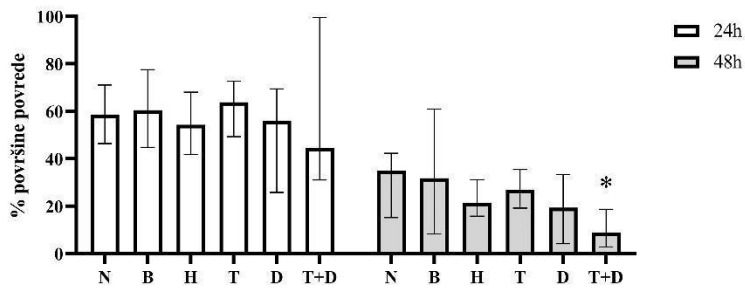
**Slika 36.** Efekat trombina (T), i kombinacije trombina i dabigatrana (T+D) na vijabilnost i proliferaciju ćelija. Sve vrednosti tretmana su prikazane kao % u odnosu na netretirane ćelije (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI (SW620 i HCT116) ili medijana  $\pm$  95% CI (Caco-2, SW480 i HT29). N - netretirane ćelije, koncentracija trombina (T1 - 0,1 U/mL, T2 - 0,5 U/mL, T3 - 2,5 U/mL), B - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T3, koncentracija dabigatrana (D1 - 100 nmol/L, D3 - 1500 nmol/L). \* - poređenje sa netretiranim ćelijama, # - poređenje sa ćelijama tretiranim BSA,  $\Delta$  - poređenje sa ćelijama tretiranim trombinom (T3). \*/#/ $\Delta$  P < 0,05, \*\*/##/ $\Delta\Delta$  P < 0,01, \*\*\*/###/ $\Delta\Delta\Delta$  P < 0,001, \*\*\*\*/####/ $\Delta\Delta\Delta\Delta$  P < 0,0001.

Dobijeni rezultati MTT testa ukazuju da trombin ne ostvaruje efekat na proliferaciju ćelija u primenjenim koncentracijama i zadatim uslovima, kod većine testiranih ćelija (Caco-2, SW480, SW620, HT29). U slučaju SW480, zabeleženo je da kontrola rastvarača BSA dovodi do povećanja proliferacije ćelija nakon 24 h tretmana ( $p=0,0335$ ), ali se isti fenomen ne uočava na 48h.

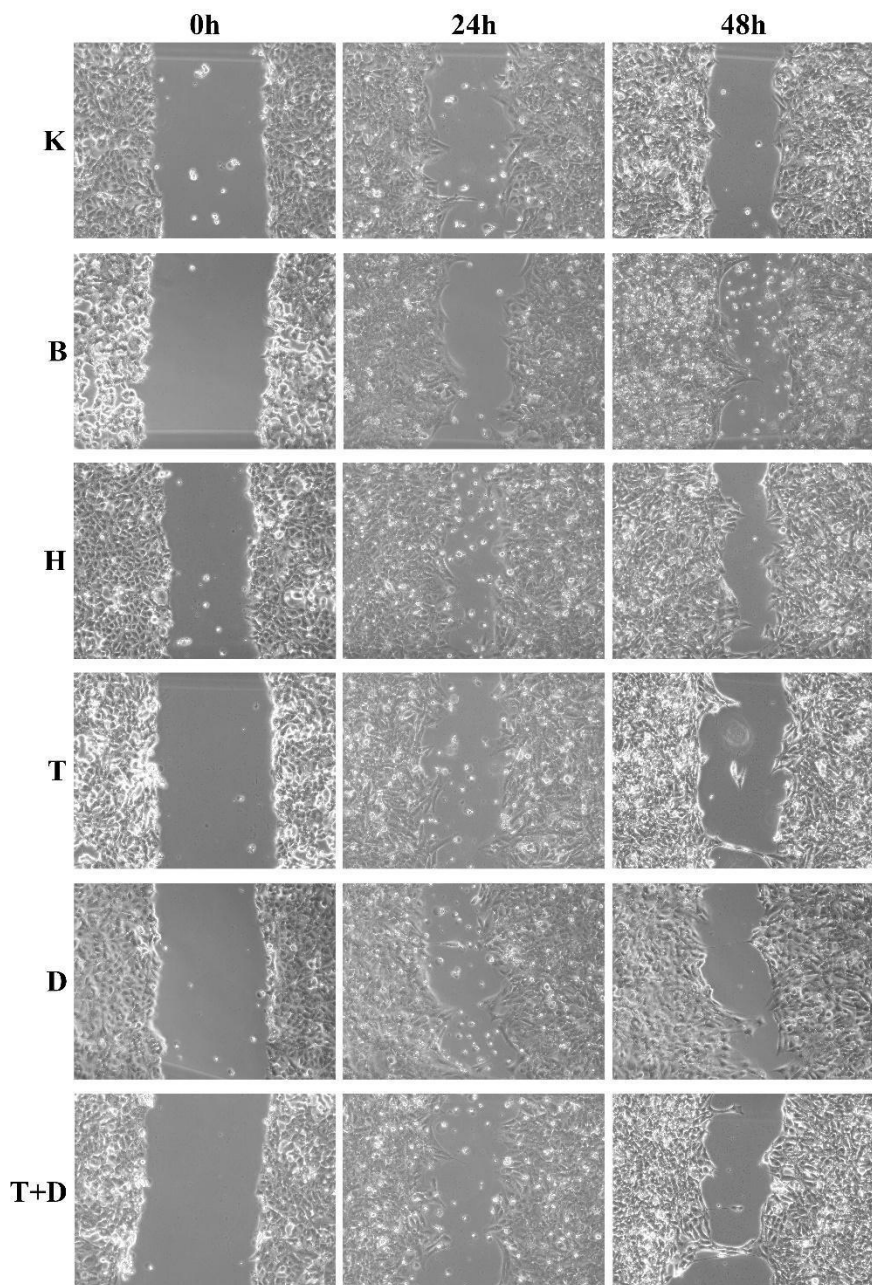
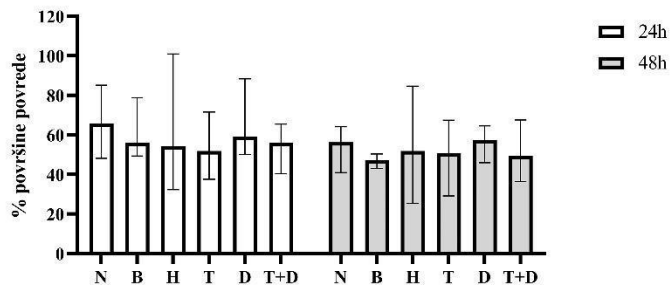
Trombin u koncentraciji od 0,5 U/mL dovodi do povećanja proliferacije kod HCT116 ćelijske linije nakon 24 h tretmana ( $p=0,0316$ ), ali se efekat ne ponavlja nakon 48 h. U najvećoj primenjenoj koncentraciji od 2,5 U/mL trombin dovodi do statistički značajnog povećanja proliferacije u obe vremenske tačke, u odnosu i na netretirane ćelije ( $p<0,0001$  za obe tačke) i na ćelije tretirane sa BSA ( $p=0,0065$  za 24 h i  $p=0,0022$  za 48 h). Dodatno, ovaj efekat se poništava primenom dabigatrana, sa obe primenjene koncentracije na 24h ( $p=0,0016$  za 100 nmol/L i  $p=0,0001$  za 1500 nmol/L), odnosno sa koncentracijom od 1500 nmol/L na 48h ( $p=0,0492$ ).

#### **4.6.3. Rezultati uticaja trombina i dabigatrana na migraciju ćelija KRK**

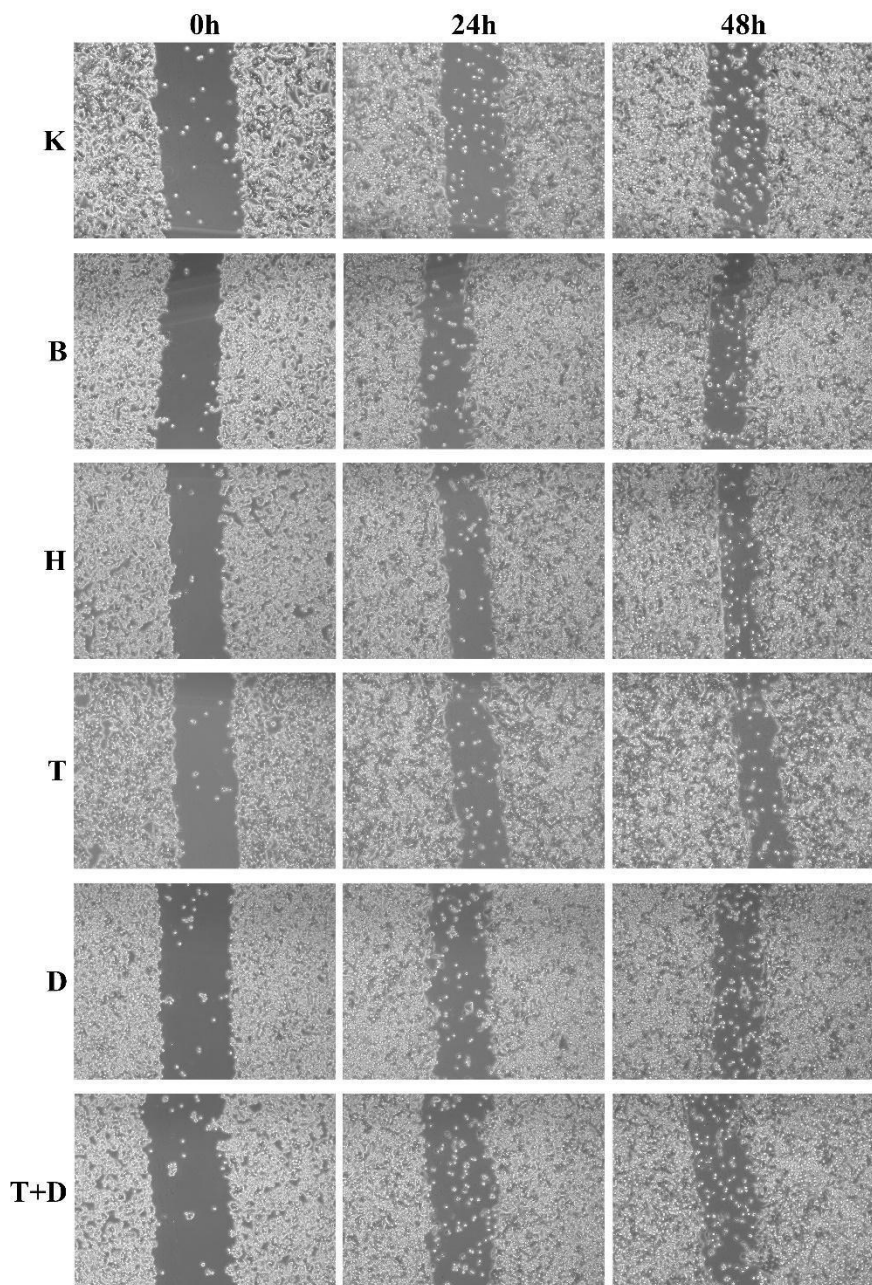
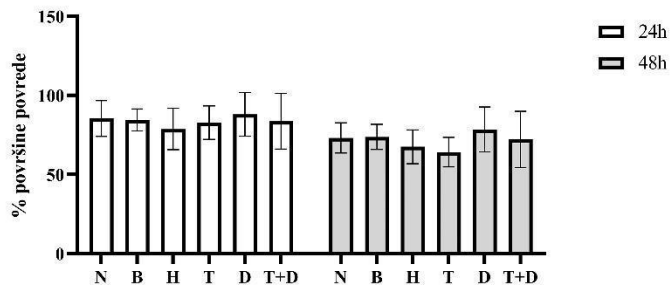
Kao i u slučaju protrombina, esejom zarastanja povrede ispitan je efekat trombina, dabigatrana i njihove kombinacije na migracioni potencijal ćelija KRK. Primenjene su koncentracije trombina od 0,5 U/mL i dabigatrana od 500 nmol/L, kako zasebno tako i u kombinaciji, a zatvaranje površine povrede praćeno kroz 24 h i 48 h. Analiza rezultata pokazuje da u primenjenim koncentracijama i zadatim uslovima, trombin i dabigatran ne ostvaruju statistički značajan efekat na migracioni potencijal ispitivanih ćelija (**Slike 37-41**), izuzev kod Caco-2, gde na 48h sati tretmana kombinacija trombina i dabigatrana (T+D) dovodi do bržeg zatvaranja povrede u odnosu na netretirane ćelije ( $p=0,0162$ ).



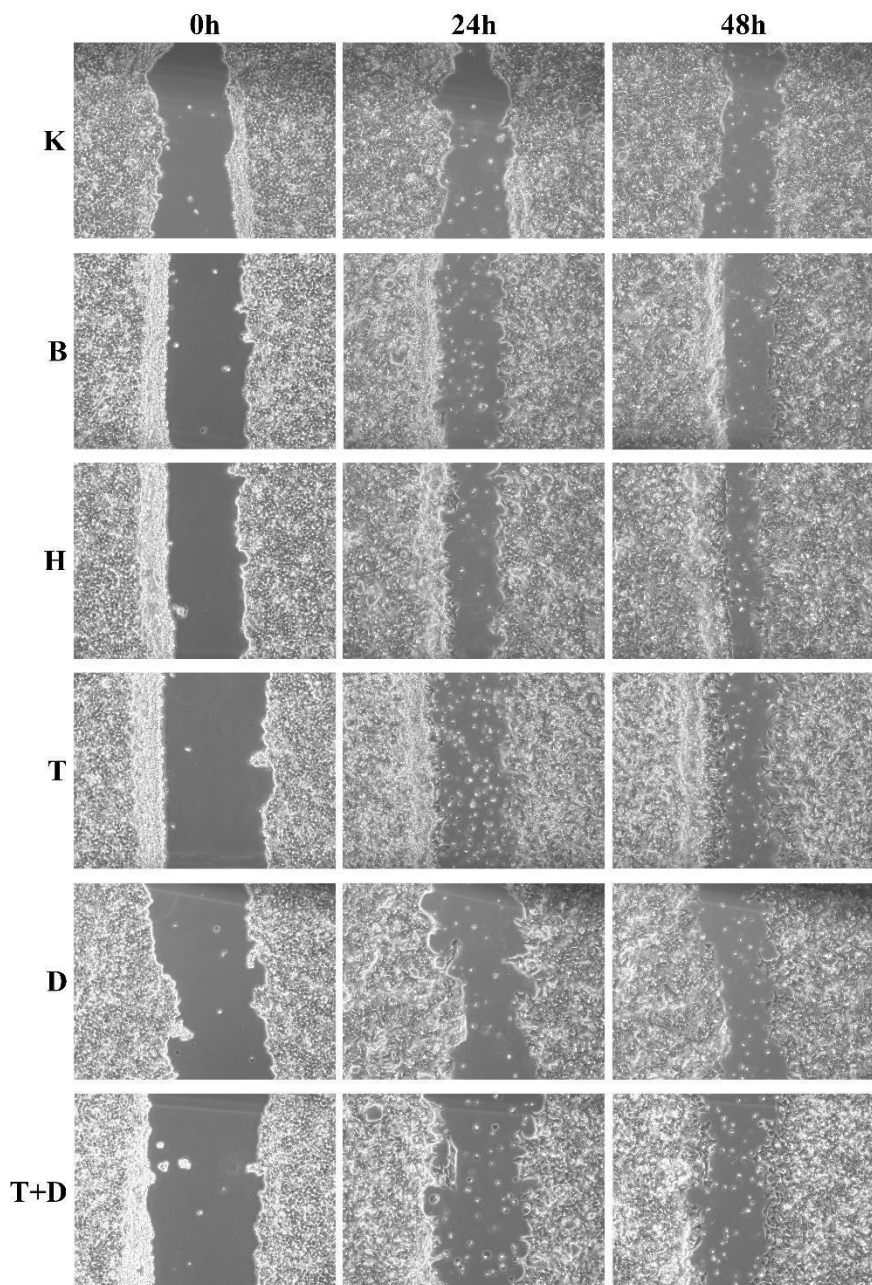
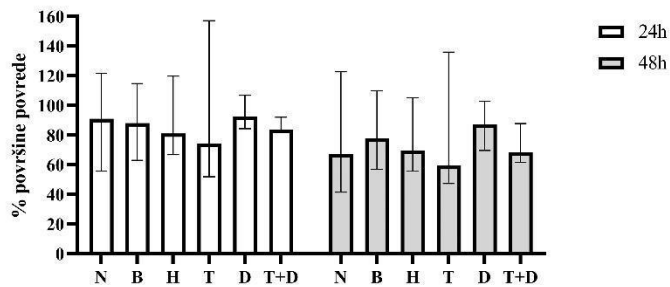
**Slika 37.** Efekat trombina i dabigatrana na migracioni potencijal Caco-2 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI. B - Reprezentativne fotografije povrede. N - netretirane ćelije, T - Trombin 0,5 U/mL, B - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T, H - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D, D - dabigatran - 500 nmol/L, T+D - Trombin 0,5 U/mL + Dabigatran 500 nmol/L.



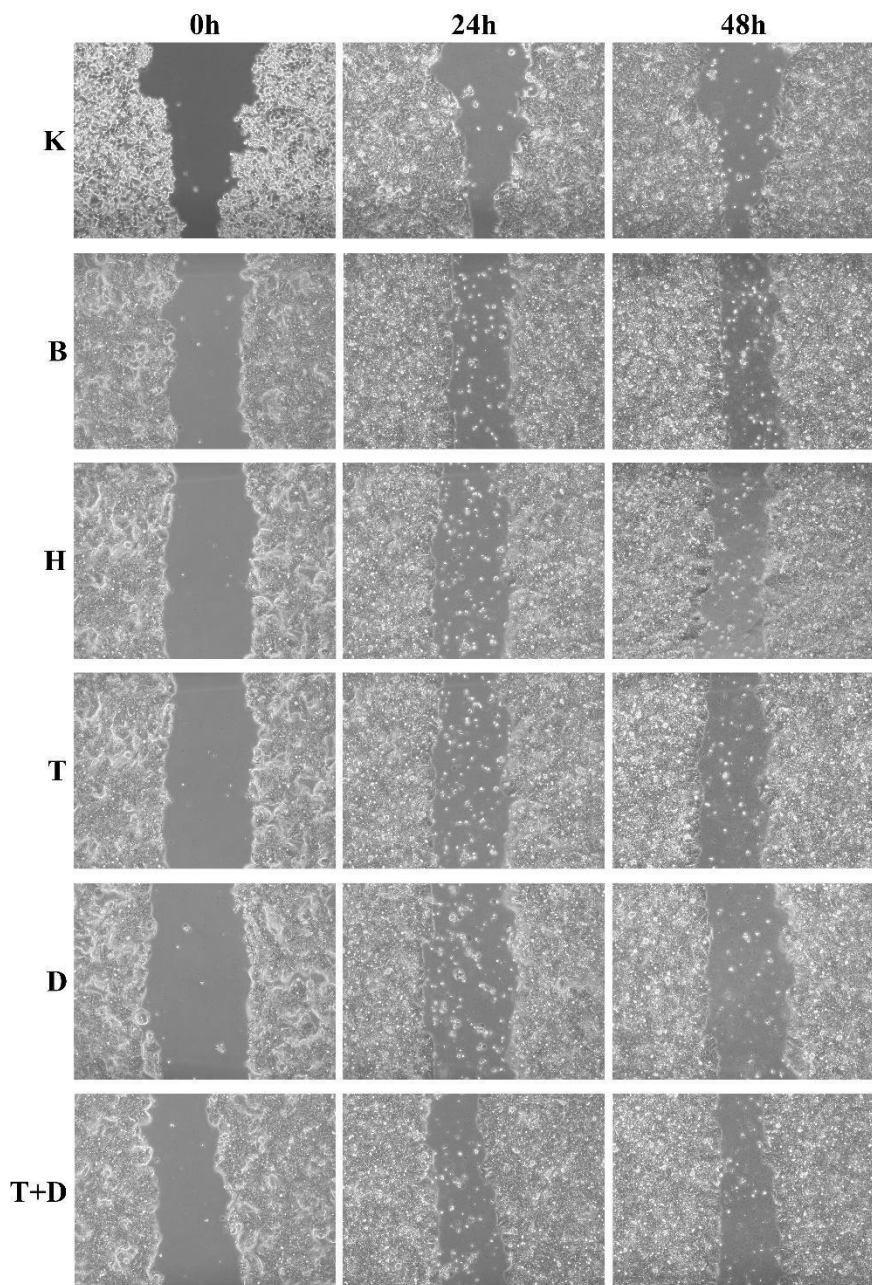
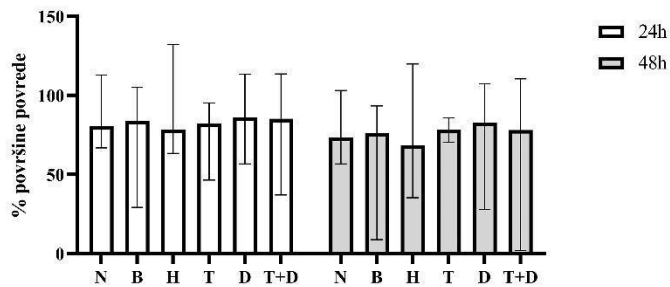
**Slika 38.** Efekat trombina i dabigatrana na migratorni potencijal SW480 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI. B - Reprezentativne fotografije povrede. N - netretirane ćelije, T - Trombin 0,5 U/mL, B - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T, H - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D D - dabigatran 500 nmol/L, T+D - Trombin 0,5 U/mL + Dabigatran 500 nmol/L.



**Slika 39.** Efekat trombina i dabigatrana na migratorni potencijal SW480 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. B - Reprezentativne fotografije povrede. N - netretirane ćelije, T - Trombin 0,5 U/mL, B - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T, H - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D D - dabigatran 500 nmol/L, T+D - Trombin 0,5 U/mL + Dabigatran 500 nmol/L.



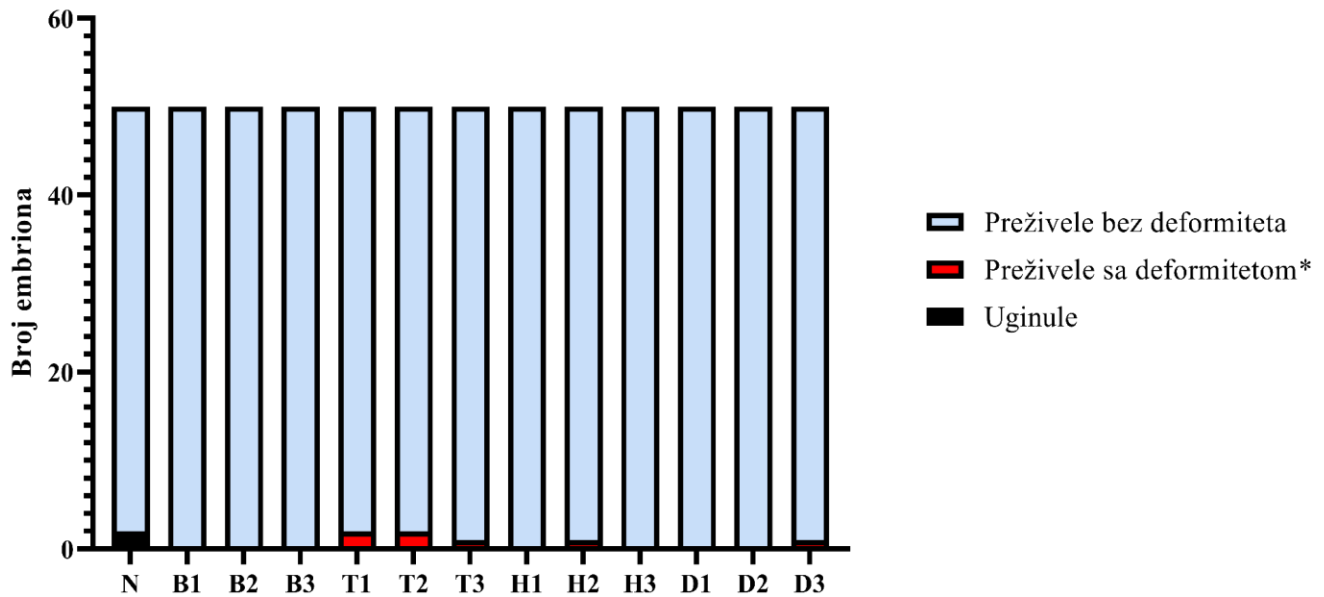
**Slika 40.** Efekat trombina i dabigatrana na migratorni potencijal HCT116 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI. B - Reprezentativne fotografije povrede. N - netretirane ćelije, T - Trombin 0,5 U/mL, B - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T, H - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D D - dabigatran 500 nmol/L, T+D - Trombin 0,5 U/mL + Dabigatran 500 nmol/L.



**Slika 41.** Efekat trombina i dabigatrana na migratorni potencijal HT29 ćelijske linije. A - Odnos površine povrede (%) nakon 24 h tj. 48 h tretmana i iste povrede na 0h (100%). Rezultati su prikazani kao medijana  $\pm$  95% CI. B - Reprezentativne fotografije povrede. N - netretirane ćelije, T - Trombin 0,5 U/mL, B - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T, H - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D D - dabigatran 500 nmol/L, T+D - Trombin 0,5 U/mL + Dabigatran 500 nmol/L.

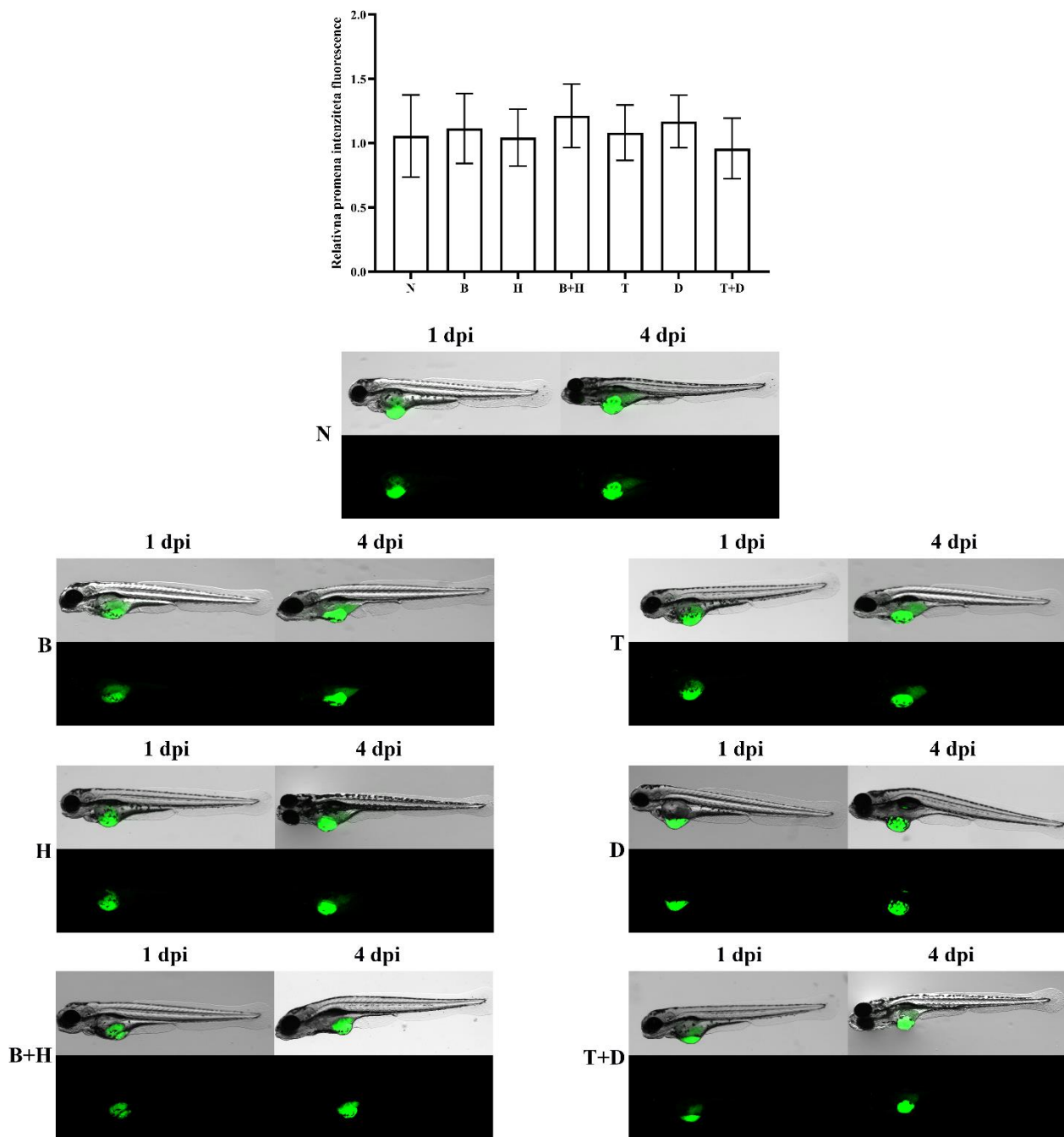
#### 4.6.4. Rezultati uticaja trombina i dabigatrana na KRK ćelije *in vivo*

Uticaj trombina i dabigatrana *in vivo* na ćelije KRK ispitan je u modelu embriona zebrice, uspostavljanjem ksenografta KRK ćelija. Pre ksenotransplantacije, embrioni stari 72h su tretirani trombinom i dabigatranom i kako nijedna primenjena koncentracija nije ispoljila značajan efekat na njihovu smrtnost i razviće, za dalje eseje izabrane su najviše koncentracije trombina od 2,5 U/mL, odnosno dabigatrana od 1500 nmol/L (Slika 42).



**Slika 42.** Efekat tretmana trombinom i dabigatranom na embrione zebrice. N - embrioni u čistom *Instant Ocean* rastvoru, B1 - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T1, B2 - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T2, B3 - 0,1% rastvor BSA koji odgovara T3, Trombin (T1 - 0,1 U/mL, T2 - 0,5 U/mL, T3 - 2,5 U/mL), dabigatran (D1 - dabigatran 100 nmol/L, D2 - dabigatran 500 nmol/L, D3 - dabigatran 1500 nmol/L), H1 - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D1, H2 - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D2, H3 - 0,1M rastvor HCl koji odgovara D3. \* Uočeni deformiteti su bili edemi perikarda i perivitelusnog prostora, nepravilnosti u repu ili u perajima.

Kako su jedine ćelije koje su reagovale na tretman trombinom i dabigatranom bile HCT116, one su izabране za inokulaciju embriona. Ksenografti su uspostavljeni primenom linije HCT116-GFP, koja stabilno eksprimira GFP fluorescentni protein. Analizom promene fluorescence utvrđeno je da primenjeni tretmani ne ostvaruju dejstvo na veličinu ksenografta u embrionima zebrica (Slika 43).



**Slika 43.** Efekat trombina (T-2, 5 U/mL) i dabigatrana (D-1500 nmol/L) na ksenografte HCT116-GFP ćelija (zeleni signal) u embrionima zebrića. 1 – Nivo relativne promene intenziteta fluorescence. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  95% CI. 2 – reprezentativne slike embriona zebrića sa ksenograftima. N - Netretirani embrioni, B - 0,1% BSA, kao kontrola nosača trombina, H - 0,1 M HCl, kao kontrola nosača dabigatrana.

## 5. DISKUSIJA

Istraživanja u okviru ove disertacije podeljena su na tri dela:

- Prvi deo istraživanja obuhvatio je *ex vivo* analizu uzoraka, kao i bioinformatičku analizu javno dostupnih transkriptomskih podataka uzoraka bolesnika sa KRK.
- Drugi deo istraživanja obuhvatio je analizu ekspresije, aktivacije i efekata protrombina *in vitro* na modelu ćelijskih linija KRK.
- Treći deo istraživanja obuhvatio je analizu efekata trombina i dabigatrana *in vitro*, na modelu ćelijskih linija KRK, i *in vivo*, na ksenograftima u model sistemu zebrice.

Veza između malignih oboljenja i trombotičkih događaja je već duže vreme prepoznata. Iako se uloga proteina hemostaze kod obolelih od maligniteta uglavnom povezuje sa hiperkoagulabilnim stanjem i povećanim rizikom od tromboza, značaja koagulacionih faktora za razviće različitih tipova malignih tumora je tema sve većeg broja naučnih studija (180). I pored toga, pitanje ekspresije koagulacionih faktora, regulacije njihovog nivoa i aktivacije, kao i konkretne uloge u tumorskom mikrookruženju i dalje nije potpuno razjašnjeno.

Ključni učesnik koagulacione kaskade je serin-proteaza trombin, koja se dobija proteolitičkim isecanjem prekursora protrombina. Gen za protrombin poseduje nekanonski organizovan 3' kraj što ga čini podložnim mutacijama koje dovode do povećane ekspresije protrombina (51). Varijanta FII G20210A u ovom regionu gena je jedan od najčešćih faktora rizika koji su povezani sa naslednom trombofilijom. Kod obolelih od maligniteta prisustvo ove varijante može dovesti do većeg rizika za pojavu tromboza u odnosu na obolele nenosiocice (181). Dodatno, dokazi ukazuju na postojanje veze između inflamatornog stanja i povećane ekspresije protrombina (134). U tom kontekstu, ukoliko je u genu za protrombin prisutna prokoagulantna varijanta, postavlja se pitanje da li bi proinflamatorno tumorsko mikrookruženje moglo dodatno potencirati njen efekat, dovodeći do izraženijeg povećanja ekspresije i posledično pojačane prokoagulantne aktivnosti.

U prvom delu disertacije, ispitano je prisustvo varijanti u 3' kraju gena za protrombin u TT i NOT kod obolelih od adenokarcinoma kolona. U oba tipa tkiva su detektovane tri varijante FII, FII A19911G i FII c.1824C>T (178). Navedene varijante su prethodno opisane i povezane sa povišenom ekspresijom protrombina (51,182,183).

Varijanta FII G20210A je detektovana kod tri bolesnika u NOT u heterozigotnom obliku (učestalost od 3,2%). Dva bolesnika su imala ovu varijantu u heterozigotnom obliku i u TT, dok je jedan imao u homozigotnom (178). Ova varijanta se nalazi u 3' netranslatirajućem delu na poziciji endonukleolitičkog sečenja i poliadenilacije pre-iRNK (134). Njeno prisustvo omogućava bolje prepoznavanje mesta sečenja čime se povećava obrada i akumulacija iRNK i posledično sinteza proteina (184). U populacijama evropskog porekla prevalenca varijante je od 0,7% do 4%, sa prosekom oko 2%, pri čemu je u Evropi najveća u južnoj Evropi (3%), a najmanja u severnoj (1,7%) (185). Učestalost ove varijante u hrvatskoj populaciji je oko 6% kod zdrave populacije i oko 4% kod bolesnika sa VTE (186). Prema rezultatima jedne studije iz Nemačke heterozigotni nosioci ove varijante imaju manji rizik od razvoja KRK u odnosu na nenosiocice (187). Autori studije su postavili hipotezu da bi to mogla biti posledica dozno-zavisnog uticaja trombina. Naime, blago povećanje nivoa trombina kod heterozigotnih nosilaca bi moglo ispoljiti protektivno dejstvo. Pokazano je da niže koncentracije trombina (~40 pM) indukuju PAR-1 zavisnu aktivaciju receptora S1P<sub>1</sub>, što pokreće signalizaciju koja ojačava endotelnu barijeru i smanjuje njenu propustljivost (188). Autori su smanjeni rizik od razvoja KRK uočili i kod heterozigotnih nosilaca varijante FV Leiden, koja predstavlja najveći faktor za razvoj nasledne trombofilije, a dovodi do povećane produkcije trombina kroz smanjenu inaktivaciju FVa (189). Pokazano je da heterozigotni nosioci FV Leiden pokazuju bolje preživljavanje i u drugim inflamatornim stanjima poput sepse (190), pa bi isti fenomen mogao važiti i za heterozigotne nosiocice FII G20210A.

Varijanta FII A19911G je detektovana kod 40,8% bolesnika iz ove studije u heterozigotnom obliku i kod 24,7% u homozigotnom obliku (178). Ova varijanta se nalazi u poslednjem intronu gena za protrombin i njeno prisustvo dovodi do efikasnijeg isecanja poslednjeg introna, zbog čega dovodi do blagog povećanja u ekspresiji protrombina (182,191). Takođe, pokazano je da dodatno povećava rizik od tromboza kod nosilaca varijante FII G20210A (191). U literaturi nema podataka o učestalosti varijante u hrvatskoj populaciji. U srpskoj populaciji učestalost varijante u zdravoj populaciji je 50% za heterozigotne nosioce i 18,3% za homozigotne nosioce varijante (192). Učestalost varijante je slična i u drugim evropskim populacijama (Holandija 48,9% i 24,4%, Nemačka 50,1% i 22,8%) (193,194). Iako u literaturi nema podataka o ovoj varijanti kao faktoru rizika kod karcinoma, njen doprinos bi se mogao ogledati u tome što dovodi do povećanog rizika od tromboza kod nosilaca drugih naslednih trombofilnih faktora.

U ovom delu studije, varijanta FII c.1824C>T je detektovana kod samo jednog bolesnika, u heterozigotnom obliku (178). Ovo je takođe i prvi put da je varijanta detektovana u hrvatskoj populaciji. Ova varijanta se nalazi u poslednjem egzonu gena za protrombin i po tipu je sinonimna, odnosno ne dovodi do zamene aminokiseline u protein. Međutim, *in vitro* esejima je utvrđeno da ova varijanta dovodi do 1,64 puta povišene ekspresije protrombina u odnosu na WT, ali sam mehanizam ovog fenomena još nije u potpunosti razjašnjen (183). Iako do sada nije ispitivana kao faktor rizika za razvoj karcinoma, pokazano je da može biti potencijalni faktor rizika za idiopatske trombofilije (195). Pokazano je da čak do 10% bolesnika sa idiopatskim trombozama dobija dijagnozu malignog oboljenja, najčešće tokom prvih godinu dana od trombotičkog događaja, a rizik višestruko raste ukoliko su tromboze ponovljene (196).

Analiza genotipa je pokazala da četiri bolesnika poseduju različite genotipove u TT u odnosu na NOT, i to heterozigotnog genotipa u NOT, a homozigotnog u TT, za varijante FII G20210A i FII A19911G (Tabela 9) (178). Postavlja se pitanje da li bi ovo moglo biti posledica gubitka heterozigotnosti, koja je mogla biti i deo procesa transformacije tkiva u maligno, ili je posledica *de novo* mutacije. Jedna od čestih odlika maligniteta je gubitak heterozigotnosti, i maligni tumori kolona, dojke, pankreasa ili prostate mogu pretrpeti gubitak oko 25% alela prilikom formiranja (197). Gubitak heterozigotnosti u regionu dugog i kratkog kraka hromozoma 11, gde se nalazi gen za protrombin na poziciji 11p11.2, je prethodno opisan kod KRK (198,199), ali informacija o gubitku heterozigotnosti u genu za protrombin nema.

Da bi bar delimično odgovorili na ovo pitanje uzorak NOT obolelog, kod koga je detektovan različit genotip između TT i NOT za varijante FII G20210A i FII A19911G, korišćen je za analizu haplotipa. Odnosno, da bi se ispitalo prisustvo varijanti na pojedinačnim hromozomima, 3' kraj gena protrombin je kloniran u plazmidni vektor i dobijeni klonovi su sekvencirani. Navedena analiza je pokazala kompleksniju sliku – u 16 analiziranih klonova zabeležena su četiri haplotipa – 19911A-20210G, 19911A-20210A, 19911G-20210G i 19911G-20210A (178). Iako je u širokoj upotrebi, pogotovo u komparativnim studijama sa tumorskim tkivom, sve je više dokaza na nivou transkriptoma i proteoma da takozvano “neizmenjeno okolno tkivo”, iako morfološki naizgled zdravo, predstavlja jedinstveno međustanje između malignog i neizmenjenog tkiva. Svakako, ovo tkivo može pružiti informacije o ranim događajima u nastanku tumora, kao i o uticaju tumora na okolna tkiva (200,201).

Prema dosadašnjim podacima, ovo je prvi put da su upoređivani genotipovi u 3' kraju gena za protrombin u TT i NOT kod obolelih od KRK (178). Svakako, opsežnije studije na većoj grupi ispitanika bi mogle ponuditi preciznije odgovore na pitanja o značaju 3' kraja gena za protrombin u razvoju KRK, kao i doprineti razumevanju mehanizama ekspresije protrombinskog gena u malignom tkivu.

Napredak u metodama sekvenciranja, zajedno sa redukcijom cene i povećanom dostupnošću, omogućio je veliki napredak u oblasti istraživanja različitih oboljenja, uključujući i malignih (202). Primenom različitih RNASeq tehnologija moguće je sekvencirati i analizirati celokupni transkriptom, kako pojedinačnih ćelija, tako i celih tkiva, čime se dobija uvid u prostorno-vremensku dinamiku profila ekspresije od interesa (203). Zahvaljujući FAIR (eng. *Findable, Accessible, Interoperable and Reusable*,

FAIR) principima postupanja sa podacima, digitalni rezultati dobijeni ovakvim pristupom bivaju dostupni široj naučnoj zajednici čime se omogućava ponovna analiza ovih podataka kako bi se odgovorilo na novo istraživačko pitanje (204). U okviru ove disertacije korišćeni su i dva tipa javno dostupnih podataka transkriptoma: 1. Podaci dobijeni sekvenciranja transkriptoma tumorskog tkiva KRK i neizmenjenog okolnog tkiva i 2. Podaci dobijeni primenom prostorne transkriptomike na presecima tkiva KRK.

Za ispitivanje diferencijalne ekspresije u TT u odnosu na NOT izabran je set gena prikazan u Tabeli 10. Pored protrombina, čija genska ekspresija je ispitivana korišćenjem različitih pristupa u ovoj disertaciji, analizirana je ekspresija gena za sva četiri PAR receptora i fibrinogen. Navedeni geni su odabrani zato što kodiraju za ciljne molekule trombina. U analizu je ušlo 120 parova uzoraka TT i NOT obolelih od KRK (172). Analiza diferencijalne ekspresije odabranog seta gena, pokazala je značajno povećanje ekspresije gena za PAR-1 i PAR-3, odnosno smanjenje ekspresije gena za PAR-2 i PAR-4 u TT. Veći broj studija je potvrdio povećanu ekspresiju PAR receptora, pogotovo PAR-1, u više tipova malignih tumora (106). Takođe, u ovoj disertaciji je potvrđena i ekspresija PAR-1 receptora *in vitro* na RNK nivou kod ćelija KRK, što je dodatna potvrda i postojećih podataka iz literature (108). Na modelu metastatskog melanoma je pokazano da gubitak ekspresije AP-2 regulatornih proteina transkripcije rezultira povećanjem ekspresije PAR-1 receptora, što pozitivno doprinosi metastatskom fenotipu (205). Porodica regulatornih proteina transkripcije AP-2 vrši ulogu u regulaciji genske ekspresije prilikom embrionalnog razvika i diferencijacije ćelija (206). U kontekstu KRK, pokazano je da član ove porodice AP-2 $\alpha$  vrši ulogu tumor-supresora kroz vezivanje za APC protein i negativnu regulaciju signalizacije sa  $\beta$ -katenina (207). Takođe, njegova ekspresija može biti smanjena u naprednijim stadijumima KRK (208), pa bi to možda moglo imati efekta na povećanu ekspresiju PAR-1 receptora koja je uočena u analiziranim podacima transkriptomike. Pokazano je i da trombin može stimulisati povećanje ekspresije gena za PAR-1 u endotelnim ćelijama upravo kroz signalizaciju pokrenutu sa postojećih PAR-1 receptora (209), što potencijalno ukazuje da trombin može regulisati osetljivost ćelija na svoje prisustvo i signalizaciju. PAR-3 receptor može formirati heterodimere sa receptorom PAR-1 i tako usmeravati njegovu signalizaciju. Vezivanje PAR-3 receptora dovodi po favorizovanju signalizacije sa subjedinice  $G\alpha_{13}$  i pokreće signalne puteve koji vode ka disfunkciji endotelne barijere (210). Disfunkcija endotelne barijere je bitan faktor koji doprinosi formiranju proinflamatorne sredine, kao i metastaziranju tumorskih ćelija (211), pa bi uočeno povećanje nivoa ekspresije PAR-3 u podacima transkriptomike moglo biti objašnjeno njegovim doprinosom u ovim procesima. Prema rezultatima dosadašnjih studija, ekspresija PAR-2 receptora je povišena u IBD i KRK, i promovise progresiju ovih oboljenja (212,213). Ipak, na modelu 3D sferoida poreklom od neizmenjenih ćelija kolona ili tumorskih (Caco-2), pokazano je da aktivacija receptora PAR-1 dovodi do rasta broja i veličine sferoida, dok aktivacija receptora PAR-2 dovodi do smanjenja. Takođe, u sferoidima sa utišanom ekspresijom gena za PAR-2 detektovan je veći broj ćelija pozitivnih na Ki-67, što ukazuje da su aktivni u deobi. Međutim, takođe je uočeno da aktiviranje PAR-2 receptora inhibira apoptozu posredovanu kaspazom 3 (214). Mada dobijeni rezultati pokazuju da je ekspresija gena za PAR-4 smanjena u TT, dostupni literaturni podaci pokazuju da je ekspresija ovog receptora povećana u uzorcima KRK (215). Geni za receptore PAR-1, PAR-2 i PAR-3 se nalaze klasterovani na hromozomu 5 (5q13), dok se gen za receptor PAR-4 se nalazi na hromozomu 19 (19p12) (216). Zbog blizine gena za prva tri receptora, pretpostavlja se da bi mogli deliti regulatorne elemente. Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da se regulacija ekspresije gena za PAR najčešće vrši na transkripcionom nivou, i da status metilacije promotora može imati važnu ulogu (217). Regulacija metilacije DNK, i u smeru hipermetilacije i u smeru hipometilacije, jedan je od ključnih epigenetičkih mehanizama u procesu kancerogeneze (218).

Prikazani rezultati diferencijalne ekspresije i podaci o ekspresiji i aktivaciji PAR receptora iz literature ukazuju da ekspresija i uloga PAR receptora zavise od konteksta, odnosno od ćelijskog tipa, od

izloženosti ligandu i trajanja aktivacije, kao i vezivanja kofaktora, što se ogleda i u broju signalnih puteva koje pokreću i procesa koje regulišu (219). Uzevši u obzir navedeno, ekspresija i aktivacija PAR receptora mora biti posmatrana u širem kontekstu od samog prisustva trombina koji bi ih mogao aktivirati, a samim tim i efekti koje bi trombin preko njih ostvario mogu biti različiti.

Podaci RNASeq analize ukazuju da ekspresija protrombina i fibrinogena na RNK nivou nije povećana u odnosu na neizmenjeno tkivo. Fibrinogen je gliko-protein ključan za proces koagulacije i sastoji se iz tri subjedinice –  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , svake kodirane zasebnim genom. Sva tri gena se nalaze klasterovani na kratkom kraku hromozoma 4 (4q23-q32). Regulacija ekspresije gena je usaglašena tako da se sintetiše ujednačen nivo sve tri subjedinice istovremeno (220). Rezultati ove studije pokazuju da su povećane ekspresije za  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinicu fibrinogena, dok ekspresija gena za  $\gamma$  subjedinicu nije značajno izmenjena. Ovo bi moglo biti objašnjeno time što tokom procesa tumorigeneze može doći do gubitka koordinisane ekspresije gena koji se inače ekspimiraju usaglašeno (221).

Regulacija ekspresije se može vršiti i na post-transkripcionom nivou, a ne samo kroz promenu efikasnosti transkripcije tako da detektovana diferencijalna ekspresija na nivou RNK ne znači i razliku u količini raspoloživih proteina i obrnuto (222). Prema jednoj od hipoteza, u proinflamatornim stanjima povećana ekspresija protrombina se reguliše pomoću kinaze p38 koja stimuliše uspešniju obradu pre-iRNK za protrombin (134). Kako bi se detaljnije ispitala razlika u ekspresiji izabranih gena, potrebno je analizu uraditi i na proteinskom nivou.

Velika heterogenost oboljenja kao što je KRK predstavlja izazov u njegovom istraživanju i lečenju. Heterogenost KRK se ogleda na više nivoa, prvenstveno u lokaciji primarnog tumora (223). Dodatno, kombinacija višegodišnje akumuliranih genetičkih i epigenetičkih promena čini svaki tumor jedinstvenim, a navedeni faktori se mogu koristiti za prognozu toka bolesti i odgovora na terapiju. Veliki izvor heterogenosti je i transkripcioni profil ćelija u samom tumoru. Prostorna i vremenska promenljivost tumorskog mikrookruženja može voditi do promenljivih ekspresionih profila u istom tipu tumora kod različitih bolesnika (inter-tumorska varijabilnost) kao i do promenljivog ekspresionog profila unutar istog tumora (intra-tumorska varijabilnost) (224–226).

Kako bi se preciznije odredila ekspresija gena od interesa na nivou tumora, obrađeni su dostupni rezultati prostorne transkriptomike na preseku tkiva KRK (173). Metodom prostorne transkriptomike moguće je lokalizovati ćelije na preseku tkiva i mapirati ekspresiju gena na njih (227). Analiza je izvršena na jednom od dostupnih preseka KRK. Presek je napravljen od tumora stadijuma III-B, iz sigmoidalnog dela debelog creva muške osobe starosti 60 godina (173). Sigmoidalni kolon pripada distalnom delu kolona. Karcinomi u ovom regionu češće pogađaju muškarce i karakteriše ih CIN mehanizam (142). Stadijum III-B znači da se tumor proširio do spoljašnjeg zida creva i zahvatio okolne limfne čvorove (144). Rezultati anotacije ćelijskih tipova ukazuju na prisustvo dva molekulska podtipa KRK (CMS2 i CMS3), kao i većeg broja imunskih ćelija i ćelija strome (173). CMS2 i CMS3 podtipovi su međusobno slični i dele “epitelni potpis”, odnosno transkripcioni profil je regulisan signalima iz samih tumorskih ćelija (228). CMS2 podtip (kanonski) karakteriše visok nivo CIN i ekspresija Wnt i gena čija je ekspresija regulisana preko MYC proteina. CMS3 podtip (metabolički) karakteriše umeren nivo CIN i mutacije u *KRAS* genu, kao i promene u metaboličkim putevima (229). Analizom zbirne ekspresije gena od interesa uočava se da je ekspresija izraženija u regionu tkiva koji je anotiran u CMS2 i CMS3 ćelije (tamno crvene tačke, slika 9B). Posmatrajući pojedinačno ekspresiju gena od interesa, uočava se ravnomerna ekspresija protrombina i fibrinogena kroz posmatrani presek tkiva KRK, odnosno, ne postoji prostorna heterogenost u nivou ekspresije. S druge strane, ekspresija PAR receptora pokazuje lokalizovane oblasti više ili niže ekspresije gena (crvene tačke su oblasti povišene ekspresije, a plave niže ekspresije slike 10-17), i to u regionima CMS2 i CMS3 grupa ćelija. Iako rezultati analize diferencijalne ekspresije između TT i NOT ukazuju da dolazi do promena u ekspresiji PAR receptora, oni su dobijeni sekvenciranjem transkriptoma

celokupnog tkiva, koje se sastoji od većeg broja različitih ćelija. Rezultati prostorne transkriptomike nam pokazuju da se najveća promena može dešavati baš u samim tumorskim ćelijama. Navedeni rezultati mogu ukazati na to da bi kroz regulaciju distribucije PAR receptora i fibrinogena mogao biti regulisan i efekat trombina na procese unutar samog tumora. Dodatno, treba uzeti u obzir da je analiza prostorne transkriptomike urađena na samo jednom preseku tumora, dok je KRK veoma heterogeno oboljenje. Takođe, sam transkriptom ćelije je dinamičan i promenljiv, i daje informaciju o ekspresionom profilu ispitivanog uzorka u samom momentu uzorkovanja (230). Za pouzdaniju analizu ekspresije trebalo bi sprovesti opsežnija ispitivanja, koja bi uključila uzorke od različitih molekulskih podtipova KRK, kako bi se mogao proceniti značaj ekspresije protrombina, kao i fibrinogena i PAR receptora, u različitim uslovima.

Drugi deo istraživanja u ovoj disertaciji obuhvatio je *in vitro* studije na modelu permanentnih ćelijskih linija KRK. Odabrane su ćelijske linije Caco-2, SW480, SW620, HCT116 i HT29. Prema rezultatima prethodnih istraživanja, navedene linije pripadaju različitim stadijumima KRK (podela po Dukes-u), a dodatno SW480 i SW620 su primarna i metastatska linija poreklom iz istog bolesnika (171). Prethodni rezultati Grupe za molekularnu biologiju hemostaze su pokazali da dolazi do ekspresije protrombina u Caco-2 liniji kao modelu KRK, dok u modelima glioblastoma i karcinoma dojke ekspresija nije detektovana (131). Prema dobijenim rezultatima u okviru ovog istraživanja, sve ispitivane ćelije KRK ekspimiraju protrombin na RNK nivou, ali ne podjednako. Analizom ćelijskog lizata i medijuma potvrđeno je prisustvo proteina kod svih ćelijskih linija (179). Prethodna istraživanja su pokazala da se u ekstraćelijskim mikrovezikulama SW620 linije detektuje prisustvo trombina. Dodatno, dejstvom ovih vezikula na SW480 ćelije je stimulisana njihova promena fenotipa u ameboidnu formu, koja je povezana sa procesima invazije i metastaze (231). S obzirom da primenjene ćelijske linije KRK ekspimiraju protrombin, dalja istraživanja su potrebna da bi se ispitao tačan mehanizam koji reguliše njegovu ekspresiju u ovim ćelijama. Prepoznavanje konteksta u kome se indukuje ekspresija protrombina u tumorskom tkivu može dovesti do uspostavljanja protrombina kao biomarkera za razviće i napredovanje bolesti. U prilog ovome idu nalazi da se peptidni fragmenti protrombina nalaze u značajno višoj koncentraciji u serumu obolelih od KRK u odnosu na zdrave ispitanike (232).

Koncentracije trombina i protrombina u tumorskoj mikrosredini i dalje nisu poznate. Takođe, potencijalni efekti protrombina kao primarno neaktivne forme do sada nisu ispitani. Kako bi se to ispitalo, ćelije su tretirane različitim koncentracijama protrombina. Dobijeni rezultati pokazuju da prisustvo protrombina u koncentracijama višim od fiziološke (0,1 mg/mL) dovodi do inhibicije vijabilnosti i proliferacije svih ćelijskih linija koje su korišćene (179). Međutim, u određenim ćelijskim linijama poput SW480 i SW620, uočava se i odgovor na glicerol kao kontrolu za efekat rastvarača za protrombin, zbog čega se kod njih inhibični efekat ne može jednoznačno pripisati protrombinu (179). Sličan odgovor ove dve ćelijske linije može biti posledica toga što obe potiču od istog obolelog. Glicerol može imati dozno zavisani inhibični efekat na proliferaciju nekih ćelija preko mehanizama koji uključuju zastoj u G1 fazi ćelijskog ciklusa i indukciju programiranog ćelijskog umiranja po tipu apoptoze (233,234). Međutim, različit odgovor KRK ćelija na tretman glicerolom u ovom slučaju ostaje nerazjašnjen. Fiziološka koncentracija protrombina i koncentracija niža od fiziološke nisu ostvarile efekat na proliferaciju, izuzev kod SW480 linije, gde nakon 48 h tretmana i fiziološka koncentracija pokazuje inhibični efekat (179). Iako su istog porekla, kod SW620 se ovaj efekat ne uočava, pa razlika možda potiče od toga što su izolovane sa različitih lokacija, tj. iz primarnog tumora i metastaze, koje iako istog porekla, mogu posedovati genomske razlike (235).

Iako su sve ćelijske linije odgovorile inhibicijom vijabilnosti i proliferacije na tretman protrombinom, samo je Caco-2 ćelijska linija pokazala odgovor na tretman u eseju zarastanja povrede.

Protrombin je ispoljio značajan inhibitorski efekat na migraciju ovih ćelija, u poređenju sa netretiranim i ćelijama tretiranim kontrolom nosača, u obe vremenske tačke (179).

Prema podacima studije Sveen i autora, 2018. (236), grupisanjem različitih ćelijskih linija u CMS podtipove, sve ispitivane ćelijske linije pripadaju CMS4 podtipu, osim HT29, koja pripada podtipu CMS3. Od svih linija samo su HCT116 ćelije povezane sa MSI mehanizmom i jedine ne nose mutaciju u *TP53*, dok ostale nose i povezane su sa CIN mehanizmom (236). SW480 i SW620 nose i mutacije u genima KRAS i BRAF, a HT29 pored navedenih nosi mutacije i u genima PIK3CA i PTEN (236). CMS4 ili "mezenhimski" podtip karakteriše transkripcioni profil povezan sa EMT i remodelovanjem vanćelijskog matriksa (237), kao i povećanje aktivacije TGF $\beta$  puta (238). Trombin može dovesti do aktivacije TGF $\beta$ , preko PAR-1 i ROCK signalizacije (239). Pokazano je da TGF $\beta$  ima ulogu tumor-supresora u neizmenjenim ćelijama i u ranim stupnjevima transformacije ćelije, ali nakupljanjem promena tokom transformacije ćelije u malignu i njegova uloga se menja (240). Ova pojava se naziva "TGF $\beta$  paradoks" (241). U neizmenjenim ćelijama, TGF $\beta$  može inhibirati proliferaciju i migraciju, mada efekat može zavisiti od konteksta koji utiče na signalizaciju (242). Uzevši u obzir dobijene rezultate i literaturne podatke, dalje ispitivanje efekta protrombina na ćelije bi moglo biti usmereno na analizu TGF $\beta$  signalizacije.

S obzirom da su Caco-2 ćelije pokazale odgovor na oba prethodno primenjena eseja, odabrane su za dalje ispitivanje efekata na procese angiogeneze. Medijum sa ovih ćelija, prikupljen nakon tretmana protrombinom, je iskorišćen za tretmane endotelnih ćelija EA.hy926. Endotelne ćelije oblažu lumen krvnog suda i njihove osobine poput proliferacije, migracije i degradacije vanćelijskog matriksa utiču na uspešnost procesa angiogeneze, koji je jedan od ključnih procesa u propagaciji tumora. U *in vitro* uslovima različiti procesi uključeni u angiogeni potencijal mogu biti ispitani (243), a u ovom istraživanju ispitani su procesi proliferacije i migracije endotelnih ćelija. Uočava se da dolazi do povećane proliferacije ćelija tretiranih medijumima od 24h koje sadrže protrombin, međutim nakon tretmana medijumima od 48h efekat je suprotan. Takođe, nakon tretmana sa obe grupe medijuma dolazi do inhibicije migracije ćelija tretiranih medijumima koji sadrže protrombin. Uzevši to u obzir, nije u potpunosti razjašnjeno da li je uočeni odgovor ćelija posledica dejstva samo protrombina ili efekta ima i to što medijum potiče sa Caco-2 ćelija. S druge strane, kod ćelija tretiranih kontrolnim kondicionim medijumima dolazi do povećane proliferacije i migracije u odnosu na netretirane ćelije, što ukazuje da same Caco-2 ćelije imaju stimulatívni efekat na proces angiogeneze.

Potvrđeno je da protrombin može prepoznati i vezati se za receptor RAGE (eng. *Receptor for Advanced Glycation End Products*, RAGE) (244). RAGE je receptor za veći broj liganada, prisutan je na membrani većeg broja ćelija i povezan je sa razvojem različitih inflamatornih oboljenja (245). Prisustvo ovog receptora je povezano i sa proliferacijom i migracijom ćelija KRC (246). Protrombin vezuje RAGE preko Gla domena, koji je važan za aktivaciju protrombina, tako da je ovim vezivanjem njegova aktivacija u trombin onemogućena, odnosno protrombin u svojoj neaktivnoj formi aktivira ovaj receptor (244), što može biti predmet daljih ispitivanja.

Prethodne studije su utvrdile prisustvo fragmenta F1+2 u uzorcima KRC obolelih, indirektno ukazujući na aktivaciju protrombina u tkivu tumora (169). Međutim, direktnih potvrda o akumulaciji i aktivaciji protrombina nema. Kako bi se ispitala mogućnost aktivacije protrombina u trombin od strane ćelija KRC u kulturi, iskorišćena su tri pristupa. Prvo, medijumi ćelija tretiranih protrombinom u finalnoj koncentraciji 0, 1 mg/mL su ispitani ELISA esejom za fragment F1+2. Ovaj peptid je nusproizvod aktivacije i može biti indirektni pokazatelj da je do nje došlo. Prisustvo F1+2 je detektovano u medijumima svih tretiranih ćelija, što indirektno ukazuje da sve linije mogu aktivirati protrombin u određenoj količini. Dalje, lizati i medijumi Caco-2 linije su korišćeni za ispitivanje prisustva protrombina i trombina u lizatima i medijumu tretiranih ćelija metodom *Western Blot (WB)*. Ovom prilikom korišćena su dva

primarna antitela: antitelo koje prepoznaje i vezuje trombin (F1), i antitelo koje prepoznaje i vezuje protrombin, ali ne i trombin (5G9). Dobijeni rezultati WB analize ukazuju da je u lizatu i medijumu tretiranih ćelija prisutno više različitih međuforni aktivacije protrombina, od kojih je najdominantnije prisutna forma koja na osnovu veličine odgovara formi pretrombin-2, kao i da u medijumima ima trombina, dok ga u lizatima nema. U uzorcima medijuma se uočava i traka koja bi mogla da odgovara formi pretrombin-1, koja se dobija isecanjem protrombina na poziciji R155, i veća je od forme pretrombin-2 za Kringl2 domen. Pretrombin-2 je međuforna enzima koja se dobija isecanjem proenzima na mestu R271, čime se dobija protein približne molekulske mase kao i trombin, sa spojenim A i B lancem, čijim se proteolitičkim razdvajanjem dobija  $\alpha$ -trombin (61). Treća analiza podrazumevala je merenje aktivnosti trombina primenom fluorescentnog supstrata. Unutar bunarića sa komercijalnim trombinom i bunarića sa medijumima tretiranih ćelija detektovan je signal supstrata, što ukazuje da u njima ima aktivnog enzima, dok je signal u uzorcima lizata i čistog protrombina izostao. Da li je i na koji način aktivacija protrombina posredovana ćelijskim proteazama ostaje da bude detaljnije ispitano. Rezultati dosadašnjih studija pokazuju da je na membrani aktiviranih krvnih pločica put aktivacije protrombina preko forme protrombina-2 dominantniji u odnosu na put preko proteolitički aktivne međuforme meizotrombina. Pretpostavlja se da bi razlog za ovo mogla biti optimizacija prokoagulantne aktivnosti krvnih pločica kroz ograničavanje aktivnosti meizotrombina, i regulacija balansa hemostaze (247). Uzevši ovo u obzir, postavlja se pitanje da li bi način regulacije nivoa trombina u tumorskoj mikrosredini mogao biti upravo kroz kontrolu aktivacije preko međuforme pretrombina-2.

Pošto su Caco-2 pokazale najveći odgovor na tretman protrombinom, odabrane su za ispitivanje promene genske ekspresije nakon tretmana. Analizom rezultata qPCR-a uočava se postojanje trenda u smanjenju ekspresije gena za protrombin i PAR-1 na RNK nivou. S druge strane, na proteinskom nivou detektovano je više protrombina, ili različitih međuforni, u lizatu tretiranih ćelija. Ovo može biti rezultat vezivanja ili internalizacije egzogenog protrombina, za šta su potrebne dodatne eksperimentalne potvrde.

Analizom rezultata dobijenih metodom RNASeq pokazano je da je ekspresija PAR-1 receptora značajno smanjena kod ćelija tretiranih protrombinom, dok je ekspresija PAR-2 povećana, pri čemu je efekat tretmana bio izraženiji nakon dužeg tretmana, odnosno značajniji je na 48 h. Sa druge strane, između uzoraka netretiranih ćelija i ćelija tretiranih glicerolom nije detektovana razlika u ekspresiji, što ukazuje da razlike zabeležene u uzorcima protrombinom tretiranih ćelija oslikavaju efekat protrombina. Navedeni rezultati ukazuju na selektivnu regulaciju ekspresije gena PAR receptora kroz vreme. Ispitivanjem procesa zarastanja epitelne povrede na modelu Caco-2 ćelija, pokazano je da aktivacijom PAR-2 receptora dolazi do inhibicije migracije ćelija (248), što bi moglo delimično objasniti smanjenu migraciju Caco-2 i u ovom slučaju.

Radi boljeg razumevanja procesa koji se dešavaju tokom trajanje tretmana, upoređeni su rezultati RNASeq-a od 24 h i 48 h tretmana u okviru istih grupa tretmana, kroz GSEA metodu. U okviru grupe ćelija koje su 24h i 48h stajale u medijumu bez tretmana (obeležene kao N) i grupe ćelija tretiranih glicerolom uočava se nakon 48 h tretmana smanjenje ekspresije gena čiji su produkti uključeni u procese obrade RNK i translaciju, kao i procese regulacije ćelijskog ciklusa i metabolizma. U uzorcima netretiranih ćelija na 48h uočava se pomak ka procesima vezanim za regulaciju autofagije, vezikularnog transporta i organizacije citoskeleta (kroz negativnu regulaciju lokomocije i zarastanja rana). U uzorcima ćelija tretiranih glicerolom na 48 h uočava se pomak ka procesima pakovanja vezikula, i smanjenje procesa uključenih u savijanje proteina i sklapanje proteinskih kompleksa. Smanjenje navedenih procesa u obe grupe ćelija ukazuje na ulazak ćelija u mirovanje, što bi moglo biti posledica potrošnje nutrijenata iz medijuma nakon 48 h. Na modelu MDA-MB-231, HeLa i HepG2 ćelijske linije je pokazano da deplecija različitih nutrijenata dovodi do smanjene proliferacije, povećanog oksidativnog stresa, disfunkcije

mitohondrija, inhibicije migracije, a u nekim slučajevima do formiranja autofagnih vakuola (249), što bi moglo objasniti pomak ka procesima vezanim za vezikularni transport (250).

U uzorcima ćelija tretiranih protrombinom tokom 48h uočava se pomak u manjoj meri ka procesima uključenim u regulaciju ćelijskog ciklusa i odgovor na nepravilno savijene proteine, a u većoj meri ka regulaciji translacije i vezikularnog transporta. Trombin može preko PAR receptora stimulisati povećanje sinteze ekstracelularnih vezikula i obogaćivanje njihovog sadržaja (251). To bi moglo objasniti uočene efekte i ovde, pošto je aktivni trombin detektovan u medijumu ovih ćelija.

Poređenjem dobijenih rezultata nakon tretmana fiziološkom koncentracijom protrombina, sa prethodno objavljenim podacima o stimulativnom dejstvu trombina na različite procese koji dovode do progresije tumora, može se pretpostaviti da je regulacijom nivoa protrombina i trombina u tumorskom mikrookruženju regulisan i njihov stimulativni odnosno inhibicioni efekat na ćelije.

Česta komplikacija kod obolelih od maligniteta jeste pojava tromboza. Standardna terapija za tretiranje tromboza kod obolelih je LMWH. Takođe, direktni oralni antikoagulansi, čiji je razvoj doveo do značajnog pomaka u lečenju tromboza, sve više nalaze svoju primenu u terapiji bolesnika sa malignitetom. Svakako, dužina trajanja i doza primenjene terapije zavisi od balansa između ponavljanja tromboza kod obolelih i rizika od krvarenja, stoga je za svakog obolelog potrebno utvrditi njemu odgovarajuću terapiju (252).

Strategije u lečenju malignih bolesti koje su najviše u primeni su hirurško odstranjivanje tumora, hemio i radio terapija, imuno terapija, ili kombinacija navedenih. I pored toga, bolesnici mogu ispoljiti različite neželjne efekte, poput razvića rezistencije na lekove. Dodatno, ne reaguje svaki pacijent podjednako efikasno na primenjenu terapiju (253). Strategija koja dobija na značaju je prenamena postojećih lekova, u cilju lečenja malignih oboljenja. Prednost ovog pristupa je prvenstveno u smanjenju vremena i cene procesa razvijanja terapije, jer se koriste supstance koje su već prošle potrebne protokole za kliničku primenu. Takođe, razvijaju se inovativne tehnologije, poput upotrebe nanopartikula koja bi omogućila isporuku i primenu leka u tumoru (254). Zbog svog efekta u inhibiciji trombina, otvara se pitanje primene dabigatrana kao terapeutika za lečenje malignih bolesti.

Kako bi se ispitao efekat trombina, kao i njegovog inhibitora dabigatrana na ponašanje ćelija KRK *in vitro*, korišćeni su eseji vijabilnosti i proliferacije, i migracije ćelija. Dabigatran se reverzibilno vezuje za aktivno mesto trombina, čime ometa njegovu funkciju. U terapiji se koristi u formi leka dabigatran eteksilata (DE), koji se u organizmu prevodi u aktivnu formu dabigatrana pomoću enzima karboksilesteraza 1 i 2 (255). Za potrebe eksperimenata u ovoj disertaciji korišćena je komercijalno dostupna aktivna forma. Primenjene koncentracije tretmana su određene na osnovu literature (115). Kako je potvrđeno da dabigatran ne ostvaruje citotoksičan efekat na ćelije, ispitano je da li može da inhibira efekte trombina. Od svih ispitivanih ćelija, odgovor je uočen samo kod HCT116 ćelijske linije. Prilikom tretmana, trombin je stimulisao proliferaciju ovih ćelija, dok je dabigatran ovaj efekat poništio. Odgovor samo ove linije je opravdan, s obzirom da ima višestruko veću ekspresiju PAR-1 receptora na RNK nivou u odnosu na ostale linije. Međutim, odgovor ćelija u eseju za ispitivanje migracije je izostao kod svih linija. Prema dosadašnjim rezultatima, tretman HCT116 i HT29 ćelija trombinom u koncentraciji od 10 nmol/L (~ 1 U/mL) dovodi do pokretanja Ca<sup>2+</sup> posredovane signalizacije, kroz aktivaciju PAR-1. Dodatno, kroz aktivaciju Raf-MEK-ERK kaskade, trombin stimuliše proliferaciju HT29 ćelija (108). Na modelu SW480 linije pokazano je da trombin stimuliše *in vitro* adheziju ovih ćelija za fibronektin i endotelne ćelije, kroz aktivaciju protein kinaze C (eng. *Protein Kinase C*, PKC) i povećanu ekspresiju integrina β3 na površini ćelija, kao i da stimuliše proliferaciju (256). Međutim, ono što je u ovim studijama uočeno je da veća koncentracija trombina (> 5 U/mL) dovodi do izostajanja navedenih efekata. Ovakav nalaz je u skladu sa hipotezom da u zavisnosti od koncentracije, trombin može imati dualnu ulogu. Naime, pokazano je na ćelijskom *in vitro* modelu neurona (257), kao i nekoliko vrsta karcinoma (258), da niske

koncentracije trombina u opsegu 0,1 – 0,5 U/mL (1-5 nmol/L) dovode do stimulacije ćelijske proliferacije, dok veće koncentracije u opsegu 0,5 – 1 (5-10 nmol/L) dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i apoptoze. Inhibitorni efekti trombina u višim koncentracijama bi mogli objasniti i uočene inhibitorne efekte tretmana protrombinom, s obzirom da je ispitivanje aktivacije pokazalo prisustvo trombina u medijumu tretiranih ćelija. U literaturi ima vrlo malo podataka o ispitivanju uticaja dabigatrana na *in vitro* modelu ćelijskih linija KRK. U studiji iz 2023. godine Rees i sar. su ispitali efekat trombina na SW620 ćelijskoj liniji, ali u koncentracijama višestruko većim od primenjenih u ovoj studiji (10 U/mL), kao i dužem trajanju tretmana (do 96 h) (259). Pokazali su da trombin stimuliše proliferaciju i migraciju ovih ćelija, kao i da dabigatran primenjen u koncentraciji od 0,5  $\mu$ M taj efekat inhibira. Primenom manjih koncentracija (0,1 U/mL – 1 U/mL) ovaj efekat nije zabeležen, što je u skladu i sa rezultatima ove disertacije. Dodatno, po podacima iz prethodnih istraživanja (108), ali i na osnovu rezultata ove disertacije, SW620 ćelijska linija pokazuje manju ekspresiju PAR-1 receptora u odnosu na ostale ispitivane linije. Međutim, u gore navedenoj studiji primećeni efekat trombina nije zabeležen na liniji DLD-1 koja je takođe poreklom od KRK (259). Svakako, primena većih koncentracija trombina i dužina trajanja tretmana bi mogla objasniti stimulatívni efekat trombina koji je u toj studiji dobijen, a u ovoj izostao.

Kako bi se utvrdio potencijalni *in vivo* efekat trombina, kao i njegovog inhibitora dabigatrana, uspostavljen je model ksenografta u embrionima zebrića. S obzirom da su na MTT testu uočeni efekti trombina i dabigatrana samo na HCT116 ćelijskoj liniji, za formiranje ksenografta iskorišćene su HCT116-GFP ćelije, koje stabilno ekspimiraju fluorescentni protein GFP što olakšava praćenje formiranja tumorske mase.

Model sistem zebriće danas spada u jedan od naznačajnijih kičmenjačkih model organizama u biomedicini. Prvenstveno uspostavljene kao model za ispitivanje razvića i genetike kičmenjaka, zebriće su zahvaljući svojim odlikama pronašle mesto u istraživanjima različitih oboljenja, kao i novih terapeutika. Visok prinos jaja prilikom mresta, transparentnost embriona, kao i nepotpuno razvijen imunski sistem, omogućio je razvoj model sistema ksenografta u embrionima zebrića, kako bi se omogućilo praćenje razvića tumora *in vivo* kao i ispitivanje efekata različitih molekula na razvoj i diseminaciju tumora (260). Takođe, zebrića je u više studija korišćena kao model za ispitivanje hemostaze i tromboze. Ona je vrlo pogodan model za ova istraživanja, jer jedinke sa poremećajima koagulacionih faktora mogu da dostignu rano odraslo doba, za razliku od sisarskih kičmenjačkih modela (261).

U okviru ove studije, embrioni zebrića su tretirani opsegom koncentracija trombina i dabigatrana koje su primenjene i na ćelijama, kako bi se utvrdilo da li utiču na razviće embriona. Kako korišćene koncentracije nisu ispoljile negativne efekte na razvoj embriona, za tretmane embriona sa ksenograftima izabrane su najveće koncentracije. Trodnevni tretman embriona sa ksenograftima nije ostvario efekat na promenu veličine tumorske mase u odnosu na netretirane zebriće ili tretirane kontrolama rastvarača. Nedostatak efekata *in vivo* u odnosu na *in vitro* model može biti posledica toga što u *in vitro* uslovima supstanca ostvaruje direktan kontakt na ćelijama, dok se u *in vivo* sistemu nalazi u vodi kojom se tretiraju embrioni. Ovo otvara potrebu za dodatnim ispitivanjima većih koncentracija trombina i dabigatrana.

Pretragom dostupne literature, utvrđeno je da su u okviru ove disertacije ksenografti KRK u embrionima zebrića po prvi put primenjeni za ispitivanje efekta trombina i dabigatrana. Prema rezultatima postojećih studija primena dabigatran eteksilata (DE, forma leka koja se u organizmu prevodi u dabigatran pomoću enzima karboksilesteraze) na embrionima zebrića dovodi do inhibicije formiranja ugruška na mestu povrede, što ukazuje da je uloga karboksilesteraze u konvertovanju leka prisutna i kod zebriće, kao i da dabigatran prepoznaje i inhibira trombin zebriće (262). Takođe, dabigatran je uspeo da inhibira toksične efekte lipopolisaharda gram negativnih bakterija na embrionima zebrića. Kako je ovaj efekat pokazan i na FII<sup>-/-</sup> embrionima, zaključuje se da je tu ulogu obavio nezavisno od svoje antikoagulantne

uloge (263). Ovo otvara nova pitanja efikasnosti i specifičnosti dabigatrana, kao i njegove primene u stanjima koja nisu vezana za regulaciju koagulacije.

*In vivo* efekat dabigatrana je ispitivan na modelu DMH (1,2-dimetilhidrazin) indukovanoj karcinoma kolona kod pacova. Kod pacova tretiranih dabigatran-eteksilatom, kao i kombinacijom DE i 5-fluorouracila (citostatik koji se često koristi u lečenju malignih oboljenja) uočen je usporen razvoj tumora, kroz inhibiciju MAPK i mTOR signalnih puteva, i inhibiciju EMT kroz povećanje ekspresije E-kadherina, odnosno smanjenje ekspresije N-kadherina (264).

Različiti odgovori ćelija na protrombin, trombin i dabigatran, kao i nivoi ekspresije PAR-1 receptora, koji su u *in vitro* uslovima detektovani u okviru ove disertacije, i u skladu su sa postojećom literaturom, ukazuju na potrebu za implementacijom personalizovanog pristupa u lečenju bolesnika. Uzevši u obzir heterogenost KKK kao oboljenja, prisutnost nusfekata, i individualno specifičnih odgovora na terapiju, potrebna su nova istraživanja u tretmanu i lečenju bolesti (253). *In vivo* model sistem ksenografta na zebricama omogućava testiranje različitih tretmana ili kombinacija tretmana na malignim ćelijama pojedinačnih bolesnika, čime se omogućava brži i jeftiniji, ali i individualizovani pristup u lečenju (265).

## 6. ZAKLJUČCI

1. Varijante u 3' kraju gena za protrombin (FII G20210A, FII A19911G i FII c.1824C>T) detektovane su kod obolelih od KRK, uz uočenu genetičku heterogenost navedenih varijanti u tumorskom i neizmenjenom okolnom tkivu.
2. U tumorskom tkivu obolelih od KRK detektovan je povećan nivo ekspresije gena za PAR-1 i PAR-3, smanjen nivo ekspresije gena za PAR-2 i PAR-4 receptore u odnosu na neizmenjeno okolno tkivo, dok je detektovani nivo ekspresije gena za protrombin i fibrinogen sličan u oba tkiva.
3. Na uzorku tkiva obolelih od KRK pokazano je da se ekspresija gena za PAR receptore primarno lokalizuje u regionima tumorskih ćelija (povezano sa CMS2 i CMS3 podtipovima), dok je ekspresija gena za protrombin prostorno uniformna na nivou celog uzorka.
4. Ispitivane permanentne ćelijske linije (Caco-2, SW480, SW620, HCT116 i HT29) poreklom od KRK eksprimiraju protrombin, i mogu da ga aktiviraju u trombin.
5. Tretman protrombinom modifikuje ekspresiju gena u ćelijama poreklom od KRK, primarno gene uključene u signalne puteve odgovora na oksidativni stres i vezikularni transport.
6. Protrombin u dozama višim od fiziološke ispoljava inhibitorne efekte na proliferaciju, a u fiziološkoj dozi i na migraciju ćelija poreklom od KRK.
7. Tretman trombinom (0,5 i 2,5 U/mL) stimuliše proliferaciju HCT116 ćelijske linije, što se može neutralisati primenom dabigatrana.
8. Na modelu embriona zebrice, trombin i dabigatran u primenjenim koncentracijama (2,5 U/mL, odnosno 1500 nmol/L) nisu ispoljili statistički značajan efekat na rast ksenografta.

## 7. LITERATURA

1. Colman RW, M. D. Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN, editors. Hemostasis And Thrombosis: Basic Principles And Clinical Practice. 5th edition. Philadelphia, Pa. London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. Science. 1964 Sep 18;145(3638):1310–2.
3. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. Nature. 1964 May;202(4931):498–9.
4. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost. 2001 Jun;85(6):958–65.
5. Morrissey JH. Plasma Factor VIIa: Measurement and Potential Clinical Significance. Pathophysiol Haemos Thromb. 1996;26(Suppl. 1):66–71.
6. Smith SA. The cell-based model of coagulation. J Vet Emergen Crit Care. 2009 Feb;19(1):3–10.
7. Yamaji-Hasegawa A, Tsujimoto M. Asymmetric Distribution of Phospholipids in Biomembranes. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2006;29(8):1547–53.
8. Senst B, Tadi P, Basit H, Jan A. Hypercoagulability. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [cited 2026 Apr 6]. Available from: NCBI Bookshelf
9. Dicks AB, Moussallem E, Stanbro M, Walls J, Gandhi S, Gray BH. A Comprehensive Review of Risk Factors and Thrombophilia Evaluation in Venous Thromboembolism. JCM. 2024 Jan 9;13(2):362.
10. Đorđević V. Molecular Basis of Thrombophilia / MOLEKULARNE OSNOVE TROMBOFILIJE. Journal of Medical Biochemistry. 2014 Jan 1;33(1):22–7.
11. Bauer KA, Nguyen-Cao TM, Spears JB. Issues in the Diagnosis and Management of Hereditary Antithrombin Deficiency. Ann Pharmacother. 2016 Sep;50(9):758–67.
12. Campello E, Spiezia L, Simioni P. Diagnosis and management of *factor V Leiden*. Expert Review of Hematology. 2016 Dec;9(12):1139–49.
13. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996 Nov 15;88(10):3698–703.
14. Gvozdencov M, Pruner I, Tomic B, Kovac M, Radojkovic D, Djordjevic V. The effect of FII c.1787G>A (prothrombin Belgrade) mutation on prothrombin gene expression in vitro. Молекул биол. 2017;(1):59–63.

15. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thrombosis Research*. 2008 Jan;122(6):736–42.
16. Bouillaud S, Bouillaud J. De l'Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et general. *Arch Gen Med*. 1823;1(2):188–204.
17. A T. Plegmasia alba dolens. Lectures on clinical medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris. 1865;5:281–332.
18. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1723–9.
19. Khorana AA. Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003 Dec;1(12):2463–5.
20. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007 Mar;5(3):632–4.
21. Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*. 2013 Sep 5;122(10):1712–23.
22. Elyamany G, Alzahrani AM, Bukhary E. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview. *Clin Med Insights Oncol*. 2014 Jan;8:CMO.S18991.
23. Falanga A, Schieppati F, Russo L. Pathophysiology: Mechanisms of Thrombosis in Cancer Patients. In: Soff G, editor. *Thrombosis and Hemostasis in Cancer* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2026 Apr 6]. p. 11–36. (Cancer Treatment and Research). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-20315-3\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-20315-3_2)
24. Wun T, White RH. Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2009 Mar;22(1):9–23.
25. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer*. 2007 Nov 15;110(10):2339–46.
26. Falanga A, Marchetti M. Anticancer treatment and thrombosis. *Thrombosis Research*. 2012 Mar;129(3):353–9.
27. Lechner D, Weltermann A. Chemotherapy-Induced Thrombosis: A Role for Microparticles and Tissue Factor? *Semin Thromb Hemost*. 2008 Mar;34(02):199–203.
28. Falanga A, Russo L. Epidemiology, risk and outcomes of venous thromboembolism in cancer. *Hamostaseologie*. 2012;32(02):115–25.

29. Cimmino G, Cirillo P. Tissue factor: newer concepts in thrombosis and its role beyond thrombosis and hemostasis. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* [Internet]. 2018;8(5). Available from: <https://cdt.amegroups.org/article/view/22002>
30. Bach RR. Tissue Factor Encryption. *ATVB*. 2006 Mar;26(3):456–61.
31. Rao LVM. Tissue factor mechanisms of decryption. *Front Biosci*. 2012;E4(4):1513–27.
32. Rousseau A, Van Dreden P, Khaterchi A, Larsen AK, Elalamy I, Gerotziafas GT. Procoagulant microparticles derived from cancer cells have determinant role in the hypercoagulable state associated with cancer. *International Journal of Oncology*. 2017 Dec;51(6):1793–800.
33. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med*. 1986 Dec 25;315(26):1650–9.
34. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *JCO*. 2005 Feb 10;23(5):1011–27.
35. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *The Journal of experimental medicine*. 1992 Nov 1;176(5):1375–9.
36. Obonai T, Fuchigami H, Furuya F, Kozuka N, Yasunaga M, Matsumura Y. Tumour imaging by the detection of fibrin clots in tumour stroma using an anti-fibrin Fab fragment. *Sci Rep*. 2016 Mar 24;6(1):23613.
37. Fibrin Gel Investment Associated With Line 1 and Line 10 Solid Tumor Growth, Angiogenesis, and Fibroplasia in Guinea Pigs. Role of Cellular Immunity, Myofibroblasts, Microvascular Damage, and Infarction in Line 1 Tumor Regression2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1979 Jun.
38. Oncogenes as Regulators of Tissue Factor Expression in Cancer: Implications for Tumor Angiogenesis and Anti-Cancer Therapy. *Semin Thromb Hemost*. 2004 Feb;30(1):21–30.
39. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1734–41.
40. Milsom C, Magnus N, Meehan B, Al-Nedawi K, Garnier D, Rak J. Tissue Factor and Cancer Stem Cells: Is There a Linkage? *ATVB*. 2009 Dec;29(12):2005–14.
41. Unruh D, Horbinski C. Beyond thrombosis: the impact of tissue factor signaling in cancer. *J Hematol Oncol*. 2020 Dec;13(1):93.
42. Liao K, Zhang X, Liu J, Teng F, He Y, Cheng J, et al. The role of platelets in the regulation of tumor growth and metastasis: the mechanisms and targeted therapy. *MedComm*. 2023 Oct;4(5):e350.
43. Van Der Wall SJ, Klok FA, Den Exter PL, Barrios D, Morillo R, Cannegieter SC, et al. Continuation of low-molecular-weight heparin treatment for cancer-related venous thromboembolism: a

- prospective cohort study in daily clinical practice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017 Jan;15(1):74–9.
44. Pengo V, Noventa F, Denas G, Pengo MF, Gallo U, Grion AM, et al. Long-term use of vitamin K antagonists and incidence of cancer: a population-based study. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1707–9.
  45. Haaland GS, Falk RS, Straume O, Lorens JB. Association of Warfarin Use With Lower Overall Cancer Incidence Among Patients Older Than 50 Years. *JAMA Intern Med*. 2017 Dec 1;177(12):1774.
  46. Escobar A, Salem AM, Dickson K, Johnson TN, Burk KJ, Bashoura L, et al. Anticoagulation and bleeding in the cancer patient. *Support Care Cancer*. 2022 Oct;30(10):8547–57.
  47. Degen SJF, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*. 1987 Sep 22;26(19):6165–77.
  48. Degen SJF, MacGillivray RTA, Davie EW. Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry*. 1983 Apr 26;22(9):2087–97.
  49. Bancroft JD, Schaefer LA, Friezner Degen SJ. Characterization of the Alu-rich 5'-flanking region of the human prothrombin-encoding gene: identification of a positive cis-acting element that regulates liver-specific expression. *Gene*. 1990 Nov;95(2):253–60.
  50. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, De Jong M, Bertina RM, Vos HL. Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003 Aug;1(8):1688–98.
  51. Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, et al. The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):428–35.
  52. Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, Ophir R, et al. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics*. 2005 Mar 1;21(5):650–9.
  53. Sun W Y. Gene targeting in hemostasis. prothrombin. *Front Biosci*. 2001;6(1):d222.
  54. Pozzi N, Bystranowska D, Zuo X, Di Cera E. Structural Architecture of Prothrombin in Solution Revealed by Single Molecule Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Aug;291(35):18107–16.
  55. Malhotra OP, Nesheim ME, Mann KG. The kinetics of activation of normal and gamma-carboxyglutamic acid-deficient prothrombins. *J Biol Chem*. 1985 Jan 10;260(1):279–87.
  56. Bristol JA, Ratcliffe JV, Roth DA, Jacobs MA, Furie BC, Furie B. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2585–93.

57. Nelsestuen GL. Role of gamma-carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *J Biol Chem.* 1976 Sep 25;251(18):5648–56.
58. Blostein MD, Rigby AC, Jacobs M, Furie B, Furie BC. The Gla Domain of Human Prothrombin Has a Binding Site for Factor Va. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Dec;275(48):38120–6.
59. Deguchi H, Takeya H, Gabazza EC, Nishioka J, Suzuki K. Prothrombin kringle 1 domain interacts with factor Va during the assembly of prothrombinase complex. *Biochemical Journal.* 1997 Feb 1;321(3):729–35.
60. Kotkow KJ, Deitcher SR, Furie B, Furie BC. The Second Kringle Domain of Prothrombin Promotes Factor Va-mediated Prothrombin Activation by Prothrombinase. *Journal of Biological Chemistry.* 1995 Mar;270(9):4551–7.
61. Stojanovski BM, Di Cera E. Role of sequence and position of the cleavage sites in prothrombin activation. *Journal of Biological Chemistry.* 2021 Aug;297(2):100955.
62. Esmon CT, Jackson CM. The conversion of prothrombin to thrombin. III. The factor Xa-catalyzed activation of prothrombin. *J Biol Chem.* 1974 Dec 25;249(24):7782–90.
63. Bovill EG, Tracy RP, Hayes TE, Jenny RJ, Bhushan FH, Mann KG. Evidence That Meizothrombin Is an Intermediate Product in the Clotting of Whole Blood. *ATVB.* 1995 Jun;15(6):754–8.
64. Pozzi N, Chen Z, Pelc LA, Shropshire DB, Di Cera E. The linker connecting the two kringles plays a key role in prothrombin activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014 May 27;111(21):7630–5.
65. Haynes LM, Bouchard BA, Tracy PB, Mann KG. Prothrombin Activation by Platelet-associated Prothrombinase Proceeds through the Prethrombin-2 Pathway via a Concerted Mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 2012 Nov;287(46):38647–55.
66. Davie E, Kulman J. An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Feb;32(S 1):003–15.
67. Huntington JA. How Na<sup>+</sup> activates thrombin – a review of the functional and structural data. *bchm.* 2008 Aug 1;389(8):1025–35.
68. Pozzi N, Chen Z, Gohara DW, Niu W, Heyduk T, Di Cera E. Crystal Structure of Prothrombin Reveals Conformational Flexibility and Mechanism of Activation. *Journal of Biological Chemistry.* 2013 Aug;288(31):22734–44.
69. Barranco-Medina S, Pozzi N, Vogt AD, Di Cera E. Histone H4 Promotes Prothrombin Autoactivation. *Journal of Biological Chemistry.* 2013 Dec;288(50):35749–57.
70. Liesenborghs L, Verhamme P, Vanassche T. *Staphylococcus aureus*, master manipulator of the human hemostatic system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2018 Mar;16(3):441–54.

71. Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, et al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jun 23;95(13):7597–602.
72. Hua Y, Keep RF, Gu Y, Xi G. Thrombin and Brain Recovery After Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2009 Mar;40(3\_suppl\_1).
73. Imokawa Y, Brockes JP. Selective Activation of Thrombin Is a Critical Determinant for Vertebrate Lens Regeneration. *Current Biology*. 2003 May;13(10):877–81.
74. Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER. Thrombin and vascular inflammation. *Mol Cell Biochem*. 2012 Jan;359(1–2):301–13.
75. Morris R, Winyard PG, Blake DR, Morris CJ. Thrombin in inflammation and healing: relevance to rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1994 Jan;53(1):72–9.
76. Chapman J. Thrombin in inflammatory brain diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2006 Oct;5(8):528–31.
77. Yin X, Wright J, Wall T, Grammas P. Brain Endothelial Cells Synthesize Neurotoxic Thrombin in Alzheimer’s Disease. *The American Journal of Pathology*. 2010 Apr;176(4):1600–6.
78. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med*. 2013 Nov;91(11):1257–71.
79. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Thrombin—unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2016 Jun;35(2):213–33.
80. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Sep 28;96(20):11023–7.
81. Pieters M, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2019 Apr;3(2):161–72.
82. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thrombosis Research*. 2012 Mar;129(3):250–6.
83. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem*. 1982 Jul 25;257(14):7944–7.
84. Esmon CT. Protein S and protein C. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1992 Nov;2(6):214–9.
85. Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Dec;18(12):3142–53.

86. Vu TKH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991 Mar;64(6):1057–68.
87. Kahn ML, Hammes SR, Botka C, Coughlin SR. Gene and Locus Structure and Chromosomal Localization of the Protease-activated Receptor Gene Family. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Sep;273(36):23290–6.
88. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001 Jun;53(2):245–82.
89. Peach CJ, Edgington-Mitchell LE, Bunnett NW, Schmidt BL. Protease-activated receptors in health and disease. *Physiological Reviews*. 2023 Jan 1;103(1):717–85.
90. Bahou W, Nierman W, Durkin A, Potter C, Demetrick D. Chromosomal assignment of the human thrombin receptor gene: localization to region q13 of chromosome 5. *Blood*. 1993 Sep 1;82(5):1532–7.
91. Vu TKH, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying thrombin–receptor interaction. *Nature*. 1991 Oct;353(6345):674–7.
92. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Sep 27;91(20):9208–12.
93. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Wu Zheng Y, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*. 1997 Apr;386(6624):502–6.
94. Xu W feng, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jun 9;95(12):6642–6.
95. Price R, Mercuri NB, Ledonne A. Emerging Roles of Protease-Activated Receptors (PARs) in the Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity. *IJMS*. 2021 Jan 16;22(2):869.
96. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005 Aug;3(8):1800–14.
97. Rahman A, True AL, Anwar KN, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB.  $G\alpha_q$  and  $G\beta\gamma$  Regulate PAR-1 Signaling of Thrombin-Induced NF- $\kappa$ B Activation and ICAM-1 Transcription in Endothelial Cells. *Circulation Research*. 2002 Sep 6;91(5):398–405.
98. Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1992 Oct 15;267(29):20831–4.
99. Russo A, Soh UJK, Trejo J. Proteases Display Biased Agonism at Protease-Activated Receptors: Location matters! *Molecular Interventions*. 2009 Apr 1;9(2):87–96.

100. Chen CH, Paing MM, Trejo J. Termination of Protease-activated Receptor-1 Signaling by  $\beta$ -Arrestins Is Independent of Receptor Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Mar;279(11):10020–31.
101. Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell*. 2005 Feb;120(3):303–13.
102. Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, Balloy V, Van Dorsselaer A, Pidard D, et al. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):1944–53.
103. O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, et al. Thrombin Responses in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 May;275(18):13502–9.
104. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Current Biology*. 2020 Aug;30(16):R921–5.
105. Elste AP, Petersen I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Hist*. 2010 Apr;41(2–3):89–99.
106. Liu X, Yu J, Song S, Yue X, Li Q. Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 5;8(63):107334–45.
107. Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, Pentecost BT. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(3–4):401–6.
108. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant Expression and Activation of the Thrombin Receptor Protease-Activated Receptor-1 Induces Cell Proliferation and Motility in Human Colon Cancer Cells. *The American Journal of Pathology*. 2003 May;162(5):1503–13.
109. Asanuma K, Wakabayashi H, Hayashi T, Okuyama N, Seto M, Matsumine A, et al. Thrombin Inhibitor, Argatroban, Prevents Tumor Cell Migration and Bone Metastasis. *Oncology*. 2004;67(2):166–73.
110. Radjabi AR, Sawada K, Jagadeeswaran S, Eichbichler A, Kenny HA, Montag A, et al. Thrombin Induces Tumor Invasion through the Induction and Association of Matrix Metalloproteinase-9 and  $\beta$ 1-Integrin on the Cell Surface. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Feb;283(5):2822–34.
111. Hu L, Ibrahim S, Liu C, Skaar J, Pagano M, Karpatkin S. Thrombin Induces Tumor Cell Cycle Activation and Spontaneous Growth by Down-regulation of p27Kip1, in Association with the Up-regulation of Skp2 and MiR-222. *Cancer Research*. 2009 Apr 15;69(8):3374–81.
112. Xue YH, Zhang XF, Dong QZ, Sun J, Dai C, Zhou HJ, et al. Thrombin is a Therapeutic Target for Metastatic Osteopontin-Positive Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2010 Dec;52(6):2012–22.

113. Zhang T, Ma Z, Wang R, Wang Y, Wang S, Cheng Z, et al. Thrombin facilitates invasion of ovarian cancer along peritoneum by inducing monocyte differentiation toward tumor-associated macrophage-like cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Jul;59(7):1097–108.
114. Wysoczynski M, Liu R, Kucia M, Drukala J, Ratajczak MZ. Thrombin Regulates the Metastatic Potential of Human Rhabdomyosarcoma Cells: Distinct Role of PAR1 and PAR3 Signaling. *Molecular Cancer Research*. 2010 May 17;8(5):677–90.
115. Vianello F, Sambado L, Goss A, Fabris F, Prandoni P. Dabigatran antagonizes growth, cell-cycle progression, migration, and endothelial tube formation induced by thrombin in breast and glioblastoma cell lines. *Cancer Medicine*. 2016 Oct;5(10):2886–98.
116. D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. Differential Expression of Protease-Activated Receptors-1 and -2 in Stromal Fibroblasts of Normal, Benign, and Malignant Human Tissues. *The American Journal of Pathology*. 2001 Jun;158(6):2031–41.
117. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021 Jul;184(15):3852–72.
118. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May 1;6(5):392–401.
119. Eck SM, Côté AL, Winkelman WD, Brinckerhoff CE. CXCR4 and Matrix Metalloproteinase-1 Are Elevated in Breast Carcinoma–Associated Fibroblasts and in Normal Mammary Fibroblasts Exposed to Factors Secreted by Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*. 2009 Jul 15;7(7):1033–44.
120. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
121. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karpatkin S. Growth-Regulated Oncogene Is Pivotal in Thrombin-Induced Angiogenesis. *Cancer Research*. 2006 Apr 15;66(8):4125–32.
122. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Maragoudakis ME. Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1997 Jul 1;273(1):C239–45. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.1.C239
123. Hanahan D. Hallmarks of cancer—Then and now, and beyond. *Cell*. 2026 Jan;S0092867425014989.
124. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, et al. Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and  $\beta$ -Catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005;179(1–2):56–65.
125. Ozdemir T, Zhang P, Fu C, Dong C. Fibrin serves as a divalent ligand that regulates neutrophil-mediated melanoma cells adhesion to endothelium under shear conditions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2012 Apr 15;302(8):C1189–201.
126. Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets | *Cancer Research* | American Association for Cancer Research [Internet]. [cited 2026 Apr 10]. Available from:

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/59/6/1295/505914/Lysis-of-Tumor-Cells-by-Natural-Killer-Cells-in>

127. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):178–85.
128. Hankey GJ, Eikelboom JW. Dabigatran Etexilate: A New Oral Thrombin Inhibitor. *Circulation*. 2011 Apr 5;123(13):1436–50.
129. Kikelj D. Peptidomimetic Thrombin Inhibitors. *Pathophysiol Haemos Thromb*. 2003;33(5–6):487–91.
130. Monsky WL, Mouta Carreira C, Tsuzuki Y, Gohongi T, Fukumura D, Jain RK. Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors. *Clin Cancer Res*. 2002 Apr;8(4):1008–13.
131. Dunjic S, Cumbo M, Gvozdenov M, Tomic B, Pruner I, Radojkovic D, et al. Prothrombin expression in cancer-derived cell lines. *Arch biol sci (Beogr)*. 2019;71(1):49–54.
132. Kohli M, Williams K, Yao JL, Dennis RA, Huang J, Reeder J, et al. Thrombin expression in prostate: a novel finding. *Cancer Invest*. 2011 Jan;29(1):62–7.
133. Wojtukiewicz MZ, Rucinska M, Zimnoch L, Jaromin J, Piotrowski Z, Rózanska-Kudelska M, et al. Expression of Prothrombin Fragment 1+2 in Cancer Tissue as an Indicator of Local Activation of Blood Coagulation. *Thrombosis Research*. 2000 Mar;97(5):335–42.
134. Danckwardt S, Gantzert AS, Macher-Goeppinger S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, et al. p38 MAPK Controls Prothrombin Expression by Regulated RNA 3' End Processing. *Molecular Cell*. 2011 Feb;41(3):298–310.
135. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clinicians*. 2024 May;74(3):229–63.
136. Clinton SK, Giovannucci EL, Hursting SD. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *The Journal of Nutrition*. 2020 Apr;150(4):663–71.
137. Lutgens MWMD, Van Oijen MGH, Van Der Heijden GJMG, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining Risk of Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: An Updated Meta-analysis of Population-based Cohort Studies. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013 Mar;19(4):789–99.
138. Spaander MCW, Zauber AG, Syngal S, Blaser MJ, Sung JJ, You YN, et al. Young-onset colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2023 Apr 27;9(1):21.
139. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory [Internet]. 2022 [cited 2026 Apr 4]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/en>

140. Petras RE, Frankel WL. Large Intestine (Colon). In: Modern Surgical Pathology [Internet]. Elsevier; 2009 [cited 2026 Apr 4]. p. 755–836. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416039662000230>
141. Matthew Fleming, Hsin-Liang Eang, Sergey F. Tatischev, Srinivas Ravula. Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(03):153–73.
142. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713–32. doi:10.1038/s41575-019-0189-8
143. Baniyas L, Jung I, Chiciudean R, Gurzu S. From Dukes-MAC Staging System to Molecular Classification: Evolving Concepts in Colorectal Cancer. *IJMS*. 2022 Aug 21;23(16):9455.
144. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA A Cancer J Clinicians*. 2017 Mar;67(2):93–9.
145. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *IJMS*. 2013 Aug 7;14(8):16365–85.
146. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2059–72.
147. Kudryavtseva AV, Lipatova AV, Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, et al. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 16;7(33):53959–83.
148. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2073-2087.e3.
149. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013;6(3):120–8.
150. Bouzourene H, Hutter P, Losi L, Martin P, Benhattar J. Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation. *Familial Cancer*. 2010 Jun;9(2):167–72.
151. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*. 2002 Nov 5;89(7):845–60.
152. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012 Jan;5(1):19–27.
153. Sieber OM, Lamlum H, Crabtree MD, Rowan AJ, Barclay E, Lipton L, et al. Whole-gene *APC* deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or “multiple” colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Mar 5;99(5):2954–8.

154. Jones S, Chen W dong, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Mar 18;105(11):4283–8.
155. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011 Feb 28;6(1):479–507.
156. Crockett SD, Nagtegaal ID. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2019 Oct;157(4):949-966.e4.
157. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2088–100.
158. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004 Jul;287(1):G7–17.
159. Vatandoust S. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *WJG*. 2015;21(41):11767.
160. Holch JW, Demmer M, Lamersdorf C, Michl M, Schulz C, Von Einem JC, et al. Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Visc Med*. 2017;33(1):70–5.
161. 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 Nov;21(11):1350–6.
162. Chang L, Chen C, Huang D, Pai H, Pan S, Teng C. Thrombin induces expression of twist and cell motility via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  translational pathway in colorectal cancer cells. *Journal Cellular Physiology*. 2011 Apr;226(4):1060–8.
163. Darmoul D, Marie JC, Devaud H, Gratio V, Laburthe M. Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *Br J Cancer*. 2001 Aug;85(5):772–9.
164. Shah H, Hill TA, Lim J, Fairlie DP. Protease-activated receptor 2 attenuates doxorubicin-induced apoptosis in colon cancer cells. *J Cell Commun Signal*. 2023 Dec;17(4):1293–307.
165. Zhang H, Jiang P, Zhang C, Lee S, Wang W, Zou H. PAR4 overexpression promotes colorectal cancer cell proliferation and migration. *Oncol Lett*. 2018 Sep 5.
166. Turpin B, Miller W, Rosenfeldt L, Kombrinck K, Flick MJ, Steinbrecher KA, et al. Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res*. 2014 Jun 1;74(11):3020–30.
167. Adams GN, Waltz D, Rosenfeldt L, Frederick M, Miller W, Revenko AS, et al. Thrombin Drives Colorectal Cancer Pathogenesis at the Level of Primary Tumor Growth, Tumor Invasion and Metastasis. *Blood*. 2014 Dec 6;124(21):2812–2812.
168. Adams GN, Rosenfeldt L, Frederick M, Miller W, Waltz D, Kombrinck K, et al. Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen. *Cancer Research*. 2015 Oct 1;75(19):4235–43.

169. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Thorpe PE, Brekken RA, Kisiel W. Co-localization of prothrombin fragment F1+2 and VEGF-R2-bound VEGF in human colon cancer. *Anticancer Res.* 2011 Mar;31(3):843–7.
170. Spaventi R, Pecur L, Pavelic K, Pavelic ZP, Spaventi S, Stambrook PJ. Human tumour bank in Croatia: a possible model for a small bank as part of the future European tumour bank network. *European Journal of Cancer.* 1994 Jan;30(3):419.
171. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013 Sep 16;2(9):e71–e71.
172. Nunes L, Li F, Wu M, Luo T, Hammarström K, Torell E, et al. Prognostic genome and transcriptome signatures in colorectal cancers. *Nature.* 2024 Sep 5;633(8028):137–46.
173. Oliveira MFD, Romero JP, Chung M, Williams SR, Gottscho AD, Gupta A, et al. High-definition spatial transcriptomic profiling of immune cell populations in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2025 Jun;57(6):1512–23.
174. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976 May;72(1–2):248–54.
175. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol.* 1972 Jul;109(1):129–35.
176. Burnette WN. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry.* 1981 Apr;112(2):195–203.
177. Supino R. MTT Assays. In: O’Hare S, Atterwill CK, editors. *In Vitro Toxicity Testing Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 1995 [cited 2026 May 12]. p. 137–49. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-282-5:137>
178. Cumbo M, Tomic B, Dunjic S, Jovanovic T, Gvozdenov M, Pruner I, et al. Prothrombin 3’end Gene Variants in Patients With Sporadic Colon Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2019 Nov;39(11):6067–71.
179. Cumbo M, Dunjic-Manevski S, Gvozdenov M, Mitic M, Djordjevic V, Tomic B. The effect of prothrombin, the precursor of thrombin, on the proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Arch biol sci (Beogr).* 2024;76(1):111–20.
180. Wahab R, Hasan MM, Azam Z, Grippo PJ, Al-Hilal TA. The role of coagulome in the tumor immune microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2023 Sep;200:115027.
181. Blom JW. Malignancies, Prothrombotic Mutations, and the Risk of Venous Thrombosis. *JAMA.* 2005 Feb 9;293(6):715.

182. Ceelie H, Bertina RM, van Hylekama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost.* 2001 Jun;85(6):1066–70.
183. Pruner I, Djordjevic V, Gvozdenov M, Tomic B, Kovac M, Miljic P, et al. The C20068T gene variant in the 3' end of the prothrombin gene and recurrent pregnancy loss: A pilot study. *Genetika.* 2015;47(2):469–76.
184. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet.* 2001 Aug;28(4):389–92.
185. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998 Apr;79(4):706–8.
186. Alfirevic Z, Simundic AM, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, et al. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case control study. *Biochem Med.* 2010;229–35.
187. Vossen CY, Hoffmeister M, Chang-Claude JC, Rosendaal FR, Brenner H. Clotting Factor Gene Polymorphisms and Colorectal Cancer Risk. *JCO.* 2011 May 1;29(13):1722–7.
188. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3178–84.
189. Albagoush SA, Koya S, Chakraborty RK, Schmidt AE. Factor V Leiden Mutation. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [cited 2026 Apr 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534802/>
190. Kerlin BA, Yan SB, Isermann BH, Brandt JT, Sood R, Basson BR, et al. Survival advantage associated with heterozygous factor V Leiden mutation in patients with severe sepsis and in mouse endotoxemia. *Blood.* 2003 Nov 1;102(9):3085–92.
191. Von Ahsen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):586–93.
192. Djordjevic V, Pruner I, Tomic B, Nestorovic A, Gvozdenov M, Kovac M, et al. The 3'End Prothrombin Gene Variants in Patients With Different Thrombotic Events. *Lab Med.* 2014 Nov;45(4):309–14.
193. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJM. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case–control study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006 Dec;4(12):2587–92.

194. Limperger V, Kenet G, Kiesau B, Köther M, Schmeiser M, Langer F, et al. Role of prothrombin 19911 A>G polymorphism, blood group and male gender in patients with venous thromboembolism: Results of a German cohort study. *J Thromb Thrombolysis*. 2021 Feb;51(2):494–501.
195. Aradjanski M, Djordjevic V, Pruner I, Tomic B, Gvozdenov M, Kovac M, et al. The 3' End Prothrombin Gene Variants in Serbian Patients with Idiopathic Thrombophilia. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2014 Dec 1;17(2):43–8.
196. Matzdorff A, Riess H, Bergmann F, Bisping G, Koschmieder S, Parmentier S, et al. Cancer Screening in Patients with Idiopathic Venous Thromboembolism - a Position Paper of the German Society of Hematology and Oncology Working Group on Hemostasis. *Oncol Res Treat*. 2015;38(9):454–8.
197. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998 Dec;396(6712):643–9.
198. Tomlinson IP, Bodmer WF. Chromosome 11q in sporadic colorectal carcinoma: patterns of allele loss and their significance for tumorigenesis. *J Clin Pathol*. 1996 May;49(5):386–90.
199. Ruivenkamp C, Hermsen M, Postma C, Klous A, Baak J, Meijer G, et al. LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12–21. *Oncogene*. 2003 May 29;22(22):3472–4.
200. Aran D, Camarda R, Odegaard J, Paik H, Oskotsky B, Krings G, et al. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun*. 2017 Oct 20;8(1):1077.
201. Koca D, Abedi-Ardekani B, LeMaout J, Guyon L. Peritumoral tissue (PTT): increasing need for naming convention. *Br J Cancer*. 2024 Oct 19;131(7):1111–5.
202. Kazim I, Gande T, Reyher E, Gyatsho Bhutia K, Dhingra K, Verma S. Advancements in sequencing technologies: from genomic revolution to single-cell insights in precision medicine. *J Knowl Learn Sci Technol*. 2024 Dec 25;3(4):108–24.
203. Tzec-Interián JA, González-Padilla D, Góngora-Castillo EB. Bioinformatics perspectives on transcriptomics: A comprehensive review of bulk and single-cell RNA sequencing analyses. *Quant Biol*. 2025 Jun;13(2):e78.
204. Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IJ, Appleton G, Axton M, Baak A, et al. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data*. 2016 Mar 15;3(1):160018.
205. Tellez C, Bar-Eli M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3130–7.
206. Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol*. 2005;6(13):246.

207. Li Q, Dashwood RH. Activator Protein 2 $\alpha$  Associates with Adenomatous Polyposis Coli/ $\beta$ -Catenin and Inhibits  $\beta$ -Catenin/T-cell Factor Transcriptional Activity in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Oct;279(44):45669–75.
208. Ropponen KM, Kellokoski JK, Pirinen RT, Moisio KI, Eskelinen MJ, Alhava EM, et al. Expression of transcription factor AP-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas; comparison of immunohistochemistry and in situ hybridisation. *J Clin Pathol*. 2001 Jul;54(7):533–8.
209. Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T, et al. Thrombin Induces Proteinase-activated Receptor-1 Gene Expression in Endothelial Cells via Activation of G-linked Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 May;274(19):13718–27.
210. McLaughlin JN, Patterson MM, Malik AB. Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Mar 27;104(13):5662–7.
211. De Melo IG, Tavares V, Pereira D, Medeiros R. Contribution of Endothelial Dysfunction to Cancer Susceptibility and Progression: A Comprehensive Narrative Review on the Genetic Risk Component. *CIMB*. 2024 May 16;46(5):4845–73.
212. Vergnolle N. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009 Sep;123(3):292–309.
213. Chang JH, Park JM, Kim SW, Jung CK, Kang WK, Oh ST. Expression of Protease Activated Receptor-2 in Human Colorectal Cancer and Its Association With Tumor Progression. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2010 Aug;53(8):1202–8.
214. Nasri I, Bonnet D, Zwarycz B, d'Aldebert E, Khou S, Mezghani-Jarraya R, et al. PAR2-dependent activation of GSK3 $\beta$  regulates the survival of colon stem/progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Aug 1;311(2):G221-236.
215. Yu G, Jiang P, Xiang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhang C, et al. Increased Expression of Protease-Activated Receptor 4 and Trefoil Factor 2 in Human Colorectal Cancer. Li J, editor. *PLoS ONE*. 2015 Apr 13;10(4):e0122678.
216. Kahn ML, Hammes SR, Botka C, Coughlin SR. Gene and Locus Structure and Chromosomal Localization of the Protease-activated Receptor Gene Family. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Sep;273(36):23290–6.
217. Wu K, Xu L, Cheng L. PAR2 Promoter Hypomethylation Regulates PAR2 Gene Expression and Promotes Lung Adenocarcinoma Cell Progression. Huang T, editor. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2021 Apr 15;2021:1–10.
218. Lakshminarasimhan R, Liang G. The Role of DNA Methylation in Cancer. In: Jeltsch A, Jurkowska RZ, editors. *DNA Methyltransferases - Role and Function* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2026 May 11]. p. 151–72. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-43624-1\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-43624-1_7)

219. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2015 Dec;34(4):775–96.
220. Fish RJ, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost.* 2012;108(09):419–26.
221. Anglani R, Creanza TM, Liuzzi VC, Piepoli A, Panza A, Andriulli A, et al. Loss of Connectivity in Cancer Co-Expression Networks. Castiglione F, editor. *PLoS ONE.* 2014 Jan 28;9(1):e87075.
222. Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biology of the Cell.* 2004 Sep;96(7):479–98.
223. Nagai Y, Kiyomatsu T, Gohda Y, Otani K, Deguchi K, Yamada K. The primary tumor location in colorectal cancer: A focused review on its impact on surgical management. *GHM.* 2021 Dec 31;3(6):386–93.
224. Buikhuisen JY, Torang A, Medema JP. Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. *Oncogenesis.* 2020 Jul 9;9(7):66.
225. Sobral D, Martins M, Kaplan S, Golkaram M, Salmans M, Khan N, et al. Genetic and microenvironmental intra-tumor heterogeneity impacts colorectal cancer evolution and metastatic development. *Commun Biol.* 2022 Sep 9;5(1):937.
226. Patkulkar PA, Subbalakshmi AR, Jolly MK, Sinharay S. Mapping Spatiotemporal Heterogeneity in Tumor Profiles by Integrating High-Throughput Imaging and Omics Analysis. *ACS Omega.* 2023 Feb 21;8(7):6126–38.
227. Robles-Remacho A, Sanchez-Martin RM, Diaz-Mochon JJ. Spatial Transcriptomics: Emerging Technologies in Tissue Gene Expression Profiling. *Anal Chem.* 2023 Oct 24;95(42):15450–60.
228. Buikhuisen JY, Torang A, Medema JP. Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. *Oncogenesis.* 2020 Jul 9;9(7):66.
229. Sawayama H, Miyamoto Y, Ogawa K, Yoshida N, Baba H. Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. *Annals of Gastroent Surgery.* 2020 Sep;4(5):528–39.
230. Lyu J, Chen C. Transcriptome and Temporal Transcriptome Analyses in Single Cells. *IJMS.* 2024 Nov 29;25(23):12845.
231. Schillaci O, Fontana S, Monteleone F, Taverna S, Di Bella MA, Di Vizio D, et al. Exosomes from metastatic cancer cells transfer amoeboid phenotype to non-metastatic cells and increase endothelial permeability: their emerging role in tumor heterogeneity. *Sci Rep.* 2017 Jul 5;7(1):4711.
232. Beitia M, Romano P, Larrinaga G, Solano-Iturri JD, Salis A, Damonte G, et al. The Activation of Prothrombin Seems to Play an Earlier Role than the Complement System in the Progression of Colorectal Cancer: A Mass Spectrometry Evaluation. *Diagnostics.* 2020 Dec 11;10(12):1077.

233. Wiebe JP, Dinsdale CJ. Inhibition of cell proliferation by glycerol. *Life Sci.* 1991;48(16):1511–7.
234. Sakurai S, Okada Y, Mataga I. Inhibitory Effects of Glycerol on Growth and Invasion of Human Oral Cancer Cell Lines. *J Hard Tissue Biology.* 2011;20(1):37–46 doi:10.2485/jhtb.20.37
235. Martínez-Jiménez F, Movasati A, Brunner SR, Nguyen L, Priestley P, Cuppen E, et al. Pan-cancer whole-genome comparison of primary and metastatic solid tumours. *Nature.* 2023 Jun 8;618(7964):333–41.
236. Sveen A, Bruun J, Eide PW, Eilertsen IA, Ramirez L, Murumägi A, et al. Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtypes Translated to Preclinical Models Uncover Potentially Targetable Cancer Cell Dependencies. *Clinical Cancer Research.* 2018 Feb 15;24(4):794–806.
237. Trinh A, Lädach C, Dawson HE, Ten Hoorn S, Kuppen PJK, Reimers MS, et al. Tumour budding is associated with the mesenchymal colon cancer subtype and RAS/RAF mutations: a study of 1320 colorectal cancers with Consensus Molecular Subgroup (CMS) data. *Br J Cancer.* 2018 Nov;119(10):1244–51.
238. Fessler E, Drost J, Van Hooff SR, Linnekamp JF, Wang X, Jansen M, et al. TGF $\beta$  signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol Med.* 2016 Jul;8(7):745–60.
239. Chang JZ, Hsieh Y, Lin W, Chen H, Kuo MY. Activation of transforming growth factor- $\beta$ 1 by thrombin via integrins  $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ v $\beta$ 3, and  $\alpha$ v $\beta$ 5 in buccal fibroblasts: Suppression by epigallocatechin-3-gallate. *Head & Neck.* 2017 Jul;39(7):1436–45.
240. Cecerska-Heryć E, Jerzyk A, Goszka M, Polikowska A, Rachwalska J, Serwin N, et al. TGF- $\beta$  Signaling in Cancer: Mechanisms of Progression and Therapeutic Targets. *IJMS.* 2025 Jul 29;26(15):7326.
241. Tian M, Schiemann WP. The TGF- $\beta$  Paradox in Human Cancer: An Update. *Future Oncol.* 2009 Mar 31;5(2):259–71.
242. Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF- $\beta$  Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Apr;9(4):a022145.
243. Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular Research.* 2007 Sep;74(2–3):172–83.
244. Degani G, Altomare A, Digiovanni S, Arosio B, Fritz G, Raucci A, et al. Prothrombin is a binding partner of the human receptor of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2020 Aug 28;295(35):12498–511.
245. Younessi P, Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress. *Iran J Med Sci.* 2011 Sep;36(3):154–66.

246. Fuentes MK, Nigavekar SS, Arumugam T, Logsdon CD, Schmidt AM, Park JC, et al. RAGE Activation by S100P in Colon Cancer Stimulates Growth, Migration, and Cell Signaling Pathways. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2007 Aug;50(8):1230–40.
247. Wood JP, Silveira JR, Maille NM, Haynes LM, Tracy PB. Prothrombin activation on the activated platelet surface optimizes expression of procoagulant activity. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1710–8.
248. Fernando EH, Gordon MH, Beck PL, MacNaughton WK. Inhibition of Intestinal Epithelial Wound Healing through Protease-Activated Receptor-2 Activation in Caco2 Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2018 Nov;367(2):382–92.
249. Prasad A, Roy AC, Priya K, Meena R, Ghosh I. Effect of differential deprivation of nutrients on cellular proliferation, oxidative stress, mitochondrial function, and cell migration in MDA-MB-231, HepG2, and HeLa cells. *3 Biotech*. 2023 Oct;13(10):339.
250. Eskelinen EL. Maturation of Autophagic Vacuoles in Mammalian Cells. *Autophagy*. 2005 Apr 28;1(1):1–10.
251. Sung DK, Sung SI, Ahn SY, Chang YS, Park WS. Thrombin Preconditioning Boosts Biogenesis of Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells and Enriches Their Cargo Contents via Protease-Activated Receptor-Mediated Signaling Pathways. *IJMS*. 2019 Jun 14;20(12):2899.
252. Yhim HY. Proper application of anticoagulation therapy on cancer-associated venous thrombosis. *Blood Res*. 2024 Dec;59(1):25.
253. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastrointest Surg*. 2023 Apr 27;15(4):495–519.
254. Xia Y, Sun M, Huang H, Jin WL. Drug repurposing for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther*. 2024 Apr 19;9(1):92.
255. Laizure SC, Parker RB, Herring VL, Hu ZY. Identification of Carboxylesterase-Dependent Dabigatran Etxilate Hydrolysis. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014 Feb;42(2):201–6.
256. Chiang HS, Yang RS, Huang TF. Thrombin enhances the adhesion and migration of human colon adenocarcinoma cells via increased  $\beta 3$  -integrin expression on the tumour cell surface and their inhibition by the snake venom peptide, rhodostomin. *Br J Cancer*. 1996 Apr;73(7):902–8.
257. García PS, Ciavatta VT, Fidler JA, Woodbury A, Levy JH, Tyor WR. Concentration-Dependent Dual Role of Thrombin in Protection of Cultured Rat Cortical Neurons. *Neurochem Res*. 2015 Nov;40(11):2220–9.
258. Zain J, Huang YQ, Feng X, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3133–8.

259. Rees PA, Castle J, Clouston HW, Lamb R, Singh U, Duff SE, et al. The effects of coagulation factors and their inhibitors on proliferation and migration in colorectal cancer. *Cancer Medicine*. 2023 Aug;12(16):17184–92.
260. Paul S, Khuda Bukhsh AR. Zebrafish as a Versatile Model for Cancer Research: Insights from In vitro and In vivo Studies. *J Biomed Res Environ Sci*. 2025 Oct;6(10):1424–31.
261. Raghunath A, Ferguson AC, Shavit JA. Fishing for answers to hemostatic and thrombotic disease: Genome editing in zebrafish. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2022 Jul;6(5):e12759.
262. Grzegorski SJ, Hu Z, Liu Y, Yu X, Ferguson AC, Madarati H, et al. Disruption of the kringle 1 domain of prothrombin leads to late onset mortality in zebrafish. *Sci Rep*. 2020 Mar 4;10(1):4049.
263. Fleischmann AIT, Woodhams WH, Mouayed R, Joseph T, Sui X, Yaman M, et al. Dabigatran prevents lipopolysaccharide mediated apoptosis in zebrafish through a thrombin independent mechanism. *Shock*. 2026 Jan 28.
264. Pn S, As M. Therapeutic Promise of Dabigatran Etxilate, an Oral Direct Thrombin Inhibitor in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Clin Exp Pharmacol*. 2018;08(02).
265. Costa B, Estrada MF, Mendes RV, Fior R. Zebrafish Avatars towards Personalized Medicine—A Comparative Review between Avatar Models. *Cells*. 2020 Jan 25;9(2):293.

## **BIOGRAFIJA**

Marija Cumbo Stikić je rođena 01. 12. 1992. u Beogradu, Srbija. Osnovne studije je završila na Biološkom fakultetu u Beogradu 2015. godine, smer Molekularna biologija i fiziologija. Na istom fakultetu je završila i master studije 2016. godine, na smeru Molekularna biologija, modulu Eksperimentalna biomedicina, a iste godine upisala i doktorske studije na programu Molekularna biologija, modulu Molekularna biologija eukariota. Eksperimentalni deo disertacije je uradila u Grupi za molekularnu biologiju hemostaze na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Tokom svog rada, Marija je učestvovala je na nacionalnim i internacionalnim projektima, u izradi inovacionih vaučera i kao demonstrator na manifestaciji Noć istraživača. Preko programa razmene Erasmus je posetila Karolinska institut u Švedskoj radi tromesečnog profesionalnog usavršavanja. Prošla je zvaničnu obuku za rad u SARS-CoV-2 i Nifty-PRO linijama Centra za sekvenciranje genoma i bioinformatiku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. U okviru doktorske disertacije publikovala je dva naučna rada pod prvim autorstvom (M22 i M23), a koautor je još 3 naučne publikacije (po jedna u M23, M22 i M21 kategoriji) i ima 14 saopštenja na nacionalnim i međunarodnim kongresima.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Цумбо Стикић

Број индекса М3006/2016

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Експресија, активација и улога тромбина у прогресији колоректалног карцинома човека

- 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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Цумбо Стикић

Број индекса М3006/2016

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Експресија, активација и улога тромбина у прогресији колоректалног карцинома човека

Ментори др Бранко Томић

др Горан Брајушковић

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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Експресија, активација и улога тромбина у прогресији колоректалног карцинома човека

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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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.