

Utjecaj mikrobioma na mokraćni mjehur i na razvoj tumora mokraćnog mjehura

Roje, Blanka

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:264452>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

BLANKA ROJE

**UTJECAJ MIKROBIOMA NA MOKRAĆNI MJEHUR I
NA RAZVOJ TUMORA MOKRAĆNOG MJEHURA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2021.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je provedeno uz potporu projekta Hrvatske zaklade za znanost, „Uloga upale u razvoju zloćudnog tumora mokraćnog mjehura – iBC“ (šifra projekta IP-2014-09-1904).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Janoš Terzić

Zahvale

Hvala mom mentoru prof. dr. sc. Janošu Terziću na pruženoj potpori i prilikama, na svom prenesenom znanju, motivaciji za rad i učenje te na usmjeravanju ovog rada prema uspješnoj realizaciji!

Hvala svim kolegama iz Laboratorija za istraživanje raka na znanstvenoj i prijateljskoj potpori te posebno Sandri na pomoći pri radu u laboratoriju.

Hvala mojim uredskim cimericama, Anji i Mariji (po abecednom redu!), na uvijek spremno pruženoj pomoći i hrabrenju, ali i na smijehu i društvu kojim su mi uljepšavale dane provedene u labosu i Čumezu.

Zahvaljujem svim suradnicima za značajan doprinos istraživanju i uspješnu suradnju.

Hvala svim prijateljima zato što su mi potpora, a posebno hvala Kali na svojoj podršci i razumijevanju.

Na kraju, hvala mojoj obitelji zato što su mi inspiracija i glavni oslonac u životu bez kojeg ne bih bila tu gdje jesam.

SADRŽAJ

<u>1.</u>	UVOD	1
1.1	Mikrobiota	1
1.1.1.	Proučavanje mikrobiote	1
1.1.2.	Mikrobiota i zloćudni tumori	5
1.1.3.	Mehanizmi protumorskog djelovanja mikrobiote	6
1.1.4.	Mikrobiom mokraćnog mjehura i urina	9
1.2	Karcinom mokraćnog mjehura	12
1.2.1.	Građa mokraćnog mjehura i urotela	12
1.2.2.	Epidemiologija	13
1.2.3.	Čimbenici rizika	14
1.2.4.	Dijagnoza i liječenje	15
1.2.5.	Molekularni okoliš	21
1.2.6.	Uloga upale u razvoju tumora mokraćnog mjehura	22
1.2.7.	Utjecaj urinarne mikrobiote na razvoj raka mokraćnog mjehura	25
1.3.	BBN model za proučavanje tumora mokraćnog mjehura	29
<u>2.</u>	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
2.1.	Hipoteza	32
2.2.	Ciljevi istraživanja	32
<u>3.</u>	MATERIJALI I METODE	33
3.1.	Reagensi	33
3.2.	Antibiotici	33
3.3.	Početnice	33
3.4.	Protutijela	35
	Primarna protutijela	35
	Sekundarna protutijela	35
3.5.	Oprema	35
3.6.	Ezimi i biljezi	36
3.7.	Komercijalno dostupni kompleti	36
3.8.	Puferi i otopine	36
3.9.	Hranjive podloge	37
3.10.	Pokusne životinje	37
3.11.	Protokoli istraživanja	38
3.12.	Tretman životinja BBN-om i antibioticima	39
3.13.	Izolacija RNA iz tkiva	40
3.14.	Patohistološka i imunohistokemijska analiza tkiva	40
3.15.	Analiza ukupnog genskog izražaja (sekvenciranje RNA)	41
3.16.	Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)	42
3.17.	Deplecija neutrofila	42
3.18.	Analiza BBN metabolita metodom tekućinske kromatografije visoke dijelotvornosti u 24-stanom urinu te fecesu	43
3.19.	Analiza konverzije BBN-a u BCPN crijevnim bakterijama	44
3.20.	Analiza prisutnosti bakterija 16S sekvenciranjem te uzgojem u kulturi	45
3.21.	Statistički postupci	46
<u>4.</u>	REZULTATI	47
4.1.	Utjecaj mikrobiote na mokraćni mjehur	47
4.1.1.	Masa i veličina mokraćnog mjehura u ovisnosti o mikrobioti	47

4.1.2. Patohistološka analiza tkiva.....	48
4.1.3. Izražaj gena kod akseničnih miševa	49
4.2. Utjecaj mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura.....	55
4.2.1 Kvantitativna i kvalitativna potvrda antibiotske redukcije mikrobioma	55
4.2.1 Degenerativne promjene u urotelu nakon dvotjedne izloženosti BBN-u	59
4.2.3 Izražaj gena u mokraćnom mjehuru nakon dvotjedne izloženosti BBN-u ..	66
4.2.4 Tumorski stadij nakon dugotrajnog tretmana BBN-om	68
4.2.5 Količine prokarcinogena BBN-a i njegovog metabolita BCPN-a u urinu i fecesu miševa.....	70
4.2.6 Testiranje sposobnosti mikrobiote za konverziju BBN-a u BCPN	72
<u>5.</u> RASPRAVA	74
5.1. Utjecaj mikrobiote na mokraćni mjehur.....	74
5.2. Utjecaj mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura.....	77
5.3. Mikrobiota crijeva vrši pretvorbu BBN-a oksidacijom u kancerogeni BCPN ..	79
<u>6.</u> ZAKLJUČCI.....	82
<u>7.</u> KRATKI SAŽETAK	83
<u>8.</u> KRATKI SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY).....	84
<u>9.</u> LITERATURA	85
<u>10.</u> KRATKA BIOGRAFIJA.....	93

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABX	Antibiotici
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
TNM	<i>Tumour, node, metastasis</i> , klasifikacija tumora
Adamts4	<i>Adam metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4</i>
Arntl	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette–Guérin</i>
bZip	<i>Basic leucine zipper domain</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BLP	<i>Bioengineered Lactobacillus probiotics</i>
B6	<i>Black 6</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
Ccl	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
Ciart	<i>Circadian associated repressor of transcription</i>
CK	Citokeratin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
CDT	<i>Cytolethal distending toxins</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
Dbp	<i>D-box binding protein transcription factor</i>
DBN	Di-N-butyl-nitrosamine
DPTE	<i>Double Porte pour Transfert Etanche</i>
Embp	<i>Eosinophil major basic protein</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FC	<i>Fold change</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GAGE	<i>Generally Applicable Gene-set Enrichment for Pathway Analysis</i>
gDNA	Genomska DNA
GF	<i>Germ free</i> , aksenično
GSTM1	<i>Glutathione S-transferase mu 1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HE	Hemalaun-eozin
Hlf	<i>Hepatic leukemia factor</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMP	<i>Human microbiome project</i>
IVC	<i>Individually ventilated cage</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>

IFNγ	Interferon γ
IL-1	Interleukin 1
VSM	Izvanstanični matriks
JAK	Janus kinaza
Krt5	Keratin 5
cDNA	Komplementarna DNA
qPCR	Kvantitativni PCR
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LPS	Lipopolisaharid
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Mup7	<i>Major urinary protein 7</i>
Mmp 12	<i>Matrix metalloproteinase 12</i>
mRNA	Messenger RNA, glasnička RNA
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NAT2	<i>N-acetyltransferase 2</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Natural killer, prirodnoubilačke stanice
BBN	N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin
BCPN	N-butil-N-(3-karboksilpropil)-nitrozamin
Npas2	<i>Neuronal pas domain protein 2</i>
ns	<i>Nonsignificant</i> , neznačajno
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
Nfil3	<i>Nuclear factor, interleukin 3 regulated</i>
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
Pten	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
RPM	<i>Rotations per minute</i> , rotacija u minuti
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SLC14A1	<i>Solute carrier family 14 member 1</i>
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
Spon	<i>Spondin</i>
TCGA	<i>The cancer genome atlas</i>
TEF	<i>Thyrotroph embryonic factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Trp53	<i>Tumor protein P53</i>

UVOD

1.1 Mikrobiota

Mikrobiota ili mikrobiom su mikroorganizmi koji žive u unutrašnjosti ili na površinama čovjekovog ili nekog drugog domaćinskog organizma. Procjenjuje se da ljudsko tijelo u sebi sadržava $3,8 \times 10^{13}$ mikroba, otprilike koliko i samih ljudskih stanica. Većina ih se nalazi unutar gastrointestinalnog trakta, no i drugi dijelovi tijela, posebice oni izloženi okolišu, poput kože, nastanjeni su mikroorganizmima (1).

Mikrobi se počinju proučavati u kontekstu ljudskog zdravlja sredinom 19. stoljeća kada nastaje „teorija klica“ (engl. *germ theory*), odnosno teorija o sitnim, oku nevidljivim česticama koje uzrokuju bolesti te se prenose s čovjeka na čovjeka. Ideja da „klice“, odnosno mikroorganizmi mogu biti korisni ili barem neškodljivi puno je novija, a danas znamo da je točna za većinu mikroba. Do sada je otkriveno stotinjak patogenih vrsta bakterija, s druge strane na tisuće neškodljivih bakterijskih vrsta obitava u ljudskom probavnom sustavu (2,3). Takav suživot omogućila je evolucija kroz milijune godina tijekom koje su neškodljivi i korisni mikrobi imali prednost i uspostavili trajan suživot u zaštićenom i hranom bogatom domaćinovom probavnom traktu, dok su štetni mikrobi izazivali jak imunološki odgovor i bili uništavani. Vremenom je zajednička evolucija mikrobiote i domaćina dovela do tog da mikrobi postaju nezamjenjivi pomagači domaćinu, tj. postali su ključni u obrani od patogena i u nekim metaboličkim procesima zbog čega se mikrobiotu sve češće naziva „zaboravljenim organom“ (3,4). Simbiozu mikrobiote i domaćina možemo promatrati kao 'superorganizam' u kojem njihov suživot donosi blagodati za obje strane, s druge strane bilo kakve promijene u tom odnosu mogu uvelike utjecati na zdravlje domaćina. Primjer su disbioze ili poremećaji u sastavu mikrobiote koje se povezuju s raznolikim bolestima, od kardiovaskularnih oboljenja do nekih vrsta karcinoma, a lista bolesti se neprestano širi (3).

1.1.1. Proučavanje mikrobiote

„Standardni“ način identifikacije mikroba temeljio se je na njihovom porastu na hranjivim podlogama i proučavanju njihovih biokemijskih karakteristika te je primarno usmjeren na identifikaciju patogena, a svi ostali mikrobi ostali su neidentificirani. Proučavanje mikrobiote dobiva uzlet posljednjih desetak godina razvojem tehnologije sekvenciranja nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) koja omogućava identifikaciju mikroba temeljem analize njihove DNA. Sastav mikrobne populacije sekvenciranjem temelji se uglavnom na analizi varijabilnog gena koji kodira bakterijsku 16S rRNA molekulu, a njihova taksonomska analiza radi se usporedbom dobivenih podataka s referentnom bazom podataka koja sadržava 16S sekvence poznatih bakterija (5). Konvencionalnim pristupom mogu se identificirati samo one bakterije koje rastu na korištenoj hranjivoj podlozi dok tzv. 16S

sekvenciranje otkriva mnogo više bakterijskih vrsta u različitim nišama, od kojih je većina bila “nevidljiva” u metodama koje se oslanjaju na bakterijske kulture (5).

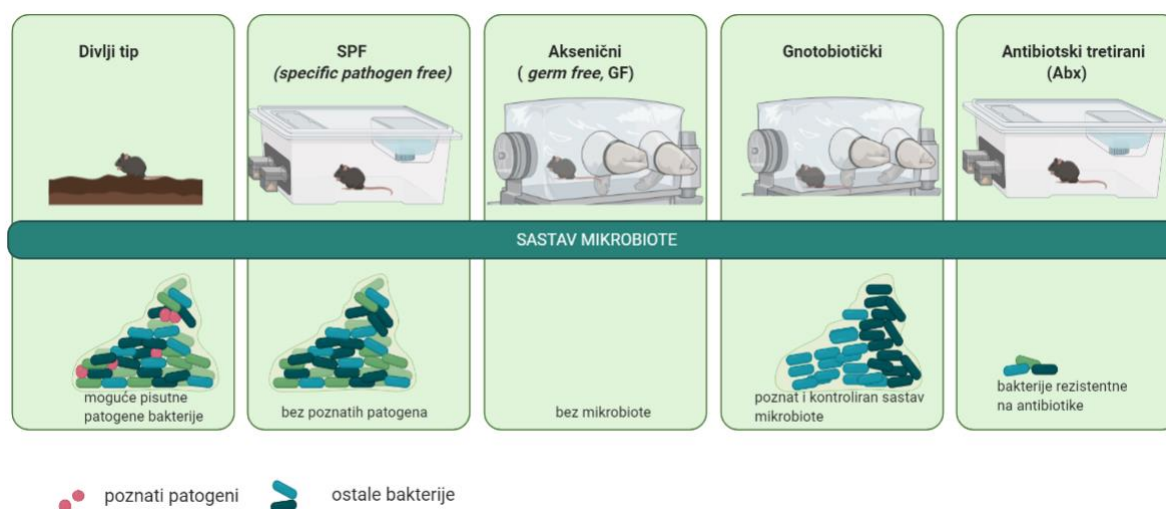
Bakterijski gen 16S rRNA kodira istoimenu (16S rRNA) ribosomalnu RNA molekulu koja ulazi u sastav male podjedinice bakterijskog ribosoma. Gen zbog svoje ključne uloge u bakterijskoj stanici ima konzerviranu građu, ali posjeduje i hipervarijabilne regije s polimorfizmima koji se mogu koristiti za mjerenje filogenetske srodnosti. Gen ima devet hipervarijabilnih regija koje posjeduju dovoljno polimorfizama za klasifikaciju svih bakterija do razine vrste, a sekvenciranje jedne regije često je dovoljno za taksonomsku klasifikaciju do razine obitelji ili roda. Budući da se radi o sekvenciranju, tj. identifikaciji temeljem slijeda nukleotida, ova metoda nije kvantitativna te ne može utvrđivati količine različitih bakterija (5). Rezultati 16S analize najčešće se izražavaju kao OTU ili operativne taksonomske jedinice (engl. *operational taxonomic unit*), što je najmanja filogenetska jedinica određena prema varijacijama u 16S genu. Očitani OTU može predstavljati jednu bakterijsku vrstu, jedan soj određene bakterije ili pak više bakterijskih vrsta odnosno čitavu porodicu bakterija. Uz 16S sekvenciranje, moguće je i cjelogenomsko sekvenciranje (engl. *shotgun sequencing*) koje se koristi za određivanje bakterija i drugih mikroba (virusa, parazita) prisutnih u nekom uzorku. Temelji se na čitanju ili sekvenciranju čitave mikrobne DNA (3). Budući da se dobiju sve genetske informacije o mikrobioti (tzv. metagenom), može se koristiti za dodatne analize, primjerice profiliranje metaboličkih funkcija i gena otpornosti na antibiotike. Razvrstavanjem mikrobioma prema funkciji gena mogu se izgraditi metaboličke mreže ispitati ih u odnosu na fenotip domaćina, primjerice na prisustvo ili odsustvo neke bolesti (6).

Ekspanzija informacija o ljudskom mikrobiomu u posljednjih nekoliko godina predvođena je podacima prikupljenih kroz par velikih projekata koji su imali za cilj okarakterizirati ljudski mikrobiom poput MetaHIT (engl. *The European Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) i HMP (engl. *The Human Microbiome Project*). MetaHIT studija, pokrenuta je 2010. godine, te je obuhvatila sekvenciranje 3,3 milijuna mikrobnih gena dobivenih iz uzoraka fecesa 124 ljudi. Prvi cilj MetaHIT projekta je bio katalogiziranje mikrobnih gena u intestinalnom traktu te polaganje temelja za karakterizaciju mikrobnih populacija u crijevima (7). U HMP studiji proučavan je mikrobiom 300 zdravih pojedinaca s 5 glavnih lokacija na tijelu: usta, nosa, koža, probavni i urogenitalni sustav (8). Godine 2014. napravljena je kombinirana analiza metagenomskih podataka iz MetaHIT projekta, HMP-a i kineske studije o dijabetesu, s ukupno 1267 sudionika, a smatra se da je u toj objedinjenoj zbirci podataka sa 9,879,896 bakterijskih gena sadržan gotovo kompletan skup gena crijevnih bakterija. Nadalje, veličinu bakterijskog metagenoma ilustrira i činjenica da je prosječno utvrđeno 750.000 različitih bakterijskih gena po jednom uzorku stolice, odnosno 37 puta više gena nego što ih je u ljudskom genomu (9). Iako postoje velike razlike u sastavu mikrobiote na nižim taksonomski razinama, ljudska mikrobiota ima sličan sastav na višim taksonomskim razinama te ima osnovni metabolički profil koji obuhvaća sve osnovne bakterijske funkcije u

ljudskom tijelu. Slično vrijedi i za druge sisavce: na nižim razinama postoje velike varijacije, no na višim taksonomskim razinama mikrobiota svih sisavaca je slična (3).

Proučavanje mikrobiote pomoću laboratorijskih životinja

Korištenje animalnih modela za proučavanje mikrobiote omogućava otkrivanje načina na koji mikrobiota utječe na domaćina, a najčešće podrazumijeva različite vrste manipulacije mikrobiomom životinja te osiguravanje kontroliranih mikrobioloških uvjeta u kojima te životinje borave. Većina istraživanja se provode na takozvanim SPF (engl. *specific pathogen free*) miševima, odnosno životinjama koje su bez patogena koji bi mogli utjecati na rezultate istraživanja. Ipak, mikrobiota SPF miševa u različitim nastambama se razlikuje, čak i u različitim prostorijama iste nastambe, a te razlike mogu utjecati na rezultate istraživanja (10). Jedan od modela za proučavanje utjecaja mikrobiote na organizam jesu aksenični miševi (engl. *germ-free*, GF), odnosno miševi koji žive u sterilnim izolatorima bez kontakta s mikrobima. Ukoliko se sterilnim miševima transferira specifični mikrobiom poznatog sastava ili ih se inokulira s bakterijskom monokulturom, takve se životinje naziva gnotobiotičkim (Slika 1) (11).



Slika 1. Shematski prikaz mikrobiote u različitim životinjskim modelima

Budući da akseničnih organizmi nikada ne susretnu bakterije, predstavljaju dobar model za otkrivanje utjecaja mikroba na fiziološke i patološke procese u tijelu (11,12). Tako je, uspoređivanjem GF i SPF miševa, otkriveno da se metabolom (sastav metabolita) krvne plazme i urina uvelike mijenja ovisno o prisustvu mikroorganizama (13). Također, miševi bez bakterija imaju manje masnoće u tijelu i usporen metabolizam. Anatomski gledano, jetra im je manja, ukupna površina tankog crijeva smanjena, a cekum znatno veći. Imaju promijenjenu aktivnost nekih jetrenih enzima, dok je u crijevima promijenjen izražaj gena koji sudjeluju u imunološkom prepoznavanju mikroorganizama (11). Sažeti prikaz razlika akseničnih miševa i miševa s mikrobiotom prikazan je u Tablici 1. Osim sterilnih miševa, u istraživanjima se često

koriste miševi kojima je antibioticima širokog spektra reduciran mikrobiom. Iako te životinje nisu u potpunosti bez bakterija, ovaj model je puno pristupačniji istraživačima, a miševi su sličniji SPF miševima po razvijenom imunološkom sustavu (koji je u GF miševa promijenjen).

Tablica 1. Anatomske i fiziološke karakteristike u kojima se aksenični miševi razlikuju od najčešće korištenih, tzv. SPF, miševa. (Prema: Al-Asmakh M: *Use of germ-free animal models in microbiota-related research* (12)).

Osobina	Razlika
Prehrana	Potreba za dodatnim vitaminom K i B Smanjen postotak masnoće u tijelu Normalan ili povišen unos hrane Povećan unos vode
Metabolizam	Snižen bazalni metabolizam Povećana sekrecija slobodnih aminokiselina i uree i smanjena ekskrecija octene kiseline Više uree i malo amonijaka u crijevnom sadržaju Više dušika u cekumu i fecesu Veći oksidacijsko – redukcijski potencijal cecalnog sadržaja Promijenjena osjetljivost na anestetike
Cirkulacija	Smanjen ukupan volumen krvi Snižen minutni volumen srca Snižen protok krvi u koži, jetri, plućima i probavnom traktu Povećana razina kolesterola, broj crvenih krvnih zrnaca i hematokrit u krvi
Jetra	Smanjena veličina Povećana razina feritina i kolesterola
Pluća	Stanjeni alveolarni i kapsularni zidovi Manje retikuloendotelnih elemenata
Crijevna morfologija	Smanjena ukupna masa crijeva Smanjena ukupna površina tankog crijeva Tanke i uniformne crijevne resice u tankom crijevu Skrraćene ilealne resice i produljenje duodenalne resice Kraće kriptе u tankom crijevu Tanja <i>lamina propria</i> tankog crijeva, s manje stanica i sporijom obnovom stanica Veći cekum s tanjom opnom
Pokretljivost crijeva	Povećano mišićno tkivo s produženim i hipertrofiranim mišićnim stanicama u cekumu
Fiziologija crijeva	Duže tranzitno vrijeme Snižena osmolarnost u tankom crijevu Povećana pritisak kisika i elektropotencijal u tankom crijevu
Funkcionalnost crijeva	Pojačana apsorpcija vitamina i minerala, promjene u apsorpciji drugih minerala
Endokrini sustav	Promijenjen enzimatski sastav, povećane razine tripsina, kimotripsina i invertaze u fecesu Visoke razine mucina (mukoproteina i mukopolisaharida) u fecesu Manje masnih kiselina i odsutstvo cikličkih i razdranatih masnih kiselina u crijevnom sadržaju, ekskrecija primarno nezasićenih masnih kiselina Smanjena apsorpcija joda u tiroidnoj žlijezdi Smanjena motorička pokretljivost i hiperresponzivnost na epinefrin, norepinefrin i vazopresin
Status elektrolita	Više alkalni cecalni sadržaj Visoke razine kalcija i citrata i niske razine fosfata u urinu Manje natrija i klorida u crijevnom sadržaju

Više je studija pokazalo da aksenični i antibiotski tretirani miševi razvijaju manje tumora od konvencionalno uzgajanih miševa (Tablica 2). Smanjena je incidencija raka pluća u akseničnim miševima, a dodatkom bakterijskog LPS-a (lipopolisaharid) taj učinak se poništava. Incidencija raka kože manja je u akseničnih miševa i u miševa kojima nedostaje

receptor za mikrobnе molekule, a redukcija mikroflоре antibioticima širokog spektra ili uzgojem u sterilnim uvjetima dovodi do smanjene stope razvoja kolorektalnih tumora u miševa. Nadalje, iako nije direktno izložena mikroorganizmima, jetra je izložena mikrobnim molekulama i metabolitima koji promoviraju razvoj tumora pa je crijevna disbioza povezana s rakom jetre (14,15).

Tablica 2. Razlike u tumorigenezi između akseničnih miševa i miševima s mikrobiotom. (Prema: Schwabe RF: *The microbiome and cancer* (14))

Vrsta tumora	Model	Rezultati
Kolarektalni rak	Aksenični miševi i spontana karcinogeneza	Manje tumora u akseničnim miševima
	Aksenični miševi i DMH-izazvana karcinogeneza	Manje tumora u akseničnim miševima
	Aksenični miševi i AOM- izazvana karcinogeneza	Više tumora u akseničnim miševima
	Aksenični miševi i MAM-GlcUA	Manje tumora u akseničnim miševima
	Aksenični miševi i AOM-izazvana karcinogeneza	Manje tumora u akseničnim miševima
	AOM u IL10–/– gnotobiotičkih životinja	Manje tumora u akseničnim miševima
	Aksenični ApcMin/+ miševi	Manje tumora u akseničnim miševima
	ApcMin/+ Cdx2–Cre miševi tretirani antibiotiskim koktelom	Manje tumora u miševa tretiranih antibioticima
	Nod1–/– miševi tretirani antibiotiskim koktelom	Manje tumora u miševa tretiranih antibioticima
	AOM plus DSS -tretirani miševi i na antibiotskom koktelu	Manje tumora u miševa tretiranih antibioticima
	Mikrobiota iz divljeg tipa transplacirana u Nod2–/– miševe	Manje tumora nakon transplantacije
Rak želuca	Helicobacter pylori-inficirani gnotobiotički INS-GAS miševi	Manje tumora u akseničnim miševima
	H. pylori-inficirani INS-GAS miševi, tretirani antibioticima	Manje tumora u miševa tretiranih antibioticima
Rak jetre	DEN i CCl4-tretirani aksenični miševi	Manje tumora u akseničnim miševima
	DEN i CCl4- tretirani miševi na antibiotskom koktelu	Manje tumora u miševa tretiranih antibioticima
	DEN i CCl4- tretirani miševi, na rifaximinu	Manje tumora miševa tretiranih rifaximinom
	DEN-tretirani štakori na neomicinu	Manje tumora miševa tretiranih neomicinom
	Miševi tretirani s DMBA i na dijeti s visokim masnim udjelom, tretirani antibiotiskim koktelom	Manje tumora u miševa tretiranih antibioticima
	Miševi tretirani s DMBA i na dijeti s visokim masnim udjelom, tretirani vankomicinom	Manje tumora miševa tretiranih vankomicinom
Rak pluća	NHMI-tretirani aksenični miševi	Manje tumora u akseničnih mužjaka
		Bez razlike u akseničnih životinja
Rak dojke	DMAB- tretirani aksenični miševi	Manji tumori u akseničnih štakora

AOM, azoksimetan; Apc, gen povezan s adenomatoznom polipozom; CCl4, ugljik tetraklorid; Cdx2, gen povezan s kolorektalnim rakom; DEN, dietilnitrozamin, hepatotoksin; DMAB, 3,2'-dimetil-4-aminobifenil hidroklorid; DMH, dimetilhidrazin; DSS, dekstran natrijev sulfat; IL10, interleukin-10; IPSID, imunoproliferativna bolest tankog crijeva; MALT, limfoidno tkivo povezano sa sluznicom; MAM-GlcUA, metilazoksimetanol-P-D-glukoziduronska kiselina; NHMI, N-nitrozoheptametenimin; NOD1, gen za receptor za mikrobnе molekule

Do sada nije opisano kako aksenični uvjeti utječu na mokraćni mjehur. Budući da je poznato da mikrobiota utječe na razvoj imunološkog sustava u crijevima, logično je pretpostaviti da mikrobiota utječe na izražaj gena povezanih s prepoznavanjem bakterija i imunološkim odgovorom u drugim organima izloženim bakterijama (14). Moguće je da je urinarna mikrobiota potrebna za razvoj i signaliziranje perifernog živčanog sustava kao što je već pokazano za mikroflору crijeva, a urinarna disbioza bi mogla biti uzrokom bolestima poput intersticijskog cistitisa (15).

1.1.2. Mikrobiota i zloćudni tumori

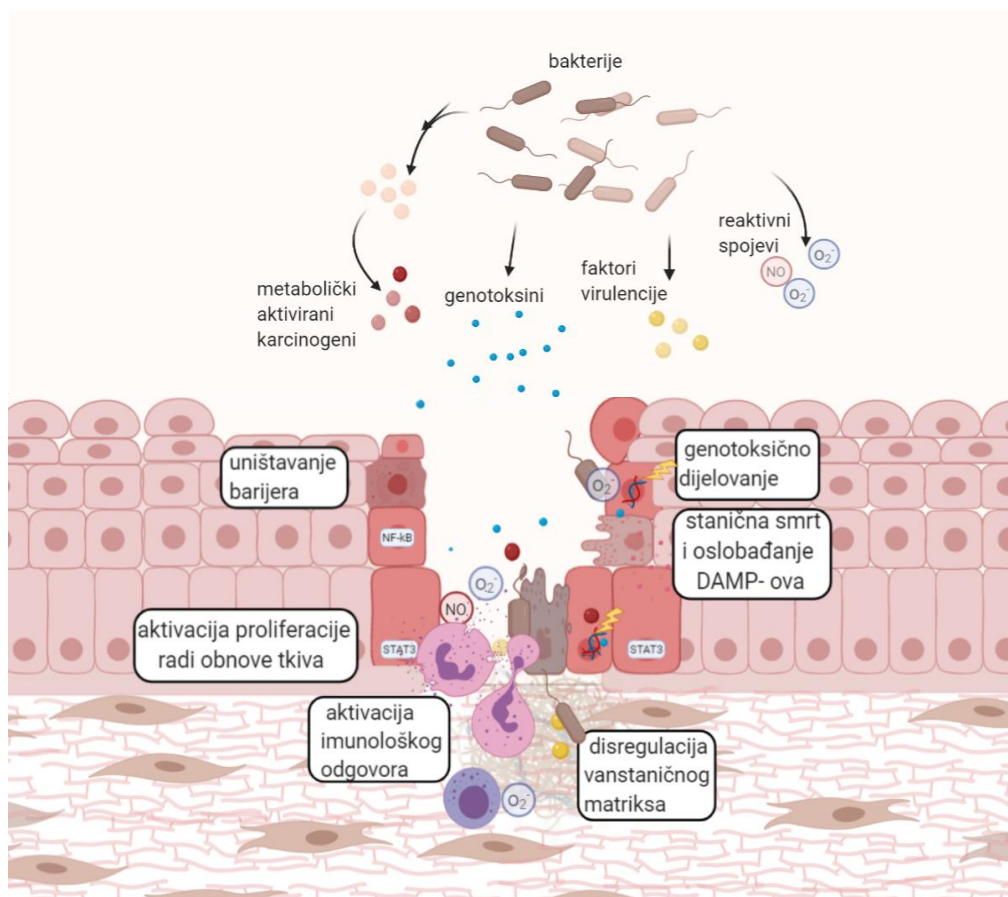
Interakcije između domaćina i mikrobiote su mnogobrojne i raznolike pa je takav i utjecaj mikrobiote na zdravlje čovjeka i pojavu bolesti. Njihov odnos ne mora biti jednoznačan

pa tako neka bakterija može biti uzročnik bolesti, a drugom kontekstu imati povoljne učinke na domaćina. Najbolji primjer je *Helicobacter pylori* čija prisutnost u želucu utječe na smanjenje rizika od alergijskih reakcija i astme u dječjoj dobi, dok u starijoj životnoj dobi može uzrokovati rak želuca. Otkriće ove bakterije koja preživljava u kiselom želučanom soku razbilo je dogmu da je želudac sterilan organ te utabalo put novom načinu liječenja čira želuca (3). Osim *H. pylori*, poznato je još nekoliko bakterija koje se povezuju s tumorima, primjerice *Salmonella enterica* povezane s tumorom žučnog mjehura, a *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi* i *Chlamydia psittaci* se povezuju s limfomima koji se najčešće povlače nakon liječenja antibioticima (14). Osim pojedinačnih bakterija koje uzrokuju rak moguće je i da zajednica mikroorganizama, određena svojim sastavom ili pak metagenomskim potencijalom, dovodi do razvoja tumora.

Bakterije mogu djelovati i protutumorski, primjerice bakterijske molekule iz Coleyevog toksina mogu dovesti do povlačenja sarkoma, a mikobakterije iz cjepiva BCG dovode do uništavanja stanica tumora mokraćnog mjehura (16,17). Ovi učinci posljedica su aktivacije domaćinovog imunološkog odgovora koji, osim bakterija, uništava i tumorske stanice.

1.1.3. Mehanizmi protumorskog djelovanja mikrobiote

Neki patogeni, poglavito virusi, promoviraju karcinogenezu oštećujući stanični genetski materijal, dok drugi uzorkuju oštećenje epitela i upalu (Slika 2)(14). Upalni odgovor dio je normalne obrane domaćina čiji je cilj eliminacija patogena. Neki patogeni djeluju tako da uspostavljaju trajne infekcije s blagom, kroničnom upalom koju prati oštećenje stanice kisikovim i dušikovim radikalima, proliferacija, angiogeneza te ispuštanje faktora rasta koji aktiviraju fenotip matičnih stanica u tumorskim progenitorima (14). Citokini poput IL-1, TNF, IL-6 i IL-23 te transkripcijski faktori AP-1, NFκB, STAT3 dio su upalnog odgovora na infekciju, ujedno su često prisutni u tumorskom mikrokolišu (18,19). Jaka aktivacija prirodene imunosti može promijeniti imunološku toleranciju na tumor u protutumorski odgovor, no bakterije rijetko potiču razinu imunološkog odgovora potrebnu za eliminaciju tumora, umjesto čega mogu poticati slabiji odgovor i tumor-promovirajuću kroničnu upalu (14).



Slika 2. Shematski prikaz tumor-potičućeg djelovanja bakterija

Uništavanje barijera između domaćina i patogena

Uništavanje epitelne barijere između domaćina i patogena može potaknuti karcinogenezu, ali može biti i posljedica karcinogeneze. Barijere između patogena i domaćina uključuju epitelni sloj, imunološke stanice, u nekim slučajevima mukozni sloj i mikrobiotu. Mikrobiota predstavlja barijeru jer pomaže održavanju i obnavljanju epitela, stvaranju mucina te suzbija rast patogenih bakterija kompeticijom za resurse i produkcijom baktericidnih molekula. Uništenjem barijera dolazi do povećane interakcije domaćina i mikrobiote i translokacije mikrobiote u tkiva domaćina. Ulaskom mikrobiote u tkivo aktiviraju se receptori koji detektiraju prisustvo bakterija te se često pokrene signalizacija za izbjegavanje stanične smrti radi održavanja epitelne barijere (14,19).

Tollu slični ili TLR receptori (engl. *Toll-like receptors*) su transmembranski receptori za patogene molekule, a koji reguliraju prirodenu imunost, upalne procese i integritet epitelnih barijera. Prepoznaju molekularne uzorke povezane s patogenima, PAMP-ovi, (od engl. *pathogen associated molecular patterns*) i molekule za signaliziranje opasnosti, DAMP-ovi, (od engl. *danger associated molecular patterns*) koji se oslobađaju prilikom oštećenja stanica. Vezanjem liganada za TLR-ove aktiviraju se nizvodni signalni putevi za preživljenje, NFκB i Stat3 (20). Ovi signalni putevi djeluju kao čuvari epitelnog integriteta, a često su aktivirani i u

tumorskim stanicama što im omogućuju da se nekontrolirano dijele. Sve veći broj dokaza govori da bakterijska aktivacija TLR-ova potiče karcinogenezu (16, 23). Primjerice TLR4 koji je receptor za lipopolisaharid, komponentu stanične stijenke Gram negativnih bakterija, promovira karcinogenezu u debelom crijevu, jetri, gušterači i koži što je pokazano sa smanjenom stopom razvoja tumora kod TLR4 deficijentnih miševa i povećanom stopom razvoja tumora kod miševa kojima je konstitutivno u epitelu aktiviran TLR4 (14).

NOD-u slični ili NLR receptori (engl. *NOD like receptors*) kao i TLR receptori prepoznaju bakterijske molekule. Miševi deficijentni za Nod2 receptor podložni su bakterijskim infekcijama te imaju tumor-promovirajuću disbiozu u crijevima. Često nije jasno je li disbioza uzrokovana upalnim procesima ili pak drugi okolišni čimbenici potiču disbiozu koja potom promiče upalne procese te karcinogenezu. Da je disbioza glavni uzrok podložnosti razvoju tumora u miševa koji nemaju Nod2 receptor (Nod2^{-/-}) pokazano je tako što je transferom disbiotičnog mikrobioma u miševе bez mutacije prenijeta i podložnost razvoju tumora. Interleukin 6 je posrednik tih učinaka budući da IL-6 neutralizirajuće protutijelo poništava tumor promovirajući efekt. Kao i Nod2, Nod1 deficijencija negativno utječe na intestinalnu barijeru i promovira upalu i kolorektalni karcinom (14,24).

Genotoksini i reaktivni spojevi

Mikrobiota može potaknuti domaćina na proizvodnju genotoksina, a može ih i sama proizvoditi. CDT (engl. *cytolethal distending toxin*) i kolibaktin (engl. *colibactin*) su primjer bakterijskih genotoksina koji izazivaju dvolančane lomove molekule DNA. CDT proizvode Gram-negativne bakterije, a kolibaktin bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*, poput *E. coli*. Genotoksična aktivnost kolibaktina zahtjeva da žive bakterije budu u direktnom kontaktu s epitelom. Iako bakterije koje produciraju kolibaktin nisu dovoljne da bi dovele do raka crijeva u eksperimentalnih životinja, u životinja koje su predisponirane razvoju raka crijeva dovode do težeg oblika bolesti (24,25).

Bakterije mogu same proizvoditi ili potaknuti domaćina na proizvodnju reaktivnih spojeva u tkivu. Leukociti na mjestu upale proizvode reaktivne kisikove spojeve poput superoksidnog aniona, vodikovog peroksida i dušičnog oksida. Ti su reaktivni spojevi važni za stanično signaliziranje, a mogu promovirati rast tumora tako što direktno uzrokuju štetu na DNA, potiču signalizaciju koja dovodi do proliferacije, angiogeneze i invazije tumora, a mogu dovesti i do stvaranja karcinogenih N-nitrozamina (14).

Faktori virulencije

Bakterije mogu faktorima virulencije izazvati rak aktivirajući signalizaciju koja potiče rast tumora. Bakterija *Fusobacterium nucleatum* faktorima virulencije promovira intestinalnu karcinogenezu u miševa koji spontano razvijaju adenome u crijevima. *Fusobacterium* se veže na molekulu izvanstaničnog matriksa adhezina FadA te preko njega na stanični receptor E-

kadherin te tako aktivira proliferacijski β -kateninski put u stanicama kolorektuma te potiče umnažanje tumorskih stanica (25,26).

Bakterijski faktori virulencije mogu uzrokovati uništavanje izvanstaničnog matriksa, kompleksne mreže proteina i proteoglikana u kojoj su citokini, faktori rasta, proangiogene i antiangiogene molekule. Bakterije proizvode kolagenaze i hijaluronidaze kojima degradiraju izvanstanični matriks radi pribavljanja nutrijenata i širenja kroz tkivo, a druge proteaze mogu inaktivirati signalne molekule poput citokina i faktora rasta te utjecati na upalni odgovori i homeostazu. Deregulacija izvanstaničnog matriksa može dovesti do stvaranja tumora, prisutna je u gotovo svim tumorima, a budući da je direktno vezana uz metastaziranje, spada među njegova najvažnija obilježja (27).

Bakterijski metabolizam u zloćudnim tumorima

Doprinos mikrobnog metabolizma karcinogenezi zasigurno je značajan, no tek se treba istražiti. Bakterije mogu metabolički mijenjati dijetalne fitokemikalije, prokarcinogene i karcinogene, hormone te stvarati tumor-promovirajuće sekundarne žučne soli (14). Istraživanja pokazuju da dijeta bogata mastima mijenja mikrobiotu i povećava razinu prokarcinogenih metabolita žučnih soli. Dijeta bogata vlaknima izvor je kratkolančanih masnih kiselina koje stvaraju crijevne bakterije, a koje su važne za očuvanje crijevnog epitela i štite od razvoja kolorektalnog raka (25).

Mnogi karcinogeni dolaze u tijelo oralnim putem stoga je često prva linija obrane od njihovog djelovanja mikrobiota probavnog sustava. Biokemijske sposobnosti mikroorganizama puno su veće od čovjekovih pa tako bakterije mogu aktivirati ili inaktivirati karcinogene koje čovjek ne može metabolizirati ili pak vezati teške metale poput kadmija i arsena te tako spriječiti njihovu apsorpciju i štetno djelovanje u tijelu (28). Mikrobiota metabolizira etanol u njegov karcinogeni metabolit acetaldehid. Iako se ovaj metabolizam dijelom odvija i u jetri, važnost mikrobiotskog metabolizma pokazuje činjenica da su količine acetaldehida značajno smanjene u serumu sterilnih miševa u odnosu na miševe s mikrobiotom (14). Mikrobiota može utjecati i na terapijsko djelovanje mnogih lijekova. Djelovanje antitumorskih lijekova ciklofosfamida i cisplatina smanjeno je u sterilnih miševa i miševa tretiranih antibioticima što ukazuje na njihovu aktivaciju u bakterijama. S druge strane *Doxorubicin*, citostatik koji se koristi u liječenju raka mokraćnog mjehura, može biti inaktiviran crijevnim bakterijama iz rodova *Streptomyces* i *Raoultella* što potencijalno utječe na uspješnost terapije ovim citostatikom (28). Sastav probavne mikrobiote također modulira učinkovitost liječenja zloćudnih tumora inhibitorima kontrolne imunološke točke (engl. *immune checkpoint inhibitors*) (29).

1.1.4. Mikrobiom mokraćnog mjehura i urina

Još sredinom 19. stoljeća i razvoja teorije klica, prvi su bakteriolozi proučavali postojanje klica, odnosno bakterija u urinu ljudi. Tada su primijetili da se urin zdrave osobe ne

zamućuje, dok se urin kojem je dodana kap vode ili je bio izložen zraku nakon određenog vremena zamuti, iz čega je slijedio zaključak da je urin zdrave osobe sterilan. Pedesetih godina prošlog stoljeća liječnik Edward Kass osmislio je metodu za detekciju urinarne infekcije - analizirajući urin pacijenata i zdravih osoba došao je do brojke od 10^5 poraslih kolonija u mililitru urina kao granične vrijednosti za određivanje prisutnosti infekcije, a bakterijske kolonije iz urina zdravih ljudi smatrao je kontaminacijom iz donjih dijelova urinarnog trakta ili kože. Dogma da je mokraćni mjehur, pa tako i urin sterilan vrijedila je i prilikom prvog projekta karakterizacije ljudskog mikrobioma (HMP) krajem prošlog desetljeća zbog čega mikrobiom mjehura nije ni uključen u taj projekt (5).

Proučavanje urinarne mikrobiote sekvenciranjem mikrobne DNA urina započinje malo nakon HMP projekta, kada je po prvi put opisan mikrobiom urina (prikupljen kateterizacijom zdravih osoba) (30). Kako bi se dokazalo da se radi o živim bakterijama, a ne samo o bakterijskoj DNA koja se je slučajno našla u urinu, razvijena je modificirana metoda kultivacije bakterija (31). Ova metoda razlikuje se od klasične urinokulture po tome što uključuje korištenje većeg volumena urina, inkubaciju u različitim uvjetima kisika i kroz duži vremenski period. Pokazano je da se mikroorganizmi identificirani 16S sekvenciranjem mogu uzgojiti u takvoj kulturi, odnosno da se radi o živim bakterijama iz mokraćnog mjehura.

Nakon otkrića mikrobioma mokraćnog mjehura (urobioma), njegova uloga u fiziologiji i bolestima mokraćnog mjehura počinje se intenzivno proučavati. Danas je poznato da bakterijski sastav mjehura ovisi o dobi, spolu i zdravstvenom stanju pojedinca, a poremećaji u mikrobiološkoj zajednici (disbioza) mjehura povezuju se s raznim bolestima urinarnog trakta (32). Bakterije u ljudskom urinu većinski pripadaju koljenima *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (33). U dosadašnjim studijama urinarnog mikrobioma zdravih žena pronađeno je 28 bakterijskih rodova, a u urobiomu muškaraca 17 rodova, od čega je 14 zajedničkih u oba spola (34). Najbrojnije bakterije u urinu zdravih pojedinaca su: *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Gardnerella* i *Streptococcus*. Pretežito *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Gardnerella* u žena te *Corynebacterium* u muškaraca. Podatci pokazuju da žene imaju raznolikiju floru s 6 do 36 rodova, dok je u muškaraca prisutno od 1 do 8 rodova. No, bez obzira na spol, najčešće preko polovice bakterija pripada koljenu *Firmicutes* (33). Nije poznato postoji li jedinstvena mokraćna mikrobiota, odnosno podskup bakterijskih vrsta koje su zajedničke u mokraćnom sustavu ljudi. Lewis i suradnici postavljaju ovu hipotezu u svom radu, s druge strane Gottschick i suradnici predlažu postojane urotipova, odnosno podtipova urobioma koje se razlikuju u sastavu, dominantnim vrstama i raznolikosti (33,35). Opisali su 7 takvih urotipova nazvanih prema jednoj ili više dominantnih vrsta: *Prevotella amnii*, *Sneathia amnii*, *Gardnerella vaginalis* i *Atopobium vaginae* (urotip 1), *Lactobacillus iners* (urotip 2), *Enterobacteriaceae* (urotip 3), *Enterococcus faecalis* (urotip 4), *Streptococcus agalactiae* (urotip 5), *Citrobacter murlinae* (urotip 6), i *Lactobacillus crispatus* (urotip 7). Fouts i suradnici opisali su zdrave urotipove za muškarce i žene: za ženski urotip je dominantan *Lactobacillus*, dok je muški dominiran Gram-pozitivnim bakterijama (35).

Pronađeni su zajednički sojevi *Escherichia coli*, *Streptococcus anginosus*, *Lactobacillus iners* i *Lactobacillus crispatus* i u mjehuru i u rodnici, što ukazuje na postojanje jedinstvene urogenitalne mikroflore u žena (36).

Razlike u mikrobioti mogu biti posljedica promjene urinarnih metabolita, osobne higijene i navika mokrenja. Isto tako hormonalne promjene u pubertetu i menopauzi, konstipacija i urinarna inkontinencija te seksualna aktivnost utječu na urobiom (37). Dijeta i količina popijene vode može utjecati na rizik urinarnih infekcija, pijenje prevelike količine vode može povećati šansu za urinarnu infekciju na način da razrjeđuje urinarne faktore koji inhibiraju vezanje bakterija (38). Poput intestinalne mikroflore urobiom se mijenja sa životnom dobi te se raznolikost bakterija smanjuje, a pojavljuju se novi rodovi poput *Jonquetella*, *Parvimonas*, *Proteiniphilum* i *Saccharofermentans* u ljudi iznad 70 godina (32).

Važno je naglasiti da način prikupljanja urina može utjecati rezultat analize urobioma (39). Većina ovdje citiranih studija koristi urin srednjeg mlaza koji se inače koristi za određivanje urinarnih infekcija bakterijskom kulturom. Uretra i rodnicica imaju svoj mikrobiom te mogu biti izvor kontaminacije za proučavanje mikrobioma mokraćnog mjehura. Nadalje, uzorkovanje urina srednjeg mlaza moguće ne detektira bakterijske zajednice u biofilmovima u mjehuru koje se vežu na sluznicu pa uzimanje mikrobioma urina moguće pojednostavnjuje stvarno stanje unutar mjehura (27). Usprkos tome, prikupljanje urina srednjeg mlaza ostaje najbolja neinvazivna metoda za proučavanje urobioma u slučajevima kad kateterizacija nije medicinski opravdana. U radu Hourigana i suradnika, uspoređivane su metode za kolekciju urina za ispitivanje mikrobioma kod pacijenata s rakom mokraćnog mjehura. Njihovi rezultati su pokazali da ne postoje značajne razlike u mikrobiomu za muškarce za dvije metode prikupljanja uzoraka, odnosno nisu pronađene značajno različito prisutne bakterije (40).

Neke od bolesti koje su do sada povezane s promijenjenim urinarnim mikrobiomom su: neuropatski mjehur, urgentna urinarna inkontinencija, kronični intersticijski cistitis, dijabetes tipa 2, kronični simptomi donjeg urinarnog trakta i rak mokraćnog mjehura (38,41–45). Pronađen je i povećani rizik za razvoj post-operativnih infekcija urinarnog trakta u žena sa specifičnom mikrobiotom (46). Najčešći patogeni u urinoinfekcijama su *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae* te Gram-pozitivni rodovi *Aerococcus*, *Corynebacterium*, *Actinobaculum* i *Gardnerella*. Navedene bakterije su često previđene u urinokulturi zbog ograničenja u bolničkim laboratorijima (47).

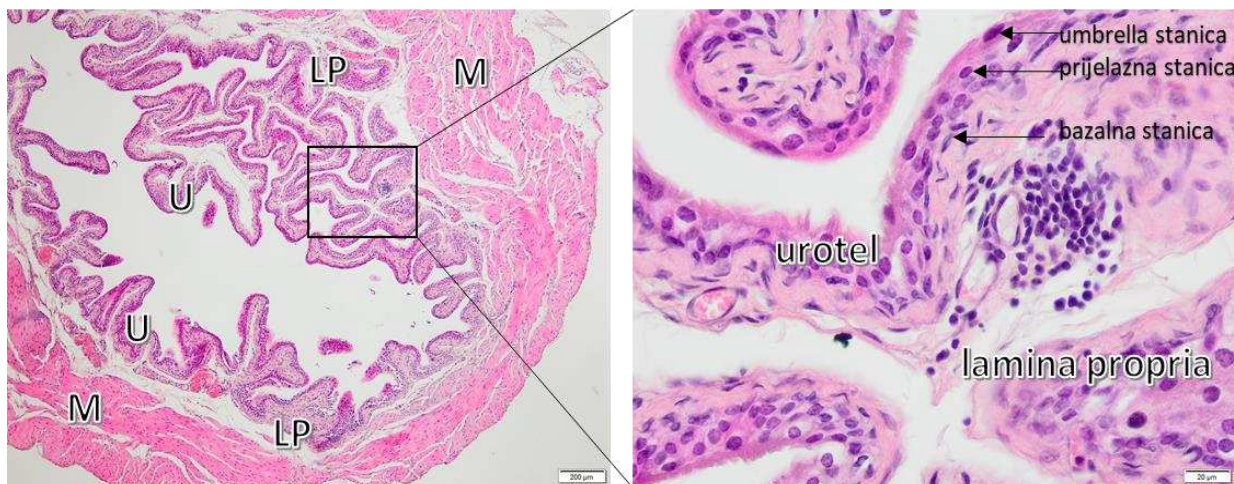
1.2 Karcinom mokraćnog mjehura

1.2.1. Građa mokraćnog mjehura i urotela

Mokraćni mjehur je šuplji, rastezljivi organ smješten u maloj zdjelici. Osnovna anatomska podjela je na svod ili gornji dio, tijelo te bazu, odnosno donji dio mjehura. U bazi mjehura se nalazi se trigonum, trokutasta površina omeđena unutrašnjim uretalnim otvorom i ušćima mokraćovoda. Površina trigonuma je ravna, nenabrana sluznica, dok ostali dijelovi imaju nabranu sluznicu koja se rasteže prilikom punjenja mjehura mokraćom. Cijeli mjehur je obavijen mišićem detrusorom, a u bazi se nalazi zadebljanje mišića što omogućuje kontrolu mokrenja (48). Mišić detrusor se relaksira bez utjecaja volje prilikom punjenja mjehura urinom te se kontrahira pod utjecajem volje prilikom ekskrecije urina. Kontrola tonusa i regulacija kapaciteta mjehura se odvija u centru za mikturiciju u mostu u malom mozgu (49,50).

Histološki je mokraćni mjehur građen od tri sloja - vanjske adventicije, srednjeg mišićnog sloja i unutrašnje sluznice. Sluznica se dalje dijeli na sloj vezivnog tkiva (*lamina propria*) i urotel, prijelazni epitel koji obavlja unutarnji lumen mjehura (**Slika 3**) (51). Urotel se sastoji se od više slojeva stanica, u čovjeka od 3 do 10 slojeva, u miševa je uglavnom građen od tri sloja koji se mogu kontrahirati i proširiti kako bi se prilagodili rastegnutosti mjehura. Stanice iz svih slojeva urotela su povezane na bazalnu membranu pomoću staničnih filamenata što omogućuje epitelu da podnosi širenje. Slojevi imaju polariziranu arhitekturu s rastućom kompleksnošću i diferencijacijom od baze prema površini. Prisutne su tri vrste stanica, bazalne kubične stanice pričvršćene bazalnu membranu, prijelazne stanice te površinske stanice koje se zbog oblika nazivaju *umbrella* ili kišobranu nalik stanice. Bazalne stanice su male, jednoslojne i služe kao prekursori za ostale stanice epitela. Prijelazne stanice tvore sloj nejednake debljine, brzo proliferiraju te služe za oporavak stanica u slučaju ozlijede ili infekcije. Visoko specijalizirane *umbrella* stanice su velike stanice heksagonalnog oblika, imaju dug vijek trajanja i brzo se obnavljaju kad je epitel oštećen. Imaju specijaliziranu površinu s plakovima sastavljenim od molekula uroplakina, mukoznog sloja i mikrovila. Luminalna površina ovih stanica čini neprobojnu barijeru između sadržaja lumena i tkiva koja sprječava apsorpciju štetnih tvari i patogena iz urina (51,52). Luminalna površina ovih stanica čini neprobojnu barijeru između sadržaja lumena i tkiva koja sprječava apsorpciju štetnih tvari i patogena iz urina (52).

Urotel je povezan sa živčanim i vezivnim tkivom što mu omogućuje da se u određenom trenutku proširi ili kontrahira. Izražava nikotinske, muskarinske, adrenergične, tahikininske, bradikininske i transientne receptore, ispušta kemijske medijatore poput ATP-a i acetilkolina koji reguliraju aktivnost živaca i potiču promjene u okolnim žilama ili provode kontrakcije mjehura (53).



Slika 3. Histološka građa mokraćnog mjehura miša. Lijevo: slojevi mokraćnog mjehura - mišićni sloj i sluznica (lamina propia i urotel). Desno: Poblje sluznica i stanice urotela. (M – mišić, LP – lamina propia, U – urotel)

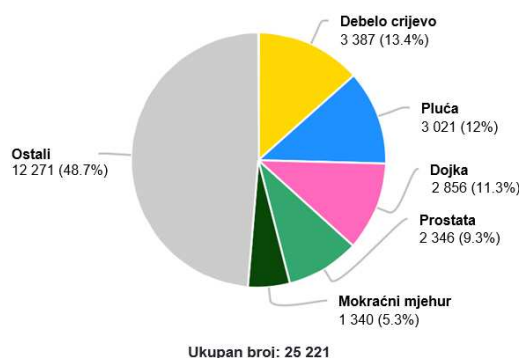
1.2.2. Epidemiologija

Rak mokraćnog mjehura je deseti najčešći karcinom i najčešći karcinom urogenitalnog trakta u svijetu. Ekonomski teret raka mokraćnog mjehura je znatan, prema nekim studijama ovaj rak ima najveće troškove po pacijentu od svih vrsta karcinoma (54,55). Svjetska zdravstvena organizacija predviđa porast broja oboljelih od raka mokraćnog mjehura u narednih 15 godina zbog produljivanja životnog vijeka te činjenice da se većina raka mokraćnog mjehura dijagnosticira u dobi iznad 65 godina (56). Iako smrtnost od raka mokraćnog mjehura opada u razvijenim zemljama, u Hrvatskoj stagnira (57).

Većina tumora mokraćnog mjehura potiče iz urotela, unutarnje sluznice mokraćnog mjehura, neinvazivna je te često recidivira. Rak koji se iz epitela proširi na mišićni sloj mjehura, prisutan u otprilike petine pacijenata, najagresivniji je oblik raka te zahtijeva teško i cjeloživotno liječenje, a stopa preživljenja znatno manja nego u neinvazivnih tumora. Mortalitet se nije značajno mijenjao budući da ne postoji lijek za metastatsku bolest (57).

Rak mokraćnog mjehura je češći kod muškaraca nego kod žena, s učestalošću i stopom smrtnosti od 9,6 i 3,2 na 100 000 muškaraca te 2,4 i 0,9 na 100 000 žena, što ga čini otprilike 4 puta češćim u muškaraca nego u žena na globalnoj razini. 2018. godine od raka mokraćnog mjehura oboljelo je 549.393 osoba, što predstavlja 3% od ukupnog broja novooboljelih od raka, a umrlo je 199.922, odnosno 2.1% od ukupnog broja umrlih od raka za tu godinu (54). Stopa incidencije kod oba spola najviša je u južnoj Europi, zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi. Općenito je ovaj rak češći u razvijenijim zemljama u odnosu na manje razvijene. Mogući razlog je razlika u izlaganju rizičnim čimbenicima iz okoliša ili pak razlike u uvrštavanju tumora niskog malignog potencijala u ukupan broj bolesti (57). U Hrvatskoj je peti najčešći rak u ukupnoj populaciji s otprilike 1300 novih slučajeva godišnje, što predstavlja oko 5% od ukupnog broja novih slučajeva raka (Slika 4). Incidencija u muškaraca je 23.3 slučaja na 100

000 ljudi, dok je u žena taj broj 6.1. Smrtnost je 4.2 na 100 000 ljudi što ga čini 6. najsmrtonosnijim rakom u Hrvatskoj (Izvjješće Globocan za Hrvatsku, *Croatia factsheet Globocan 2018*).



Slika 4. Udio najčešćih vrsta karcinoma u Hrvatskoj u ukupnom broj karcinoma za oba spola u 2018. godini. Karcinom mokraćnog mjehura je 5. najčešći karcinom u Hrvatskoj s 1340 novih slučajeva u 2018. godini. (Preuzeto iz UN izvješća *Croatia factsheet Globocan 2018*)

1.2.3. Čimbenici rizika

Glavni čimbenici rizika za razvoj ove bolesti su izlaganje karcinogenima, ponajviše onima iz duhanskog dima, zagađenoj vodi za piće te aromatskim aminima koji se koriste u kemijskoj industriji (57). Pretpostavlja se da su za razlike u incidenciji po spolovima zaslužne veće stope pušenja kod muškaraca i češće bavljenje poslovima u kojima prijeti izloženost okolišnim čimbenicima, primjerice industrijskim karcinogenima. Danas se stope pušenja i izloženosti okolišnim čimbenicima izjednačuju, no stope incidencije i dalje ostaju manje u žena. Prema nekim istraživanjima u razvoj tumora mokraćnog mjehura uključeni su i spolni hormoni, no njihova uloga se još uvijek ispituje (58). Postoje određeni dokazi o genetskim predispozicijama za razvoj ove bolesti, poglavito geni koji reguliraju metabolizam karcinogena. Varijabilnost u strukturi i funkciji enzima N-acetiltransferaza 2 (NAT2) i glutation-S-transferaza M1 (GSTM1) koji su uključeni u metabolizam kancerogena duhanskog dima povećavaju rizik za obolijevanje (59). GWAS studija je pokazala poveznicu između transportera uree SLC14A1 i razvoja bolesti, gena koji kontrolira koncentraciju urina te može utjecati na kontakt karcinogena s urotelom (57). Postoje snažni dokazi o povezanosti arsena u vodi za piće i raka mokraćnog mjehura. Mogući su i sinergistički učinci prehrambenih čimbenika, pušenja i izloženosti arsenu. Mehanizam razvoja tumora pod utjecajem arsena nije otkriven (60).

Tumori mokraćnog mjehura mogu biti uzrokovani kroničnom upalnom zbog infestacije parazitom *Schistosoma haematobium*. Ovaj parazit polaže jajašca u tkivu mokraćnog mjehura izazivajući iritaciju, fibrozu tkiva i metaplaziju koja može dovesti do raka. Najčešći su slučajevi su u manje razvijenim zemljama na Bliskom istoku, pogotovo u Egiptu, a posljednjih godina se s preventivnim tretmanom lijekom *Praziquantel* i ulaganjem u pročišćavanje vode drastično smanjio broj rakova uzrokovanih ovim parazitom (61).

Čimbenici rizika vezani uz zanimanje

Smatra se da je za 7% tumora mokraćnog mjehura u muškaraca te 2% u žena, uzrokovano izlaganjem štetnim tvarima na radnom mjestu. Karcinogeni 2-naftilamin, 4-aminobifenil i benzidin se mogu nalaziti u proizvodima iz kemijske, industrije boja i guma, također u bojama za kosu, industrijskim bojama, fungicidima, duhanskom dimu, plastici, metalu i ispustu motornih vozila te ispuštima iz industrijskih postrojenja. Benzidin se smatra najpotentnijim od njih, dovodi do čak 35 puta većeg rizika za razvoj ovog raka. Većina industrijskih karcinogena koji su povijesno bitni za razvoj raka danas je zabranjena. Ipak, broj kemikalija koje se povezuju s rizikom od razvoja raka mokraćnog mjehura raste, a vrijedi naglasiti da je potrebno nekoliko desetljeća od izloženosti do pojave raka (57).

Zanimanja koja su povezana s većim rizikom od razvoja raka mokraćnog mjehura su radnici u duhanskoj industriji i industriji boja, dimnjačari, konobari, frizeri, kuhari, stjuardi, radnici u grafičkoj industriji i pomorci. Radi se o malom povećanju rizika kad se kontrolira za pušenje, no ipak sugerira postojanje određenih okolišnih čimbenika u ovim profesijama koji dovode do raka mokraćnog mjehura (62).

Pušenje

Pušenje je najčešći rizični faktor za razvoj raka mjehura odgovoran za polovinu svih slučajeva, no s vremenskim odmakom od 20 do 30 godina od izloženosti do dijagnoze. Današnje stope incidencije su najviše u regijama koje su imale najveći udio pušača u osamdesetim godinama prošlog stoljeća (63). Pušenje je jedan od glavnih uzroka preventabilnih smrti u svijetu i jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj tumora mokraćnog mjehura. U duhanskom dimu se nalazi preko 7000 štetnih tvari od kojih su mnoge kancerogene, a mnoge su povezane s razvojem raka mokraćnog mjehura (64). Muškarci koji puše imaju 3.89 veću šansu dobiti rak mokraćnog mjehura (95% CI: 3.46 - 4.37), dok za žene vrijedi 4.65 puta veći rizik za pušačice (95% CI: 3.73 - 5.79). Što je veća doza i pušački staž, veći je i rizik od obolijevanja (65).

1.2.4. Dijagnoza i liječenje

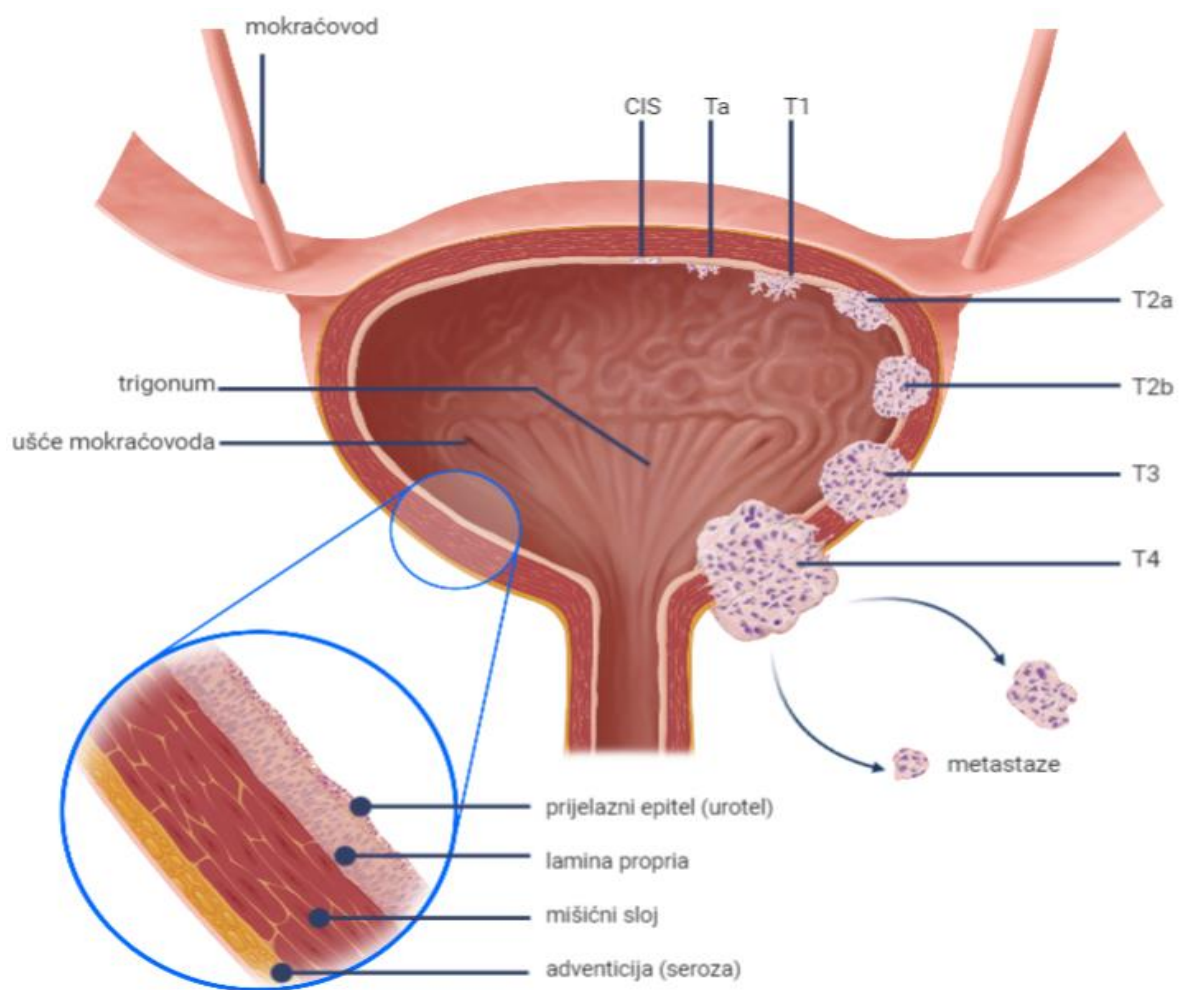
Rak mjehura uglavnom se dijagnosticira nakon bezbolne mikroskopske ili makroskopske hematurije. Osim toga često mokrenje i potreba za mokrenjem te teškoće s mokrenjem su česte kod ljudi s rakom mjehura. Evaluacija se obavlja cistoskopski, a bilo kakve promjene na urotelu uzimaju za analizu (transuretralna biopsija ili resekcija čitavog područja). Plosnati *carcinoma in situ* (CIS) se teško cistoskopski dijagnosticira budući da izgleda kao normalno tkivo mjehura te je potreban citološki nalaz kako bi se pronašle atipične stanice. Trenutačno ne postoje urinarni markeri za tumor koji pokazuju dovoljnu osjetljivost i specifičnost kako bi zamijenili cistoskopski pregled (57).

Prognoza i liječenje ovise o histopatologiji tumora koja predstavlja jedini pouzdani mjerljivi čimbenik tumorske biologije za određivanje liječenja raka mokraćnog mjehura. Za

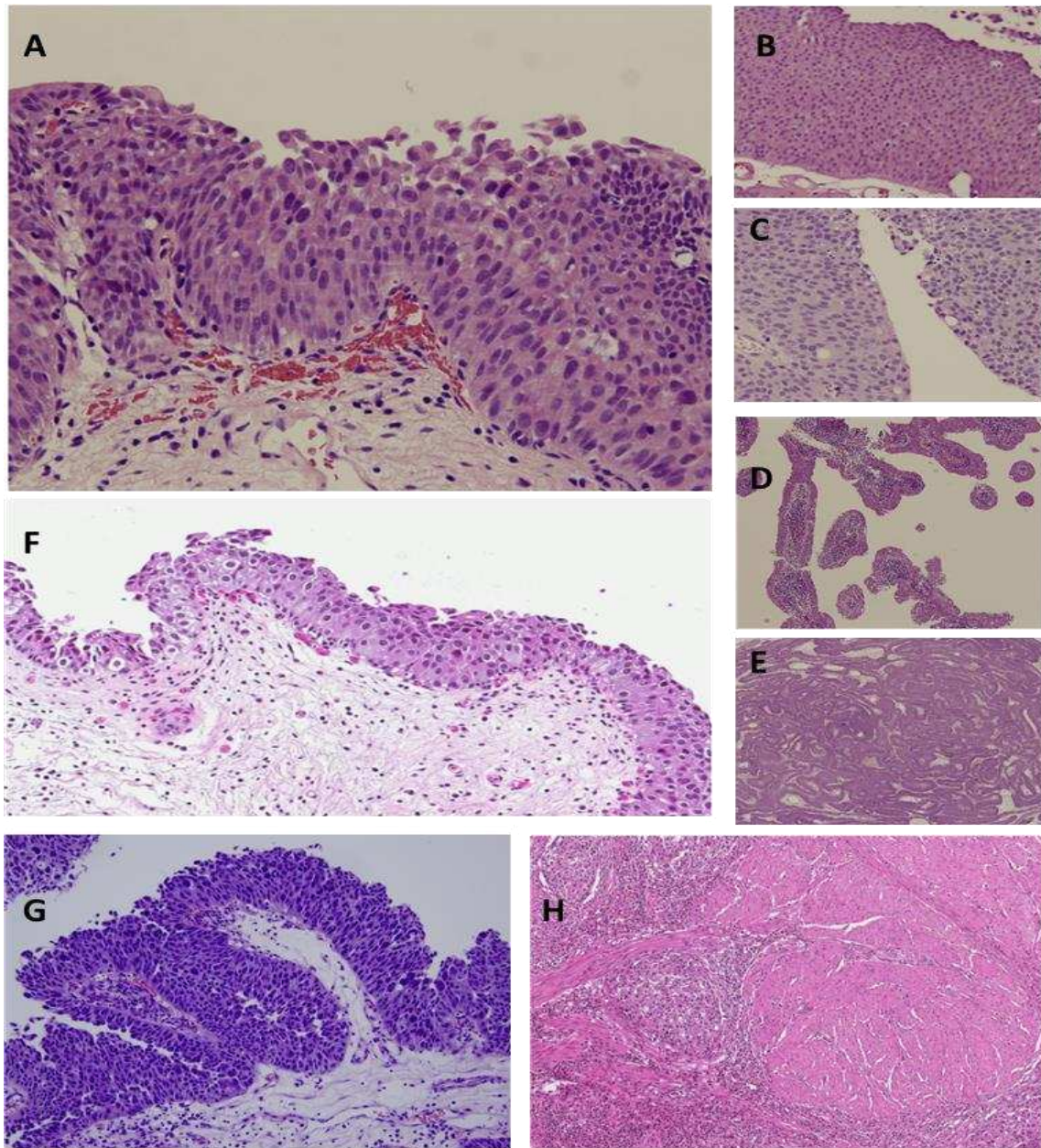
točnu histološku procjenu bitno je da transuretralna resekcija uključuje i dio mišića te se zbog rizika od krivog procjenjivanja stadija često ponavlja resekcija. Uz tumorski stadij, gradus je bitan za određivanje liječenja budući da su nisko diferencirani tumori agresivniji od visoko diferenciranih (66). Kako bi se uskladile interpretacije patohistoloških kriterija te omogućilo uspoređivanje rezultata različitih studija, razvijeni su standardizirani sistem izvještavanja o patologiji tumora mokraćnog mjehura - *International Collaboration on Cancer Reporting* (ICCR), a u 2016. Svjetska zdravstvena organizacija izdala je klasifikaciju tumora urinarnog sustava i muških spolnih organa (66,67).

Stadiji

Stadiji tumora se određuju prema TNM klasifikaciji (Slika 5 i Slika 6) (68). Ta i T1 stadiji su papilarni tumori koji su ograničeni na mukozni sloj. Ta tumori su ograničeni na urotelni sloj, dok su T1 tumori prodrli u laminu propriu. Prepoznavanje invazije u laminu propriu je jedan od najvećih izvora neslaganja u patološkim procjenama, čak i među uropatolozima. Problematičnim su se pokazali invertirani rast niskogradusnog tumora, lezije koje guraju granicu tumora prema lamini propriji, bez da tumor ne prodire subepitelni prostor. Ugniježdeni tip invazivnog karcinoma može biti problematičan za dijagnosticiranje budući da ima sličnosti s invertiranim rastom neinvazivnih tumora, poglavito u slučajevima kad tumor nema određujuće karakteristike invazije (66). *Carcinoma in situ* (CIS) je plosnat, slabo diferenciran tumor ograničen na mukozni sloj. Makroskopski ga je teško diferencirati od običnog tkiva, dok su mikroskopski su vidljive neuredno poslagane stanice s velikim, pleomorfim jezgrama (69,70). Tumori stadija T2 su prešli u mišićni sloj, a dijele se na početno invazivne (T2a) i duboko invazivne (T2b). T3 tumori su prodrli u perivezikalno tkivu (T3a mikroskopski, T3b makroskopski). T4a tumori su prešli u prostatu, maternicu, rodnicu i crijevo, dok su se T4b tumor se proširili na zdjelični ili trbušni zid (68). N stadiji odnose se na prisutnost tumorskih metastaza u jednom (N1), odnosno više limfnih čvorova unutar zdjelice (N2) te u limfnim čvorovima ileuma (N3). M1a stadij označava metastaze u udaljenim limfnim čvorovima, a M1b metastaze van limfnih čvorova (68).



Slika 5. Shematski prikaz građe mokraćnog mjehura i T stadija raka mokraćnog mjehura. (Autor: Fabio Leone)



Slika 6. Karcinomi mokraćnog mjehura **A** Urotelna displazija – prisutan blagi gubitak polarosti, zbijene i povećane jezgre **B** Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala - vidljive su stiješnjene stanice s blago povećanim jezgrama **C** Neinvazivni papilarni urotelni karcinom niskog gradusa - vidljiv gubitak polarosti i pleomorfne jezgre **D** Urotelni papilom – prisutne papilarne strukture bez stanične atipije **E** Invertirani urotelni papilom **F** Urotelni *carcinoma in situ* - nasumično poredane stanice i zbijene, velike, pleomorfne jezgre s više jezgri **G** Neinvazivni papilarni karcinom visokog gradusa – jezgre raznolikih, nepravilnih oblika, papile srasle u jedinstvenu masu. **H** Mišićno-invazivni karcinom – urotelne stanice invadiraju u mišić. (Preuzeto iz: Y. Kim: *Histological Classification of Bladder Tumors* (70))

Gradiranje

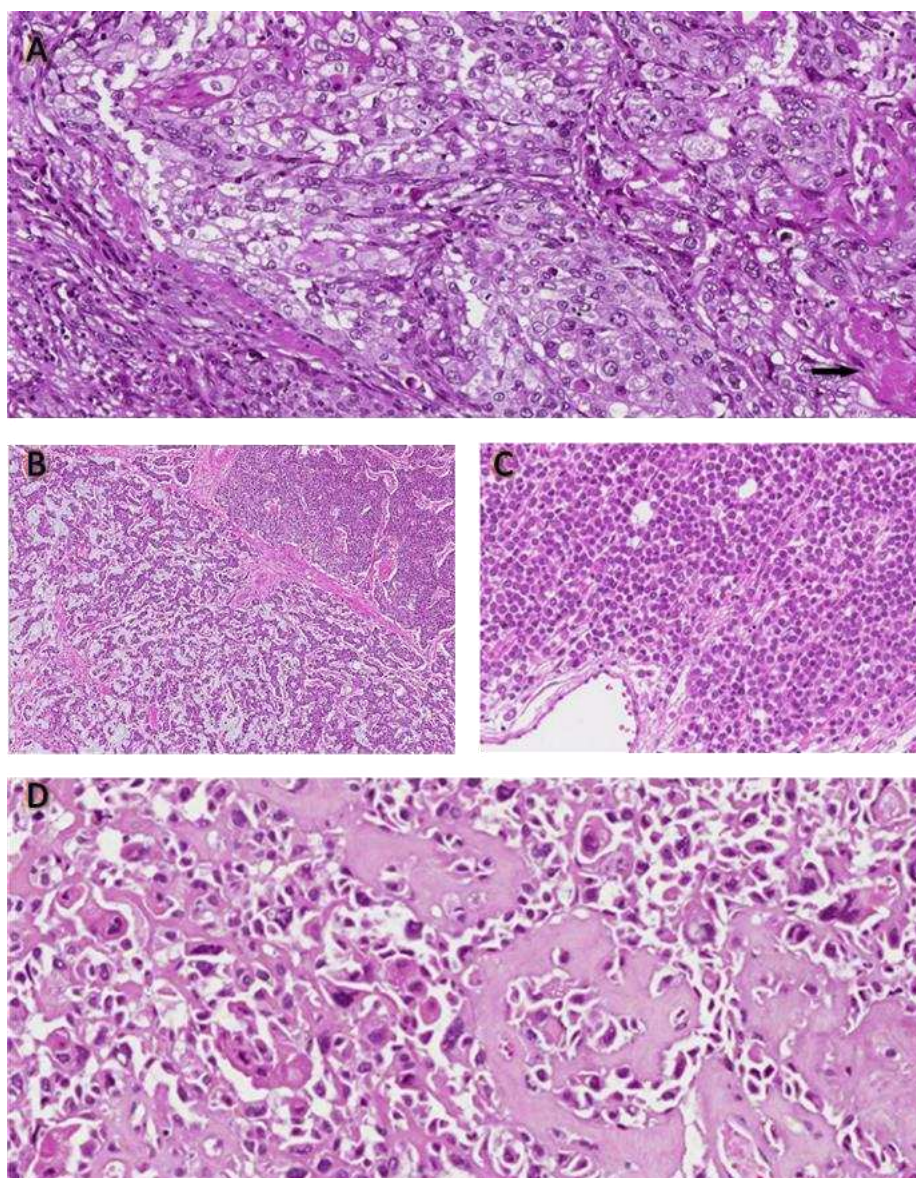
Gradiranje urotelnih tumora je bitno u neinvazivnim oblicima bolesti, posebno papilarnim neoplazmama. Mali postotak invazivnih neoplazmi je niskogradusno te su u većini slučajeva invazije ograničene na laminu propriu. Mišićno invazivni tumori su uvijek visokogradusni (66).

Postoje tri kategorije neinvazivnih tumora: papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala, Ta niskog gradusa i Ta visokog gradusa. Papilarna urotelna neoplazma niskog malignog potencijala predstavlja leziju s tankim papilama i normalnim, minimalno atipičnim urotelom, a prognoza za ovu bolest je jako dobra. Ta karcinomi niskog gradusa imaju skladno raspoređene papile te blagu atipiju stanica s razlikama u veličini i obliku, hiperkromatskim jezgrama i rijetkom mitozom. Visoko gradusni Ta tumori imaju jako neuredan izgled, slabo organiziranu arhitekturu i mnoge mitotske stanice (66,70).

T1 tumori isto mogu biti nisko i visoko gradusni, dok se T2-T4 smatraju visoko gradusnim. *Carcinoma in situ* ili CIS je visoko gradusni tumor.

Rak mjehura obuhvaća histološki različite varijante uključujući rak skvamoznih stanica, adenokarcinom i karcinom malih stanica (Slika 7). Visokogradusni urotelni karcinom imaju sklonost divergentne diferencijacije u skvamozne i glandularne histologije. Divergentna histologija tumora mokraćnog mjehura se povezuje s gorom prognozom (70).

Često maligne tvorevine imaju histologiju između visokog i niskog gradusa te se odluka donosi na temelju prethodnih ili konkominantnih CIS lezija i citoloških nalaza. Ukoliko tumori pokazuju karakteristike niskogradusne lezije, no ujedno pokazuju jednu od karakteristika visokogradusnih lezija, pristupa im se kao visokogradusnim. Gradusna heterogenost se pojavljuje u velikom broju papilarnih lezija, a prema nekim studijama preporuča se zadržati najveći prisutan gradus. Prema drugim studijama lezija se može smatrati niskogradusnom ako visoki gradus ne prelazi 5% tumora (66).



Slika 7. Divergentna diferencijacija invazivnih tumora mokraćnog mjehura. **A** Skvamozna diferencijacija (strelica pokazuje keratinizaciju). **B** Glandularna diferencijacija. **C** Plazmacitoidna diferencijacija. **D** Sarkomatoidna diferencijacija. (Preuzeto iz: Y. Kim: *Histological Classification of Bladder Tumors* (70))

Liječenje

Intravezikalna instilacija BCG nakon transuretralne resekcije je standardna terapija za mišićno- neinvazivne stadije tumora od (Ta do T1). Uključuje ubrizgavanje BCG-a direktno u mjehur na mjesto resekcije (57). Povezana je sa smanjenim rizikom od napredovanja bolesti u mišićno-invazivni stadij. U usporedbi s intravezikalnom kemoterapijom, također ima manji rizik od recidiva, no rizik od štetnih učinaka je veći, a u rijetkim slučajevima može doći i do sepse (71). Do 40% pacijenata ne odgovara na terapiju BCG-om te neki od njih imaju čak

povećan rizik od progresije bolesti (72). Zbog značajnog rizika od ponavljanja i napredovanja bolesti potrebni su redoviti cistoskopski pregledi pacijenata s neinvazivnim tumorima (73).

Radikalna cistektomija se primjenjuje kod ljudi s mišićno invazivnim tumorima te ponekad se razmatra za pacijente s tumorom stadija T1 koji nisu odgovorili na intravezikalnu terapiju. Nakon radikalne cistektomije izvodi se operacija urinarne diverzije koristeći segment ileuma ili ugradnja ortopičnog mjehura. Nakon radikalne cistektomije 10-godišnje preživljenje varira od 86% do 45% ovisno o tumorskom stadiju. Radikalna resekcija je alternativna metoda kojom se mjehur očuva te se koristi za pacijente kojima radikalna cistektomija i kemoterapija nisu opcija. Za pacijente s metastatskom bolesti kao primarna terapija koristi se sistemska kemoterapija, dok se sistemska imunoterapija s inhibitorima kontrolnih točaka ispituje kao primarna terapija u nekoliko kliničkih studija, a neki oblici su već odobreni kao sekundarna terapija (57).

1.2.5. Molekularni okoliš

Dva su glavna oblika raka mokraćnog mjehura: mišićno neinvazivni i mišićno invazivni tumori. Ova dva oblika tumora imaju različite patološke i molekularne karakteristike. Smatra se da neinvazivni oblik nastaje u prijelaznim stanicama urotela, dok invazivni nastaje u prijelaznim ili bazalnim stanicama urotela. Različito počelo ova dva tipa tumora određuje i ograničava molekularne događaje koje će se dogoditi tijekom razvoja tumora. Mišićno invazivni luminalni tumori pokazuju papilarnu histologiju te ekspresiju markera urotelne diferencijacije, dok bazalni tumori izražavaju markere bazalnog sloja urotela, mnogi pokazuju skvamoznu diferencijaciju te markere epitelno mezenhimalnog prijelaza (57,74). Bazalni tumori imaju mnogo goru prognozu te su češći u žena (70).

Rak mjehura je često multifokalan, iako se većinski radi o tvorbama istog klonalnog porijekla. Prvo velike dijelove urotela zamjeni monoklonalna ekspanzija tumor-prekursorskih stanica, zatim daljnja subklonalna molekularna evolucija dovede do formacije više tumorskih tvorbi. Prekursorske stanice najčešće imaju normalnu ili displastičnu morfologiju, a u sebi sadržavaju mutacije i gubitak heterogenosti raznim kromosomskim lokacijama karakterističnim za rak mjehura (57).

U mišjem modelima česte su delecije kromosoma 9 i točkaste mutacije u Fgfr3 u mišićno neinvazivnim tumorima (75). S druge strane, razvoj mišićno invazivnih tumora zahtijeva inaktivaciju jednog ili više tumor supresorskih gena poput Trp53, Rb1 i Pten. Niska ekspresija Hrasa dovodi do razvoja plosnatih ili papilarnih urotelnih lezija dok visoka ekspresija dovodi do mišićno neinvazivnih tumora. Slično je i kod ljudi, pacijenti s CIS-om imaju veći rizik od razvoja invazivnog oblika tumora. Mutacije TP53, povišena ekspresija CK20 i HER2 i snižena ekspresija PTEN-a s pojačanim PI3K signalnim putem su karakteristične za ovaj oblik raka. U mišićno neinvazivnim tumorima prosječno je prisutno 169-195 mutacija, dok je u invazivnih ta brojka 302. Uz FGFR3 česte su mutacije u RAS-MAPK putu te aktivacija PIK3CA. Aktivacija FGFR1 je povezana s epitelno-mezenhimalnom

tranzicijom kojom stanice dobivaju sposobnost migracije i invazije te se pretpostavlja da ima ulogu u metastaziranju (57).

Molekularni podtipovi prema transkripcijskom profilu trenutno predstavljaju najbolje definirane podtipove. Više studija je opisalo više različitih podjela na molekularne podtipove koji se ne mogu jednostavno dovesti na isti nazivnik (66).

1.2.6. Uloga upale u razvoju tumora mokraćnog mjehura

Protumorigenska upala

Poveznicu upale i karcinoma prvi je hipotetizirao Virchow još 1863. vidjevši da ozljede tkiva uzrokovane iritantima i posljedična upalna reakcija dovode do pojačane stanične proliferacije (76). Danas se smatra da je otprilike 20% tumora uzrokovano kroničnom upalom izazvanom infekcijom (18). Upalni mikrookoliš stvara bitne preduvjete za tumor: povećava mutacijsku stopu te proliferaciju mutiranih stanica. Povećavanje stope mutacija može biti uzrokovano ispuštanjem čestica koje izazivaju DNA oštećenja, a proliferacija mehanizmima za cijeljenje tkiva od štete izazvane upalom (23).

Neki epidemiološki dokazi upućuju na to da upala ima tumor potičuće djelovanje u mokraćnom mjehuru, primjerice osobe koje dugoročno piju aspirin imaju manji rizik od razvoja ovog raka, a infekcije urinarnog trakta i cistitis se povezuju s povećanim rizikom (28,77). Nadalje, u pretkliničkim studijama je pokazano da protuupalni lijekovi usporavaju razvoj tumora mokraćnog mjehura u laboratorijskih životinja (78). Urinarne infekcije, pijesak, kamenci, divertikuli ili iritacije zbog kateterizacije mogu izazvati skvamoznu ili glandularnu metaplaziju kao odgovor na kronične upalne stimulanse, a ukoliko se radi o ponavljajućoj kroničnoj upali, metaplazija može prijeći u rak (78).

Makrofagi i dendritičke stanice su glavne rezidentne imunološke stanice u mjehuru. Makrofagi fagocitiraju prodirujuće patogene i izlučuju citokine koji privlače monocite i neutrofile na mjesto infekcije te prezentiraju antigene T stanicama. Neutrofili i makrofagi na mjestu upale proizvode reaktivne kisikove čestice koje mogu djelovati genotoksično (79). M2 makrofagi aktiviraju mehanizme za cijeljenje u svom okolišu od kojih su neki, poput transkripcijskih faktora ZEB, SNAIL i TWIST koji induciraju epitelno mezenhimalni prijelaz i metastaziranje, a povećani broj M2 tipa makrofaga povezan je s lošom prognozom raka mokraćnog mjehura (78). Polimorfizmi u TNF α , upalnom citokinu kojeg prvenstveno stvaraju aktivirani makrofagi, povezani su s povećanim rizikom za razvoj raka mokraćnog mjehura (78). Nadalje, interleukin 6, glavni proupalni citokin makrofaga, ima povećan nivo koncentracije u urinu i serumu ljudi s težim oblikom raka mokraćnog mjehura. Mogući mehanizam djelovanja makrofaga na tumor je aktivacija JAK/STAT3 signalnog puta koji doprinosi epitelno mezenhimalnom prijelazu, proliferaciji i angiogenezi, a na mišjem modelu pokazano je da aktivacija STAT3 puta dovodi do razvoja invazivnih oblika raka iz CIS-a (80, 81). Podtipovi T limfocita su povezani s različitim ulogama u razvoju tumora. Prisustvo T

regulatornih limfocita povezano je s lošom prognozom, a Fas/Fas ligand sistem za programiranu staničnu smrt posredstvom citotoksičnih T limfocita je bitan za antitumorski imunološki odgovor. Stanice raka mokraćnog mjehura imaju mehanizam za izbjegavanje ovog odgovora tako da ne izražavaju Fas ili imaju otpornost na nizvodne učinke Fas potaknutog signaliziranja (78).

Upala često dovodi do degradacije u izvanstaničnom matriksu. Mnogi geni koji su uključeni u modeliranje izvanstaničnog matriksa su povezani s progresijom urotelnih karcinoma i lošom prognozom. Oni ne uzrokuju transformaciju stanica, ali podržavaju druge aspekte malignog fenotipa poput proliferacije, migracije, rezistencije na apoptozu i epitelno mezenhimalnu tranziciju (27).

Antitumorigenska upala

Akutna upala mokraćnog mjehura izazvana cjepivom BCG djeluje na povlačenje raka mokraćnog mjehura. BCG terapija (instilacija atenuiranih bakterija soja *Bacillus Calmette–Guérin*) se koristi kao terapija mišićno neinvazivnog raka mokraćnog mjehura te je jedna od najstarijih i najuspješnijih imunoterapija. Još 1976. godine Morales i kolege opisali prvo uspješno liječenje raka mokraćnog mjehura ubrizgavanjem BCG-a u mjehur, a široka primjena BCG imunoterapije za rak mokraćnog mjehura započinje nakon 1980. godine (81). Iako se BCG koristi za liječenje raka preko 40 godina, mehanizam rada ove terapije nije još u potpunosti otkriven (82). Osim BCG-a i druga cjepiva pokazala su sposobnost liječenja površinskih tumora mokraćnog mjehura. Cjepivo za tifus, Ty21a bakterija (atenuirana *Salmonella enterica*), je pokazalo bolje rezultate od BCG cjepiva u pretkliničkoj studiji (83). Trenutno je u tijeku klinička studija s ovim cjepivom na pacijentima s površinskim tumorima niskog rizika.

Mehanizam BCG terapije

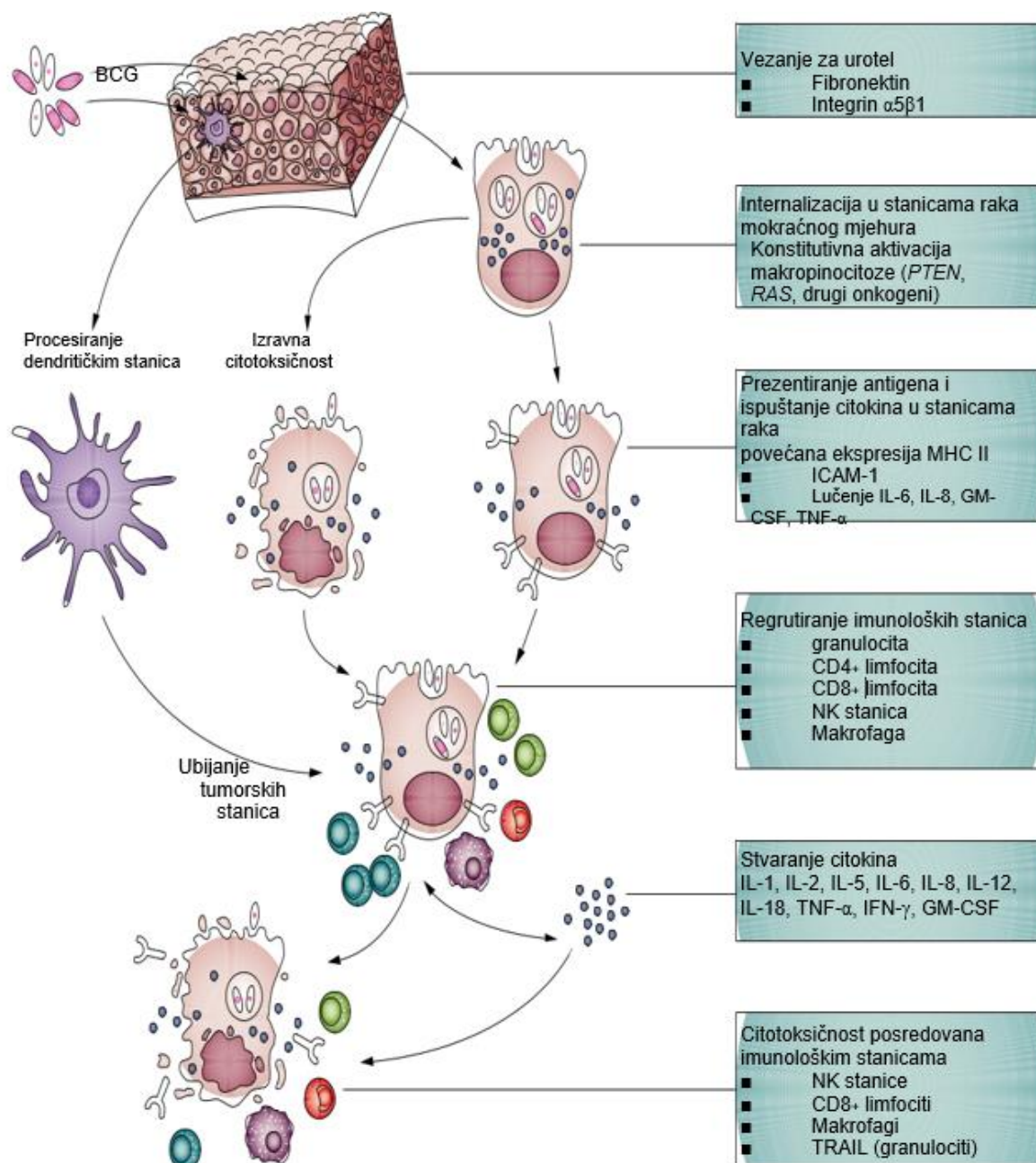
Djelovanje BCG-a posredovano aktiviranjem imunološkog sustava i upalnog odgovora (mehanizam je prikazan na Slika 8). Antitumorsko djelovanje zahtijeva uporabu živih BCG bacila te bliski kontakt bakterija s tumorskim stanicama. BCG bakterija se veže na fibronektin, glikoprotein u izvanstaničnom matriksu urotela preko proteina za pričvršćivanje na fibronektin (FAP) (84). Fibronektin se najvjerojatnije veže na urotelne stanice putem integrina $\alpha 5 \beta 1$, nakon čega se BCG internalizira u tumorskim stanicama (85). Mogući mehanizam za internalizaciju je makropinocitoza koji ovisi o malim GTPazama RAC1 i CDC42. Zanimljivo je da sposobnost stanica raka mokraćnog mjehura na internaliziraju BCG putem makropinocitoze ovisi o prisutnosti određenih onkogenih mutacija, poput delecije PTEN-a ili aktivirajuće mutacije u RAS obitelji onkogeni. Ovisnost internalizacije o specifičnim mutacijama u tumoru mogla bi objasniti zašto neki pacijenti ne reagiraju na BCG terapiju, odnosno tumori tih pacijenata ne nose mutacije koji promiču internalizaciju BCG-a (86).

U pokusima na životinjama, kao i kod pacijenata pokazano je da u roku od nekoliko sati od ubrizgavanja cjepiva, značajno raste broj granulocita i, u manjoj mjeri, makrofaga i limfocita u urinu (87,88). Granulociti su često u blizini apoptotskih urotelnih stanica, a *in vivo* uklanjanje ovih stanica poništava učinak BCG-a te smanjuje preživljenje životinja. Većina limfocita u urinu nakon primjene BCG-a su pomoćničke T stanice. Osim njih prisutni su citotoksični T limfociti i prirodno ubilački (NK) limfociti koji oboje djeluju citotoksično na tumorske stanice. Uklanjanje bilo koje od ovih vrsta limfocita u *in vivo* pokusima deplecije dovodi do gubitka djelovanja BCG terapije (89)(86).

Usljed BCG terapije u urin se otpuštaju mnogobrojni citokini, uključujući IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF, IFN- γ , GM-CSF (86,90). Prisutnost citokina IL-2, IL-12, i IFN- γ , i odsustvo IL-4, upućuju na Th1-nalik odgovor (21,86). Takav imunološki odgovor potvrđuju i studije na miševima: IL-2 i IFN-g deficijentnim miševi nisu reagirali na BCG terapiju, dok su IL-10 deficijentni miševi imali pojačani imunološki odgovor i poboljšane rezultate. Pokušaji pojačavanja Th1-nalik odgovora u mišjem modelu karcinoma dali su dobre rezultate, no učinkovitost davanja Th-1 citokina kod pacijenata s karcinomom mokraćnog mjehura nije dokazana (86). Citokin TRAIL, član TNF obitelji kojeg izražavaju mnoge imunološke stanice, uključujući neutrofile, citotoksične limfocite i NK stanice, inducira apoptozu u stanicama tumora, ali ne i u većini normalnih stanica. U bolesnika liječenih opetovanim instalacijama BCG, razina TRAIL-a u urinu je povećana, a TRAIL se može naći u neutrofilima u mokraći. Razina ovog citokina u mokraći korelira s uspješnošću BCG terapije (17).

TLR receptori 2, 4 i 9 bi mogli imati ulogu u odgovoru karcinoma mokraćnog mjehura na BCG (21,91). TLR receptori su izraženi na imunološkim stanicama, ali i normalnom urotelu i mišićno-neinvazivnim tumorima mokraćnog mjehura. Ovi receptori prepoznaju molekule na površini mikobakterija, što rezultira aktivacijom faktora NF κ B te ekspresije citokina TNF, IL-1 β , IL-12. Uz to, prepoznavanje mikobakterijske komponente pomoću TLR2 i TLR4 rezultira otpuštanjem TRAIL-a iz neutrofila, a također je potrebno za sazrijevanje dendritičnih stanica, stoga i za aktivaciju T stanica (86).

Osim aktivacije imunološkog odgovora moguće je da BCG djeluje direktno citotoksično na tumorske stanice. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura BCG-u može rezultirati smanjenom proliferacijom i zaustavljanjem staničnog ciklusa, a internalizacija BCG može izazvati staničnu smrt nekrozom ili apoptozom (92). Značaj citotoksičnosti BCG-a na tumorske stanice za sada je dokazana jedino u *in vitro* studijama.



Slika 8. Pretpostavljeni mehanizam rada BCG terapije za rak mokraćnog mjehura: žive BCG bakterije se vežu za urotel preko fibronektina i integrina $\alpha 5 \beta 1$, potom ulaze u stanice raka procesom makropinocitoze koja je aktivirana zbog onkogenih mutacija. Nakon ulaska, stanice raka pojačavaju ekspresiju molekula MHC II i ICAM-1 te luče citokine koji, zajedno s dendritičkim stanicama, regrutiraju imunološke stanice, što rezultira citotoksičnim djelovanjem na stanice raka kroz različite imunološke mehanizme. (Preuzeto iz: Redelman-Sidi, G.: *The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective* (86))

1.2.7. Utjecaj urinarne mikrobiote na razvoj raka mokraćnog mjehura

Poveznica mikrobiote i razvoja tumora potvrđena je za veliki broj tumora, prvenstveno za kolorektalni rak. Primjer ove poveznice za rak mokraćnog mjehura je shistosomijaza,

infekcija trematodnim parazitom koja dovodi do kronične upale i razvoja raka. Postoje dokazi da bakterije u mjehuru utječu na ovaj proces. U studiji Adebayo i suradnika, pronađeni su sojevi bakterija *Fusobacterium*, *Sphingobacterium*, i *Enterococcus* u ljudi koji su uz shistosomijazu razvili tumor. Pretpostavlja se da bakterije koje stvaraju N-nitrozamine doprinose razvoju tumora mokraćnog mjehura u shistosomijazi (93). Također, studije na štakorima su pokazale da urinarna infekcija s *E. coli* dovodi do povećanih razina N,N-dimetilnitrozamina koje koreliraju s pojavom hiperplazije i rane neoplazije u mjehuru (94).

Terapijski učinak upale izazvane bakterijom BCG-a upućuje na mogućnost postojanja mikrobiote u mjehuru koja štiti od pojave tumora. *Lactobacilli* su najbrojnije bakterije u mokraćnom mjehuru žena te je moguće da imaju zaštitnu ulogu budući da je ovaj tumor tri do četiri puta rjeđi u žena nego u muškaraca. *Lactobacillus iners*, jedna od najčešćih bakterija u urogenitalnom mikrobiomu žena, snažno se veže na fibronektine, molekule u izvanstaničnom matriksu na koje se veže i BCG prije indukcije upalnog odgovora, a moguće je da samo vezanje bitno za indukciju antitumorske upale u mjehuru (95). Sastav i funkcionalnost mikrobiote u mjehuru još se istražuje te će se s boljim razumijevanjem mehanizama kojima utječe na čovjeka moći razlikovati štetna od blagotvorne mikrobiote.

Probiotici

Više studija je pokazalo smanjenu incidenciju i ponovnu pojavu bolesti raka mokraćnog mjehura u ljudi koji su konzumirali probiotike i fermentirane mliječne proizvode. Probiotska bakterija *Lactobacillus casei shirota* je pokazala antitumorska svojstva u nekoliko mišjih modela karcinoma mokraćnog mjehura, sa sličnim učincima kao BCG (96). U miševa je *Lactobacillus casei* smanjio rast transplantiranih tumora mokraćnog mjehura i plućnih metastaza. *Lactobacillus rhamnosus* GG instiliran u mokraćni mjehur regrutira antitumorska NK stanice u mjehur u zdravih miševa, a *in vitro* studije *L. rhamnosus* GG u kulturi stanica tumora mokraćnog mjehura pokazale su direktan citotoksični učinak ove bakterije na tumorske stanice (97). Ispitivan je učinak i probiotika na bazi laktobacila BLP na imunološki odgovor u miševa s ortopskim tumorima te inhibitorni efekt na kemijsku karcinogenezu uzrokovanu BBN-om u štakora i miševa. BLP probiotik je smanjio rast sekundarnih tumora, značajno je smanjio stvaranje tumora mokraćnog mjehura u modelu kemijske karcinogeneze, a tumori koji su se razvili bili su nižeg gradusa i malignosti u životinja koje su konzumirale probiotik (28). Kliničke studije djelotvornosti probiotika *L. casei shirota* u pacijenata s neinvazivnim tumorima pokazale su obećavajuće rezultate. Dvostruko zaslijepljena kontrolirana randomizirana studija usporedila je učinak *L. casei shirota* s placebom u pacijenata s neinvazivnim tumorom mokraćnog mjehura te je dobiveno da ovaj probiotik smanjuje ponovnu pojavu bolesti. Druga randomizirana kontrolirana studija pokazala je da ovaj probiotik administriran uz kemoterapeutik značajno smanjuje ponovno pojavljivanje bolesti. Međutim, rezultati ovih studija su osporavani zbog nepravilnosti u praćenju i prijavljivanju ishoda liječenja (28).

Nije poznat mehanizam djelovanja probiotika na rak, vjerojatno se radi o utjecaju na domaćinov imunološki odgovor na tumor. *L. rhamnosus* aktivira imunološki odgovor i mijenja ispuštanje citokina iz urotela aktivirajući TLR4 receptor i NFκB put (98). Nadalje, moguće je da probiotici utječu na prisutnost karcinogenih molekula u mokraćnom mjehuru. Teški metali poput kadmija i arsena, poznati rizični čimbenici za rak mokraćnog mjehura, mogu biti vezani na anionske grupe na površinskim molekulama bakterija poput *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus GG* i *Bifidobacterium* čime se sprječava njihova apsorpcija u tijelu. Studija Hayatsua i suradnika pokazala se smanjenu količinu mutagenih spojeva u urinu u ljudi koji su konzumirali probiotik *L. casei shirota* (99).

Mikrobiom povezan s tumorom mokraćnog mjehura

Pregledom literature pronađene su četiri studije koje su opisale razlike u mikrobiomu urina pacijenata s karcinomom mokraćnog mjehura i zdravih osoba (glavni nalazi u Tablici 3.). U našoj studiji iz 2018. godine opisan je urinarni mikrobiom 12 pacijenata s karcinomom mjehura i 11 zdravih kontrola (43). *Fusobacterium nucleatum*, patogen koji se povezuje s kolorektalnim karcinomom, bio je češće prisutan u urinu oboljelih od raka mokraćnog mjehura. Također smo dokazali prisutnost tog patogena u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura, ukupno 11 od 42 uzorka DNA iz tumorskog tkiva bili su pozitivni na ovaj patogen. *Fusobacterium nucleatum* može poticati razvoj rak na više načina, može poticati proliferaciju tumorskih stanica (kako je već prije opisano), a može i inaktivirati NK stanice i tumor infiltrirajuće T stanice (TIL) vežući se za njihov inhibitorski receptor TIGIT. Konačno, *F. nucleatum* se pojačano veže za tumorske stanice (svojom Fap2 adhezijskom molekulom) te tako povećava svoju brojnost u tumoru stvarajući pozitivnu povratnu spregu koja potiče tumorigenezu (25,26). U studiji autora Xu i suradnika iz 2016. uspoređene su mikrobne zajednice urina 8 bolesnika s rakom mokraćnog mjehura i 6 kontrolnih ispitanika te je pronađeno da je rod *Streptococcus* češće prisutan u bolesnika (100). Wu i suradnici usporedili su urinarni mikrobiom 31-og bolesnika s rakom mjehura i 18 zdravih kontrola, u bolesnika su pronašli obogaćene sojeve *Acinetobacter*, *Anaerococcus* i *Sphingobacterium* (69). Mai i suradnici su analizirali su bakterijski mikrobiom urina u 24 osobe s karcinomom mjehura te su otkrili su 31 bakterijski rod koji u osnovnom sastavu ovog mikrobioma. Usporedili su ovaj bakterijski sastav s onim od zdravih kontrola iz prethodnih studija slučajeva i kontrola te pronašli da je količina *Acinetobacter* roda bila puno veća u ljudi s karcinomom mjehura (101).

Vrste koje su pronađene kao obogaćene urinu ljudi sa rakom mokraćnog mjehura u gore navedenim studijama pripadaju koljenima *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* i *Synergistetes*. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Veillonella* su bili obogaćeni u zdravih kontrola. To su probiotski bakterijski sojevi koji moguće imaju zaštitnu ulogu u raku mjehura. *Fusobacterium* i *Campylobacter* su bakterijski rodovi koji se pojavljuju u urinu muškaraca iznad 70 godina, a ujedno su i obogaćeni u urinu bolesnika s rakom mokraćnog mjehura. Poznato je da urinarni mikrobiom mijenja kako starimo, no nije

poznato je li promjena mikrobioma utječe na rizik od razvoja raka budući da se taj rizik povećava sa starošću. Iz rezultata ovih studija jasno je da je urinarni mikrobiom promijenjen kod ljudi s rakom mokraćnog mjehura, a vidljiv je i potencijal urinarnog mikrobioma u mogućem razvoju bolje dijagnostike i terapije tumorske bolesti. Rezultati navedenih studija prikazani su u Tablici 3.

Dvije su studije u kojima je ispitivan mikrobiom u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. U studiji Rodrigues i suradnika ispitivani spareni uzorci tumorskog i obližnjeg zdravog tkiva 28 pacijenata iz biobaze TCGA. Najbrojnije porodice spadale su u Proteobacteria (93% svih očitavanja). Nisu pronađene statistički značajne razlike između tumorskog i zdravog tkiva, dok je *Cutibacterium acnes* očitao samo u tumorskim uzorcima. U analizi sparenih uzoraka nisu pronađeni obogaćeni bakterijski taksoni, dok su *Mathylobacterium radiotolerans*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas putida* su bili obogaćeni u tumorskom tkivu u nespareni analizi (102). Studija Liu i suradnika iz 2019. pokazala je obogaćenje rodova *Acinetobacter*, *Anoxybacillus*, *Escherichia-Shigella*, *Geobacillus*, *Pelomonas*, *Ralstonia* i *Sphingomonas* u tumorskom tkivu, te *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcaceae*, *Cupriavidus* i *Brucellaceae* u zdravom tkivu (Tablica 3) (103).

Tablica 3. Urinarni mikrobiom pacijenata s rakom mokraćnog mjehura i zdravih kontrola i mikrobioma tumorskog i zdravog tkiva mjehura

Istraživanja mikrobioma urina ljudi s tumorom mokraćnog mjehura					
Studija	Muškarci / Žene	Pacijenti / Zdrave kontrole	Vrsta uzorka	Bakterije obogaćene u urinu pacijenata	Bakterije obogaćene u urinu zdravih kontrola
Xu, 2014.	nepoznato	8 / 6	Srednji mlaz urina	<i>Streptococcus</i>	
Bučević Popović, 2018.	23 / 0	12 / 11	Srednji mlaz urina	<i>Fusobacterium sp.</i> , <i>Jonquetella anthropi</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Subdoligranulum</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Actinobaculum</i> , <i>Facklamia</i>	<i>Veillonella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i>
Wu, 2018.	49 / 0	31 / 18	Srednji mlaz urina	<i>Acinetobacter</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Sphingobacterium</i>	<i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Roseomonas</i> , <i>Laceyella</i>
Mai, 2019.	18 / 6	24 / 0 (29)	Srednji mlaz urina	<i>Acinetobacter</i> , <i>Rhizobiales</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Tepidimonas</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Aerococcaceae</i>	<i>Acidimicrobiales</i> , <i>Roseomonas</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Dokdonella</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Peptostreptococcace</i> , <i>Veillonella</i>
Hai, 2019.	29 / 26	20 / 9	Srednji mlaz urina	<i>Actinomyces</i>	<i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i>

Istraživanja mikrobioma tumorskog tkiva mokraćnog mjehura					
Studija	Muškarci / Žene	Tumorsko / Zdravo tkivo	Vrsta uzorka	Bakterije obogaćene u tumorskom tkivu	Bakterije obogaćene u zdravom tkivu
Liu, 2019.	22 / 0	22 / 12	16 S sekvenciranje tumorskog i zdravog tkiva pacijenta	<i>Acinetobacter, Anoxybacillus, Escherichia - Shigella, Geobacillus, Pelomonas, Ralstonia, Sphingomonas</i>	<i>Lactobacillus, Prevotella, Ruminococcaceae, Cupriavidus, Brucellaceae</i>
Rodrigues, 2019.	28 / 9	28 / 9	Analiza tumorskih i zdravih tkiva iz TCGA baze	<i>Cutibacterium, Mathylobacterium, Pseudomonas</i>	

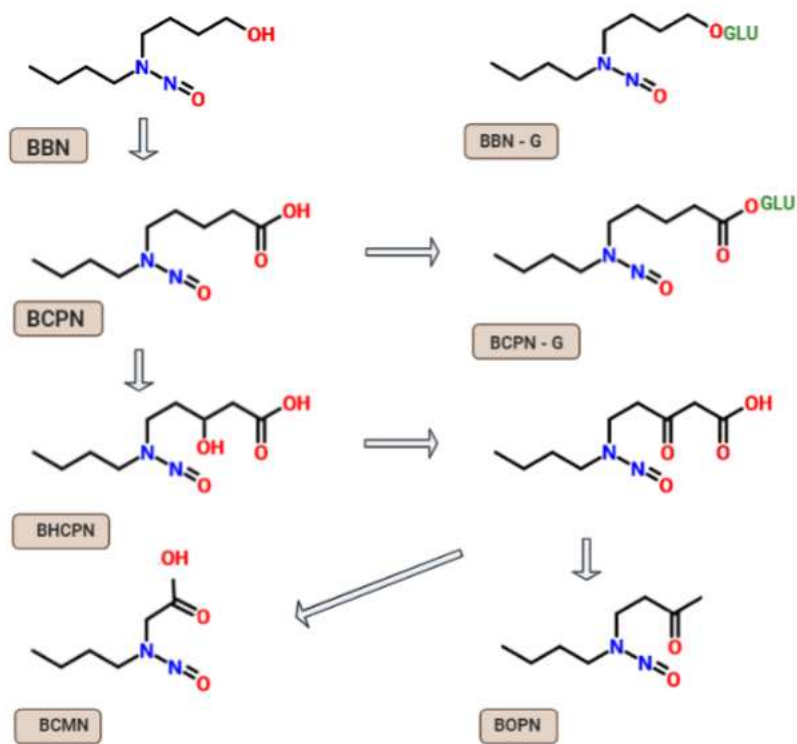
1.3. BBN model za proučavanje tumora mokraćnog mjehura

Za proučavanje raka mokraćnog mjehura na pokusnim životinjama najčešće se koristi BBN (N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin), karcinogeni spoj koji selektivno inducira tumore u mokraćnom mjehuru štakora i miševa. Vrijednost ovog modela je u tome što u glodavaca uzrokuje tumore koji su histološki i mutacijski slični humanim tumorima (104,105).

BBN je srodan kemijskim karcinogenima iz duhanskog dima te se može dobiti metaboličkom konverzijom jednog takvog spoja (DBN ili di-n-butilnitrozamina) (106). BBN se daje u vodi za piće u koncentracijama 0.01- 0.05%. Nakon ulaska u tijelo, metabolizira se u jetri u spoj BCPN (N-butil-N-(3-karboksipropil)-nitrozamin), potom se u tom obliku izlučuje u urin, ulazi u urotelne stanice, kovalentno se veže na stanične makromolekule te izaziva oštećenja DNA i mutacije (107). Metabolit BCPN nastaje oksidacijom alkoholne skupine BBN-a u karboksilnu enzimskim sustavom alkohol/aldehid dehidrogenaza i enzimima sustava citokrom P450. Dio BCPN-a potom prolazi proces glukuronidacije, čime stvara nekarcinogeni produkt, BCPN-glukuronid te, u manjoj mjeri, beta-oksidaciju prema Knoop mehanizmu (Slika 9). Metabolički put ovog spoja nije u potpunosti razjašnjen te je moguće da se dio metabolizma odvija crijevima, bubrezima i mjehuru. Poznato je da bakterije mogu deglukuronidirati spojeve radi iskorištavanja glukuronida kao izvora hrane, čime bi mogle utjecati na ponovno aktiviranje BCPN spoja u mjehuru.

Prema Amesovom testu za mutagenost BCPN je direktni mutagen, dok je BBN promutagen, odnosno BBN zahtjeva metaboličku aktivaciju sa S9 frakcijom i kofaktorima NADPH ili NADH (106). Direktno kancerogeno djelovanje BCPN-a na epitel mjehura pokazano je induciranjem tumora mokraćnog mjehura nakon intravezikalne instilacije BCPN-a, kao i *in vitro* neoplastičnom transformacijom epitelnih stanica mjehura štakora nakon tretmana BCPN-om (108). No, pokazano je i da se direktnom instilacijom BBN-a u mjehur

induciraju tumori mokraćnog mjehura (109). Moguće objašnjenje za to je konverzija BBN u BCPN u samom urotelu - da se ona događa pokazano je u *in vitro* pokusima (106).



Slika 9. Metabolizam N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN). BBN-G: BBN-glukuronid; BCPN: N-butil-N-(3-karboksipropil)nitrozamin; BCPNG: BCPN-glukuronid; BHCN: N-butil-N-(2-hidroksi-3-karboksil-propil)nitrozamin; BCMN: N-butil-N-(karboksi-metil)nitrozamin; BOPN: N-butil-N-(2-oksopropil)nitrozamin (prema : Colaço, A, *BBN as an Urothelial Carcinogen* (104)).

Miševi tretirani BBN-om razvijaju displaziju, CIS i invazivne karcinome u mokraćnom mjehuru. Lezije obično započnu kao hiperplazija koja prelazi u papilarnu hiperplaziju, papilom, papilarni tumor niskog malignog potencijala, niskogradusni i visokogradusni invazivni rak. Rak metastazira rijetko, a stopa smrtnosti kod miševa i štakora je vrlo niska te je obično povezana s hidronefrozom (104).

Tumori često imaju mutacije u p53 ili genima koji se odnose na put p53 te imaju povećanu ekspresiju faktora rasta EGFR-a (110). Nadalje, često se događaju delecije na kromosomu 4 što odražava gubitak na ljudskom kromosomu 9, čest u humanom raku mjehura. Molekularni subtipovi se dijele na luminalne, bazalne i p53-slične tumore. Tumori su najčešće bazalnog tipa budući da imaju pojačanu ekspresiju markera bazalnih stanica Krt5, Krt6, Krt14, Krt1, Cdh3 i Cd44 (111).

Tretman BBN-om izaziva upalnu reakciju u mjehuru koja se mijenja s razinom promjena u tkivu (112). Nakon 2 tjedna tretmana u mjehuru je prisutna displazija i

degenerativna atipija te jaka, akutna upala koja će se postupno utišati. Pojačana je degradacija izvanstaničnog matriksa i stvaranje kolagena što upućuje na oštećenje u tkivu izazvano upalnim stanicama te je moguće da se upala kasnije utišava radi sprječavanja daljnjeg oštećenja epitela. Najčešće imunološke stanice su CD4+ odnosno Th1 i FoxP3+ ili T regulatorni limfociti. Povećana je ekspresija citokina Il1a, Il6, Il18, Il4, svih Tlr receptora osim Tlr3, transkripcijskih faktora NF-κB, Stat3 i FoxP3 te kemokina Ccl5 i Ccl12 koji privlače eozinofile, monocite i limfocite u tkivo. Uspostava tumora u kasnijem dijelu tretmana aktivira drugi, kronični tip upale. Većina upalnih markera tada ima nižu ekspresiju u usporedbi s dvotjednim tretmanom osim interleukina 18 i transkripcijskog faktora Gata3 koji je bitan je za djelovanje Th2 limfocita. Povećano je i lučenje IL-4 koje je povezano s ublažavanjem upale te indukcijom Th2 fenotipa T limfocita i M2 fenotipa makrofaga, a prisutna je i visoka razina izražaja Ifn γ u tumoru. Ovaj profil upalnih stanica i citokina dovodi do fibroze i popravka tkiva, ujedno odgovara imunološki aktivnim tumorima te potvrđuje sličnosti s ljudskim tumorima mokraćnog mjehura.

Studija Forster i suradnika pokazala je da je mikrobiom urina miševa koji piju BBN promijenjen u usporedbi sa stanjem prije tretmana ovim karcinogenom (113). Najčešće bakterije u urinu miševa su *Escherichia*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Veillonella*, što predstavlja bakterijski sastav sličan onom u ljudskom urinarnom mikrobiomu. „onkobiom“ ili urinarni mikrobiom nakon tretmana BBN-om obogaćen je bakterijama *Gardnerella* i *Bifidobacterium* u usporedbi s onim od kontrola. U miševa koji su razvili neinvazivni tip tumora, najčešće bakterije bile su *Escherichia*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Neisseria*. Miš koji je jedini razvio invazivni tip tumora imao je različit mikrobiom prije tretmana BBN-om te na kraju tretmana, a karakteriziraju ga bakterijski rodovi *Rubellimicrobium*, *Escherichia* i *Kaistobacter*. Ova studija, unatoč ograničenjima zbog male veličine uzorka, daje preliminarne rezultate o postojanju poveznice urinarnog mikrobioma i raka u mokraćnom mjehuru te upućuje na opravdanost korištenja ovog modela za proučavanje njihove povezanosti.

HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Mikrobiom ima utjecaj na:

- (a) tkivo zdravog mjehura mijenjajući gensku ekspresiju u mokraćnom mjehuru te
- (b) pojavu tumora u mokraćnom mjehuru miševa tretiranih karcinogenom BBN-om i to modulacijom imunološkog odgovora na tumor te utjecajem na metabolizam karcinogena BBN-a.

2.2. Ciljevi istraživanja

I. Proučavanje akseničnih (germ-free) miševa: glavni cilj ovih istraživanja je opisati različito izražene gene u mjehuru miša uslijed odsustva mikroorganizama. Također je cilj utvrditi anatomske-histološke promjene u građi mokraćnog mjehura miševa uzgajanih u sterilnim uvjetima.

II. Indukcija tumora miševima s reduciranim mikrobiomom: cilj ovih istraživanja je opisati utjecaj mikrobioma na dinamiku razvoja tumora proučavajući miševima kojima je antibiotikom reduciran mikrobiom. Dinamika razvoja tumora procijenit će se: mjerenjem urotelnih degenerativnih promjena nakon kratkotrajne (dvotjedne) izloženosti BBN-u, te stupnjem uznapređovalosti tumorske bolesti nakon dugotrajne (12-tjedne) izloženosti BBN-u.

Sporedni ciljevi su:

- okarakterizirati promjene u imunološkom infiltratu mjehura nakon kratkotrajne izloženosti BBN-u koristeći imunološke markere odabrane prema rezultatima analize genske ekspresije

- opisati utjecaj redukcije mikrobioma na metabolizam karcinogenog spoja BBN-a što će se postići mjerenjem količine karcinogenog oblika BBN-a u urinu i fecesu miševa nakon izloženosti BBN-u u vodi za piće.

MATERIJALI I METODE

3.1. Reagensi

2-propanol (*Kemika*); Aceton (*Kemika*); Acetonitril (*Merck*); Agar (*Roth*); Agaroz (*Sigma*); Albumin goveđeg seruma (BSA) (*Roth*); BBN , N-butil-N-(4-hidroksilbutil)-nitrozamin (*TCI*); BCPN (*TCI*); Brom fenol plavo (*Kemika*); Dab 3,3'-diaminobenzidin (*Dako*); deoksinukleotid trifosfat (dNTP, Invitrogen); Dimetil sulfoksid (DMSO) (*Roth*); Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija; Etanol (*Kemika*); Etidijev bromid (*Sigma*); Etil acetat (*Merck*); Etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (*Roth*); Eukitt quick-hardening mounting medium (*Sigma*); Glicerol (*Kemika*); Histanol (*Biognost*); hidroksietilpiperazinetansulfonična kiselina (HEPES, Sigma Aldrich); kalijev klorid (KCl, Sigma Aldrich); Kloroform (*Kemika*); Klorovodična kiselina (*Kemika*); Ksilol (*Biognost*); Magnezijev klorid (*Roth*); Magnezijev sulfat (MgSO₄, Sigma Aldrich); β-merkaptioetanol (*Roth*); Metanol (*T.T.T.*); Metilen plavo (Sigma Aldrich); Natrijev acetat (NaCH₂COOH, *Roth*); Natrijev citrat (*Sigma*); Natrijev klorid (*Kemika*); Natrijev sulfat bezvodni (*Kemika*); Octena kiselina (*Kemika*); Octena kiselina (*T.T.T.*); Paraformaldehid (*Sigma*); Propidij jodid (*Sigma*); Qiazol (*Qiagen*); Sybr green (*Qiagen*); Trifluoroctena kiselina (*Merck*); Tripa Blue (*Gibco*); Tris (*Sigma*); Triton (*Merck*); Triton-x-100 (*Roth*); Tween (*Roth*); Voda oslobođena od nukleaza (*Accugene*); Vodikov peroksid (*Kemika*);

3.2. Antibiotici

Bacitracin (Sigma); Ciprofloksacin hidroklorid (MCE); Gentamicin (Krka); Metronidazol (Sigma); Neomicin (Sigma); Penicilin (Sigma); Streptomycin (Sigma); Vankomicin (Pharma Swiss);

3.3. Početnice

Dizajniranje početnica napravljeno je pomoći online alata za izradu početnica Primer-BLAST (NCBI, USA). Kako bi se provjerila efikasnost primera, korištena su serijska razrjeđenja poznate cDNA koncentracije (4 serijska razrjeđenja po 5x, prva koncentracija 5x osnovne koncentracije koja se koristi za eksperiment), početnice s efikasnošću od 90% do 110% su korištene u eksperimentima. Početnice su dizajnirane tako da obuhvaćaju rasponom dva susjedna egzona čime je osigurano umnožavanje isključivo mRNA produkta, a ne i genomske DNA (gDNA) te se izbjegava iskrivljenje rezultata zbog kontaminacije s gDNA. Lista svih korištenih početnica i njihove sekvence su prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Početnice korištene u qPCR eksperimentima i njihove DNA sekvence

Gen	DNA slijed (5' -> 3')	Duljina
mSpon2 F	TTGCCAGGTGATGGAAAACG	20
mSpon2 R	CGGGCTGTACAAACCGATTC	20
mAdamts4 F	TGTCATGGCTCCTGTCATGG	20
mAdamts4 R	AGGCAGTGCCCATTAACCATT	20
mMup7 F	CACAAAGCCTAACAGAGGTAGAG	23
mMup7 R	TACTCTCTGGGTTTCAGCGGG	20
mPer1 F	CTCCTGCTCCAGTGACTTTCC	21
mPer1 R	GGCTTGGCCCGAGATTCAA	19
mArntl F	GTAGATCAGAGGGCGACAGC	20
mArntl R	CCTGTGACATTCTGCGAGGT	20
mTef F	TGTCCAGCACAGAATCGTCC	20
mTef R	GCAGGGTCAGGGTTGAAGTT	20
mPer2 F	CCATCCACAAGAAGATCCTAC	21
mPer2 R	GCTCCACGGGTTGATGAAGC	20
mRev-erba F	ACATGTATCCCCATGGACGC	20
mRev-erba R	CTGGTCGTGCTGAGAAAGGT	20
mNfil3 F	CTTTCAGGACTACCAGACATCCAA	24
mNfil3 R	GATGCAACTTCCGGCTACCA	20
mPer3 F	GAGAGGCACACTAAGCCCAG	20
mPer3 R	GCCGCGAAGGTATCTGTGTT	20
mCol2a1 F	GAGGCGATGTTGGCGAGAAA	20
mCol2a1 R	GAGGTCCGACTTCTCCCTTC	20
mLama1 F	GGTCATGCAGAGGCTGACTT	20
mLama1 R	TGCTGTCAGCTTGTTTCCGA	20
mTnc F	AACGGACTGCCCACATCTCA	20
mTnc R	TCCGGTTCAGCTTCTGTGGTAG	22
mEgfr F	TCATCTGTGCCCAGCAATGT	20
mEgfr R	TTGGCAGACCAGACAGTCAC	20
mCldn1 F	TGGGGCTGATCGCAATCTTT	20
mCldn1 R	CACTAATGTCGCCAGACCTGA	21

3.4. Protutijela

Primarna protutijela

Tablica 5. Obilježja korištenih primarnih protutijela.

Naziv protutijela	Porijeklo	Vrsta protutijela	Proizvođač (šifra)	Korišteno razrjeđenje
Anti-Mouse Embp	koza	poliklonalno	Santacruz (SC33938)	1:200
InVivoPlus Rat Anti-Mouse Ly6G	štakor	monoklonalno (klon 1A8)	BioXCell (BE0075)	0.2µg/µL
InVivoPlus Rat IgG2b izotipna kontrola	štakor	monoklonalno (klon 2A3)	BioXCell (BE0089)	0.2µg/µL
Rabbit Anti-Mouse Ki67	kunić	poliklonalno	Abcam (ab15580)	1:500
Rabbit Anti-Mouse Krt5	kunić	poliklonalno	Biolegend (Poly19055)	1:250
Rabbit Anti-Mouse Mmp9	kunić	poliklonalno	Abcam (ab38898)	1:200
Rat Anti-Mouse Gr-1 - Phycoerythrin	štakor	monoklonalno (klon RB6-8C5)	Biolegend (108407)	1:400
Rat Anti-Mouse Ly6C - Alexa Flour 647	štakor	monoklonalno (klon HK1.4)	Biolegend (128009)	1:400
Rat Anti-Mouse Ly6G	štakor	monoklonalno (klon 1A8)	BD Biosciences (551451)	1:200

Sekundarna protutijela

Tablica 6. Obilježja korištenih sekundarnih protutijela

Naziv protutijela	Porijeklo	Vrsta protutijela	Proizvođač (šifra)	Korišteno razrjeđenje
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conugate (Bio-Rad, 1:500)	koza	HRP konjugiran	Bio-Rad (1706516)	1:500
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins	koza	HRP konjugiran	Dako (P0448)	1:500
Goat Anti-Rat IgG	koza	HRP konjugiran	Cell Signalling (7077)	1:1000

3.5. Oprema

Centrifuga Biofuge primo R (Heraeus); Centrifuga Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific); Homogenizator tkva Precellys® Minilys (Bertin Instruments); Homogenizator za tkivo BioPulverizer (BioSpec); HPLC uređaj Series 200 (Autosampler PE Series 200, Binarna pumpa PE Series 200, UV/VIS detektor PE Series 200, Vakum otplinjač (tekuće faze) PE Series 200, Peltier column owen PE Series 200) (PerkinElmer); Ploča za razvijanje (tankoslojna kromatografija) - Silika gel 60 F254 (Merck Millipore); Inkubator Heraeus Hera Cell 150 (Thermo Scientific); Komora za anaerobni uzgoj bakterija (ThermoFisher); Metabolički kavez za mišve (Techniplast); zNanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific); PCR uređaj Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific); Protočni citometar BD

Accuri C6 (BD Biosciences); Svjetlosni mikroskop Olympus BX53 (Olympus); Ultra Cyano kolona za HPLC, 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Restek); Uređaj za izolaciju stanica iz tkiva gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec); Uređaj za Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems); Vakumski otplinjač (ThermoFisher); Vibracijska miješalica BioVortex V1 (Biosan); Vrećice za uzgoj bakterija u anaerobnim uvjetima AnaeroGen (ThermoFisher); Vrećice za uzgoj bakterija u mikroaerofilnim uvjetima CampyGen (ThermoFisher);

3.6. Enzimi i biljezi

DNA polimeraza PCR DreamTaq, hot start (Fisher Scientific); ; DNAza I (Sigma); Kolagenaza VI (Worthington); ; DNA biljeg 1 kb DNA Step Ladder (Promega); ; DNA biljeg 100 pb DNA Step Ladder (Promega);

3.7. Komercijalno dostupni kompleti

DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen); Femto DNA Quantification Kits (Zymo Research); Miltenyi Biotec Multi tissue dissociation Kit 1 (MTDK1); RNA Purification Kits - Ambion™ (Thermo Fisher Scientific); SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix for RT-PCR (Invitrogen); Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems);

3.8. Puferi i otopine

- *6X DNA pufer za nanošenje uzoraka: 50% glicerol, 0.1 M EDTA, 1% SDS, 0.2% bromfenolno plavilo, 0.2% ksilen cijanol*
- 20X TBS (engl. Tris-Buffered Saline), pH 7.6: 201.17 mM Tris, 1.98 M NaCl
- 1X PBS napravljen iz 10X stock otopine (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2.0 mM KH₂PO₄)
- 1X TAE pufer (2 M Tris, 5.7% ledene octene kiseline, 100 mM EDTA pH 8.0)
- ACK pufer za lizu eritrocita (1.5 M NH₄Cl, 100 mM KHCO₃, 10 mM EDTA2Na)
- Digestijski pufer (10 ml, HBSS w Ca⁺⁺ Mg⁺⁺, FCS 5%, HEPES 10 mM, Kolagenaza IV 5mg, DNAza I 5mg)
- Predigestijski pufer (HBSS w/o Ca⁺⁺ Mg⁺⁺, HEPES 10mM, EDTA 5mM, FCS 5%)
- Pufer za blokiranje (1-3%BSA/PBS)
- Pufer za fiksaciju tkiva i stanica (4% paraformaldehid, 1X PBS, pH 7.4)
- Pufer za ispiranje (0,025% Triton X-100/PBS)
- Pufer za otkrivanje antigena 1 (10mM Natrij citrat, 0.05%Tween20, pH6.0)
- Pufer za otkrivanje antigena 2 (10mM Tris baza, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0)
- Eozin (5mM Eosin Y, 2mM Floksin B)
- Hematoksilin (7mM hematoxilin, 200mM KAl(SO₄)₂x12H₂O, 1mM NaIO₃ ili KIO₃, 0.005mM limunska kiselina, 300mM kloral hidrat)

- Otopina za utišavanje endogene peroksidaze (H₂O₂ 3%, PBS)
- Gvanidin klorid (0,3M u 95% EtOH)

3.9. Hranjive podloge

- Krvni agar (Liofilchem)
- LB hranjive podloge (engl. *Luria-Bertani broth*)
- Tekuća (1.0% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl) i kruta (1.0% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 0.5% agar) sterilizirana hranjiva podloga LB. Podloge su sterilizirane autoklaviranjem, u trajanju od 20 min na 121 °C.
- TSB hranjiva podloga (Oxoid)

3.10. Pokusne životinje

Istraživanja su provedena na jedinkama vrste *Mus musculus*, podsojeva C57BL/6J i C57BL/6N. U kontrolnoj i ispitivanoj grupi u svakom eksperimentu korišteni su miševi iste starosti, istog soja, uzgajani u istoj nastambi s istim uvjetima svjetlosti, hrane, vode i stelje.

Za pokus s akseničnim (*germ-free*, GF) i konvencionalnim (SPF) miševima korišteni su uzorci mokraćnog mjehura standardnih laboratorijskih miševa iz dviju suradnih ustanova koje imaju uvjete za sterilno uzgajanje miševa (tzv. sterilne izolatore). Šest akseničnih mužjaka i šest ženki starih 6 tjedana, kao i isti broj SPF miševa iste dobi i spola (podsoj C57BL/6J), su donirani iz Instituta Gulbenkian (IGC), u Oeirasu, Portugal. Uvjeti u toj nastambi uključuju 12-satni ciklusi svijetla i tame, te kontroliranu temperaturu i vlagu, a miševi su imali *ad libitum* pristup hrani i vodi. Hrana, voda i stelja za GF miševe autoklavirani su prije upotrebe i sterilni isporučeni u izolatore. GF miševi su bili smješteni u izolatorima s DPTE vratima (Getinge). Svi su izolatori podvrgnuti programu praćenja zdravlja, uključujući mjesečni mikrobiološki pregled. SPF miševi iz iste nastambe smješteni su u kavezima s pojedinačnim ventiliranjem (IVC kavezi). Korišteno je i pet GF i četiri SPF mužjaka miševa (podsoj C56BL/6N) iz Helmholtz Centra za zarazne bolesti (HZI) (Braunschweigu, Njemačka), starih 9 tjedana. SPF miševi su držani u kavezima s pojedinačnim ventiliranjem (IVC), a aksenični miševi u izolatorima sa sterilnim uvjetima (Getinge). Uvjeti za hranu, vodu i osvjetljenje bili su isti ranije navedenima.

U istraživanjima indukcije tumora BBN-om korišteni su standardni laboratorijski miševi (lat. *Mus musculus*) divljeg tipa, soja C57BL/6J, nabavljeni od firme Jackson Laboratory i uzgajani u nastambi Medicinskog fakulteta u Splitu. Miševi su certificirani kao SPF (engl. *specific-pathogen-free*), odnosno imaju normalan mikrobiom iz kojeg su isključeni određeni patogeni koji mogu utjecati na zdravlje životinja, pa s time i na rezultate istraživanja. U većini pokusa su korišteni mužjaci, dok je u jednom ponavljanju napravljen pokus i na ženkama. Korištena hrana je sterilizirana γ -zračenjem, a voda je autoklavirana i mijenjana

jednom tjedno. Stelja je autoklavirana prije upotrebe i mijenjana najmanje svaka dva tjedna. U nastambi se izmjenjuju 12-satni ciklusi svijetla i tame, te se kontrolira temperatura i vlaga, a miševi imaju *ad libitum* pristup hrani i vodi. U pokusima su korišteni miševi starosti od 6 do 8 tjedana, tjelesne mase između 20 g i 25 g. U eksperimentima je korišteno najmanje 5 životinja po ispitivanoj skupini, te je se svaki eksperiment ponovljen minimalno 3 puta.

Za istraživanje na pokusnim životinjama sve potrebne dozvole, odnosno dobiveno je odobrenje Ministarstva poljoprivrede (broj dozvole: 525-10/0255-15-5).

Oprema za miševe

Hrana za miševe ozračena gama zračenjem 4RF25 CS (PF1609) (Mucedola, Milan, Italy); Stelja SCOBIS UNO (PF3907) (Mucedola, Milan, Italy); IVC kavezi 1284L (Techniplast, Milan, Italy).

3.11. Protokoli istraživanja

U studiji na akseničnim (*germ-free*, GF) miševima životinjama su nakon žrtvovanja uzorkovani mokraćni mjehuri. Tkiva mokraćnog mjehura miša vagana su na analitičkoj vagi, analiziran im je genski izražaj metodom RNA sekvenciranja, lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) te su analizirane osnovne histološke karakteristike tkiva na preparatima obojenih hemalaun-eozin (HE) bojanjem.

U studiji s utjecaja mikrobioma na razvoj tumora mokraćnog mjehura, miševi su nasumično podijeljeni u proučavane skupine te im je inducira karcinogeneza upotrebom kemikalije N-butil-N-(4 hidroksibutil)nitrozamin (BBN) u vodi za piće. Uz BBN polovica miševa pila je mješavinu antibiotika širokog spektra kako bi im se uklonila (reducirala) tjelesna mikroflora. Miševi su bili na tretmanu BBN-om 2 tjedna (pokus kratke izloženosti BBN-u, Slika 10) te 20 tjedana (pokus duge izloženosti BBN-u, Slika 10). Nakon tretmana životinje su žrtvovane te im je uzorkovan mokraćni mjehur. Analizirana je genska ekspresija u tkivu mokraćnog mjehura metodom RNA sekvenciranja, lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) te su analizirane osnovne histološke karakteristike tkiva na preparatima obojenih hemalaun-eozin bojanjem i imunološki infiltrat metodom imunohistokemije. Uz mjehur miševima je uzorkovan urin i feces: u metaboličkim kavezima prikupljan je urin i feces u periodu od 24 sata, potom su mjerene količine karcinogenog metabolita BCPN-a metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

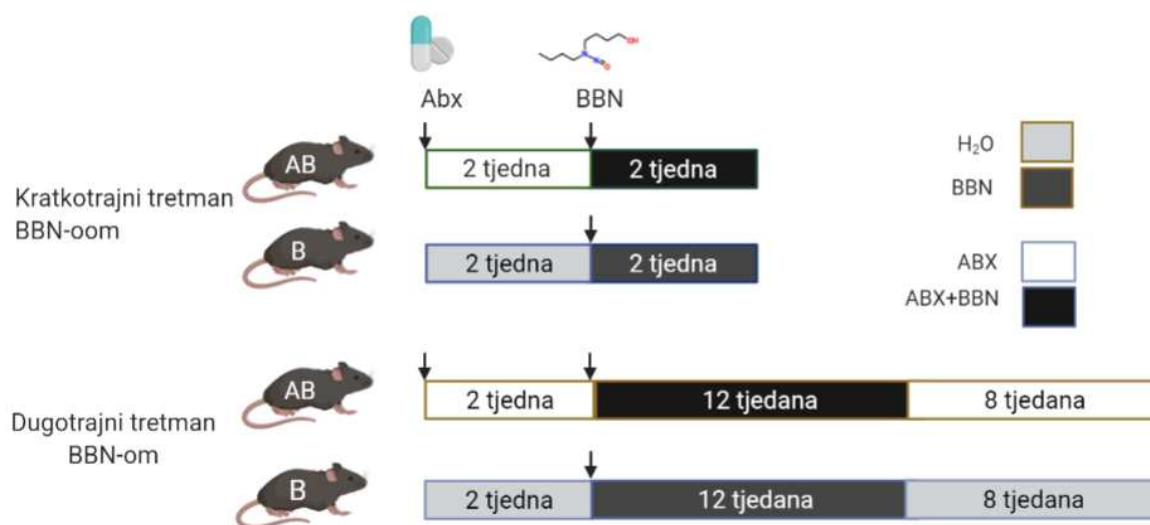
Kao kontrolne skupine korišteni su miševi koji piju običnu vodu i miševi koji piju vodu s antibioticima (bez BBN-a) kako bi se ustanovilo postoje li promjene u tkivu zbog izlaganja antibioticima. Napravljene su mikrobiološke analize uključujući standardne bakterijske kulture

i 16S sekvenciranje na uzorcima fecesa i urina kako bi se potvrdila redukcija mikrobioma na razini organizma.

Uloga neutrofila u pokusu proučavana je u pokusu kratkotrajne izloženosti BBN-u tako što je grupi tretiranih miševa za vrijeme pokusa napravljena deplecija neutrofila pomoću neutralizacijskog protutijela, potom je patohistološki analizirano tkivo mjehura (hemalaun-eozin bojanje), a deplecija neutrofila u krvi je potvrđena protočnom citometrijom. U jednom ponavljanju pokusa kratkotrajne izloženosti mokraćni mjehuri su homogenizirani i enzimatski tretirani kako bi izolirali pojedinačne stanice iz mjehura. Pojedinačne stanice su potom analizirane masenom citometrijom u suradnom laboratoriju u Sveučilištu u Zürichu (panel markera na Slika 29A).

3.12. Tretman životinja BBN-om i antibioticima

Tretman karcinogenom je proveden 2 tjedna (pokus kratkotrajne izloženosti) te 12 tjedana (pokus dugotrajne izloženosti) prilikom čega je jedna grupa miševa tretirana antibioticima širokog spektra kako bi im se reducirao broj bakterija (AB grupa), a druga grupa nije primala antibiotike (B grupa) (Slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz tretmana životinja u pokusima kratkotrajne i dugotrajne izloženosti BBN-u

Miševi u pokusu duge izloženosti BBN-u su nakon 12 tjedana tretmana karcinogenom pili običnu vodu u trajanju 8 tjedana. BBN je administriran u vodi za piće kao 0,05% (v/v) otopina. Miševi koji su primali i antibiotike bili su stavljeni na predtretman antibioticima 2 tjedna prije početka tretmana BBN-om kako bi imali reduciranu mikrobiotu već na početku tretmana BBN-om. Korišten je protokol za antibiotsku redukciju mikrobioma preuzet iz studije Grivennikova: prva dva mjeseca miševi su primali 100 µg ml⁻¹ neomicina, 50 µg ml⁻¹

vankomicina, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ metronidazola, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomicina i 100 U ml^{-1} penicilina u vodi za piće (19). Miševima na dugom tretmanu BBN-om nakon dva mjeseca antibiotski tretman je promijenjen u streptomycin (1 mg ml^{-1}), gentamicin (170 $\mu\text{g ml}^{-1}$), ciprofloksacin (125 $\mu\text{g ml}^{-1}$) i bacitracin 1 mg ml^{-1} , kako bi se izbjegla pojava antibiotski rezistentnih bakterija (19).

3.13. Izolacija RNA iz tkiva

Odmah po žrtvovanju, miševima je izvađen mokraćni mjehur, polovica mjehura je odmah smrznuta u tekućem dušiku te pohranjena na -80°C do izolacije RNA za testiranje izražaja gena. Za izolaciju bioloških molekula korišten je komplet *QIAzol lysis reagent* (Qiagen) prema uputama proizvođača te homogenizator tkiva Precellys Minilys (Bertin Instruments) ili homogenizator za tkivo BioPulverizer (BioSpec). Izolirana mRNA prevedena je u komplementarnu DNA (cDNA) koristeći *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) te je pohranjena na -20°C do daljnjeg korištenja.

Količina i čistoća uzoraka RNA utvrđeni su korištenjem omjera 260/280 i 260/230 pomoću uređaja Nanodrop 2000 (ThermoFisher). Elektroforezom je potvrđena očuvanost (integritet) RNA te čistoća RNA, odnosno manjak značajne kontaminacije genomskom DNA u uzorcima koji su poslani na RNA-seq analizu.

3.14. Patohistološka i imunohistokemijska analiza tkiva

Nakon žrtvovanja tkivo mokraćnog mjehura medijalno je izrezano na približno jednake polovice pomoću kirurškog noža te je polovica je fiksirana u 10% neutralom puferiranom formalinu 24 sata. Nakon fiksacije, tkiva su dehidrirana korištenjem niza razrjeđenja etanola (75%, 90%, 95%, tri puta 100% po sat vremena), pročišćena od etanola u tri serije ksilola, očišćeni od ksilola u prvom parafinu te uklopljena u drugom parafinu. Uklopljena tkiva su zatim izrezana na sekcije od 5 μm te obojena hemalaun-eozinom ili imunohistokemijskim bojanjem. Patolog je procjenjivao patohistološki status sekcija mokraćnog mjehura bez da su znali kojoj ispitivanoj grupi pripada pojedina životinja.

Za imunohistokemiju tkiva su deparafinizirana u dvije serije ksilola, potom su rehidrirana sa serijom alkoholnih razrjeđenja (2 puta u 100%, 95%, 70%, te vodi) u trajanju od pet minuta. Potom je napravljeno otkrivanje antigenskih epitopa kuhanjem u citratnom puferu (pH vrijednost 6) ili pak u Tris- EDTA puferu (pH vrijednost 9) na način da su se u zagrijani pufer dodana stakalca s tkivnim rezovima te kuhala 20 minuta. Potom su stakalca ohlađena i isprana u PBS-u. Otopinom vodikovog peroksida u PBS-u (3%) u trajanju od 10 minuta tretirana su tkiva kako bi se inaktivirale endogene peroksidaze iz tkiva te su stakalca

potom isprana tri puta u PBS-u. Blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela napravljeno je s 1 - 3% goveđim serumskim albuminom u PBS puferu u vlažnoj komori tijekom jednog sata.

Primarno protutijelo je otopljeno u željenoj koncentraciji u 1% goveđeg serumskog albumina (BSA) u PBS puferu te inkubirano s tkivom na 4°C preko noći u vlažnoj komori. Prije nanošenja sekundarnog protutijela primarno je dobro isprano s PBS- T puferom. Inkubacija sa sekundarnim protutijelom (u željenoj koncentraciji u PBS /BSA 1%) je napravljena na sobnoj temperaturi u trajanju sat vremena. Stakalca su potom isprana minimalno tri puta s puferom PBS-T. Nanesen je DAB kromogen prema uputama proizvođača te je pušteno da se razvija boja 15 minuta uz praćenje reakcije na mikroskopu. Stakalca su oprana od DAB kromogena u destiliranoj vodi te su kratkim uranjanjem u hematoksilin (4 sekunde) obojene jezgre stanica. Hematoksilin je ispran u toploj i hladnoj vodi, a uzorci su dehidrirani serijom alkohola (70 %, 95%, 100%) u trajanju od 1 minute, ksilenom (2x po minuti) te je dodan mounting medij prije preklapanja s predmetnim stakalcem.

3.15. Analiza ukupnog genskog izražaja (sekvenciranje RNA)

Sekvenciranje RNA napravljeno je na uzorcima koji su sadržavali su jednaku količinu RNA (1,2 mikrograma) iz dva mužjaka, odnosno predstavljali su skupni uzorak dvije životinje. Ovaj postupak napravljen je kako bi se povećao broj životinja uključenih u analizu. Ukupno su korištena 3 uzorka po skupini (svaka skupina predstavlja 6 životinja). Priprema biblioteke cDNA i RNA sekvenciranje obavljani su u Novogene, Peking, Kina: mRNA je pročišćena od ukupne RNA pomoću poli-T oligo vezanih magnetskih zrnaca, a sekvenciranje izvršeno je Illumina HiSeq2000 (Illumina). Prosječna duljina očitavanja bila je 150 pb (parova bazi) te je generirano je 40M čitanja po uzorku.

Mišji referentni genom mm10 korišten je za mapiranje nepročišćenih očitavanja iz FASTQ datoteka. Dobivene datoteke u BAM formatu dalje su analizirane metodom Cufflinks i Cuffdiff za izračun transkripata i diferencijalne ekspresije gena koristeći FDR <0,01 kao graničnu vrijednost. DESeq2 paket korišten je za analizu diferencijalne ekspresije gena pomoću matrice s brojenim očitanjem mapiranim na svaki pojedinačni gen (114). Diferencijalna ekspresija gena i analiza obogaćivanja skupa gena pomoću Kyoto Enciklopedije gena i genoma (KEGG) provedeni su korištenjem R programskog jezika (115). R paket GAGE je upotrijebljen za analizu obogaćenja genskih setova (GAGE – generally applicable gene set enrichment) za identificiranje značajno izmijenjenih staničnih puteva po skupini (116). Paket Pathview korišten je za vizualizaciju promjena u KEGG staničnim putevima (117). Obojenje na vizualizaciji je prikazano iz zbroja $\log_2$ (promjene omjera) svih gena u jednom genskom čvoru (više gena koji imaju redundantnu funkcionalnu ulogu). Analiza genske ontologije (GO) izvršena je primjenom PANTHER testa. Analiza PCA komponenti je rađena u R programu, na rlog transformirani broju očitavanja.

3.16. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

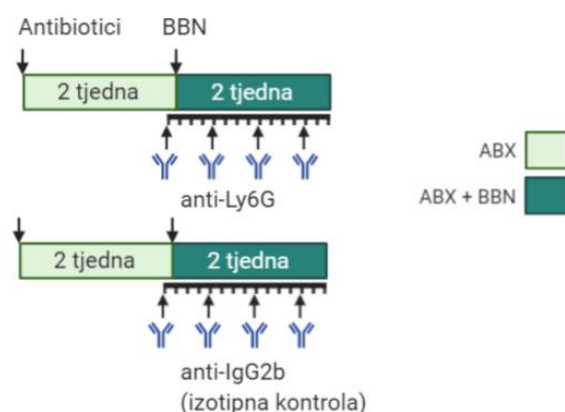
Kvantitativni PCR (qPCR) ili kvantitativna lančana reakcija polimerazom provedena je u cilju određivanja aktivnosti gena odnosno relativne količine izražaja gena. Metoda se zasniva na mjerenju fluorescencije molekule koja vezanjem na dvostruku uzvojnicu DNA daje fluorescentni produkt (fluorescentna proba SYBR GREEN). Korištenjem DNA polimeraze i početnica specifičnih za dio produkta (dio mRNA) gena od interesa u svakom ciklusu reakcije lančane polimeraze dolazi do udvostručavanja produkta te pojačanja fluorescencije. Pojačavanje fluorescencije kroz cikluse reakcije razmjerno je početnoj količini genskog produkta te se uspoređuje s pojačavanjem fluorescencije stabilno izraženog gena (kontrolni/referentni gen) koji predstavlja unutarnju kontrolu. Omjer pojačanja fluorescencije kod gena od interesa i kontrolnog gena predstavlja relativni izražaj gena u tom uzorku.

Analiza je provedena je na jednom mikrogramu RNA izoliranom iz zamrznute polovice mokraćnog mjehura i reverzno transkribiranog u cDNA pomoću Ambion Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Reakcija je izvedena korištenjem PowerUp SYBR Green Master mješavine (Thermo Fisher Scientific) na aparatu Biosystems 7500 real-time PCR (Thermo Fisher Scientific). Sljedeći temperaturni uvjeti korišteni su za reakciju: 50°C tijekom 2 minute, 95 °C tijekom 10 minuta, zatim 40 ciklusa amplifikacije (95 °C tijekom 15 sekundi, 60°C tijekom 1 minute s očitanjem fluorescencije) te završna analiza krivulje taljenja. Promjena ekspresije svakog gena izračunana je metodom $\Delta\Delta C_t$ na sljedeći način: ΔC_t (izračunato kao C_t (gen od interesa - GOI) - C_t (referentna kontrola - RF)) svakog uzorka iz ispitivane grupe (GF/AB) oduzet je od prosječnog ΔC_t svih kontrolnih uzoraka (SPF/B) da bi se dobio $\Delta\Delta C_t$, i srednja vrijednost $-\Delta\Delta C_t$ u svim ispitivanim uzoraka upotrijebljena je kao mjera promjene ekspresije gena. Sve su reakcije su izvedene u duplikatima. Svaka reakcija uključivala je gen Actb (aktin beta) kao referentnu kontrolu gena.

3.17. Deplecija neutrofila

Eksperiment delecije (uklanjanja) neutrofila napravljen je na miševima na antibiotskom i BBN tretmanu (AB grupa) budući da su rezultati histološke analize miševa na AB tretmanu upućivali na važnost granulocitnih stanica na rani imunološki odgovor na tretman BBN-om u mjehuru AB miševa te je ovim eksperimentom ispitan utjecaj odsutnosti neutrofila (vrste granulocita) na imunološki odgovor u miševa. Deplecija neutrofila je izvršena intraperitonealnom aplikacijom protutijela koje se selektivno veže na neutrofile te dovodi do njihovog uklanjanja iz krvotoka. Miševima je davano anti-Ly6G protutijelo (klon 1A8) prilagođeno za korištenje *in vivo*, počevši jedan dan prije početka tretmana BBN-om te davanjem protutijela svakog četvrtog dana tretmana (Slika 11). Korištena doza protutijela 200µg po mišu administrirana je u 100 µL filtriranog i autoklaviranog PBS-a. Kontrolna

skupina su bili miševi kojima je intraperitonealno administrirana izotipna kontrola (anti-IgG2b) u istom rasporedu kao i ispitivanoj skupini.



Slika 11. Shematski prikaz tretmana životinja u pokusu deplecije neutrofila

Uspješnost tretmana deplecije, odnosno uklanjanje neutrofila iz krvi provjereno je protočnom citometrijom. Za tu svrhu miševima je prilikom žrtvovanja uzeta krv, uzorci su potom tretirani ACK puferom za lizu eritrocita te bojani markerima neutrofila, protutijelima anti-Gr-1-fikoeritrin i anti-Ly6C-Alexa Flour 647, a udio neutrofila u krvi je izmjeren protočnom citometrijom na uređaju BD Accuri.

3.18. Analiza BBN metabolita metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u 24-stanom urinu te fecesu

Sadržaj BBN-a i BCPN-a u 24-satnom urinu i fecesu analiziran je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC metoda). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je tehnika koja se koristi za kvantificiranje komponenti smjese u kojoj je mobilna faza tekućina, a stacionarna faza kolona sa sitnim porama te se proces prolaza mobilne faze odvija pod visokim tlakom. Svaka komponenta u uzorku reagira ponešto različito s materijalom na koloni što dovodi do različite brzine protoka za različite komponente i do odvajanja komponenti prilikom izlaska iz kolone gdje se vrši detekcija UV detektorom. Za pripremu uzoraka za HPLC i pročišćavanje molekula od interesa od nečistoća, uzorci su prvo tretirani metodom ekstrakcije te metodom tankoslojne kromatografije prema metodi preuzetoj i prilagođenoj prema radovima Iida te Ozaki (118,119). Prikupljeni uzorci su prvo razrijeđeni destiliranom vodom do 2 mL te je dodano 13.5 µL koncentrirane klorovodične kiseline. Potom je u tri navrata uzorak ekstrahiran s etilnim

acetatom, a faze su miješane vorteksnim mješačem u trajanju od 1 minute. Prikupljeni organski sloj je sušen u vakuumskom otplinjaču. Osušeni talog je otopljen u 200 μ L etil-acetata te nanesen na ploču za razvijanje. Kao mobilna faza u tankoslojnoj kromatografiji korištena je smjesa kloroforma, metanola i ledene octene kiseline (u omjeru 18:1:1) u mraku. Uz uzorke na ploču su nanesheni standardi BBN i BCPN koji su služili za određivanje traka (engl. band) koji pripada ovim spojevima. Trake sa spojevima BBN i BCPN su sastrugane s ploče, a dobiveni silikagel s analitom je potom ispran u 4 ml acetona te filtriran kroz najlonske filtere (0.45 μ m, 13 mm). Dobiveni uzorak je ukoncentriran u vakuumskom otplinjaču do potpunog sušenja, a talog je otopljen u 200 μ L smjese izopropanola i acetonitril u omjeru 4:1. Ovakav uzorak je korišten u tekućinskoj kromatografiji. Kao stacionarna faza korištena je Ultra Cyano kolona (5 μ m, 250 x 4,6 mm, Restek), a mobilna faza korištena je smjesa dvaju otapala: A: acetonitril : voda = 15 : 85 uz dodatak 0,05 % TFA (trifluoroctena kiselina), B: acetonitril u različitim omjerima (gradijentna elucija). Detekcija je izvršena pomoću UV detektora pri 239 nm. Korišten je gradijent mobilne faze za bolje i brže razdvajanje komponenti od interesa. To je izvedeno primjenom sljedećih sastava mobilne faze pri sljedećim vremenima od injekcije uzorka u uređaj:

1. 0 min: 100 % A, 0 % B
2. 10 min: 100 % A, 0 % B
3. 30 min: 20 % A, 80 % B
4. 35 min: 20 % A, 80 % B
5. 37 min: 100 % A, 0 % B
6. 45 min: 100 % A, 0 % B

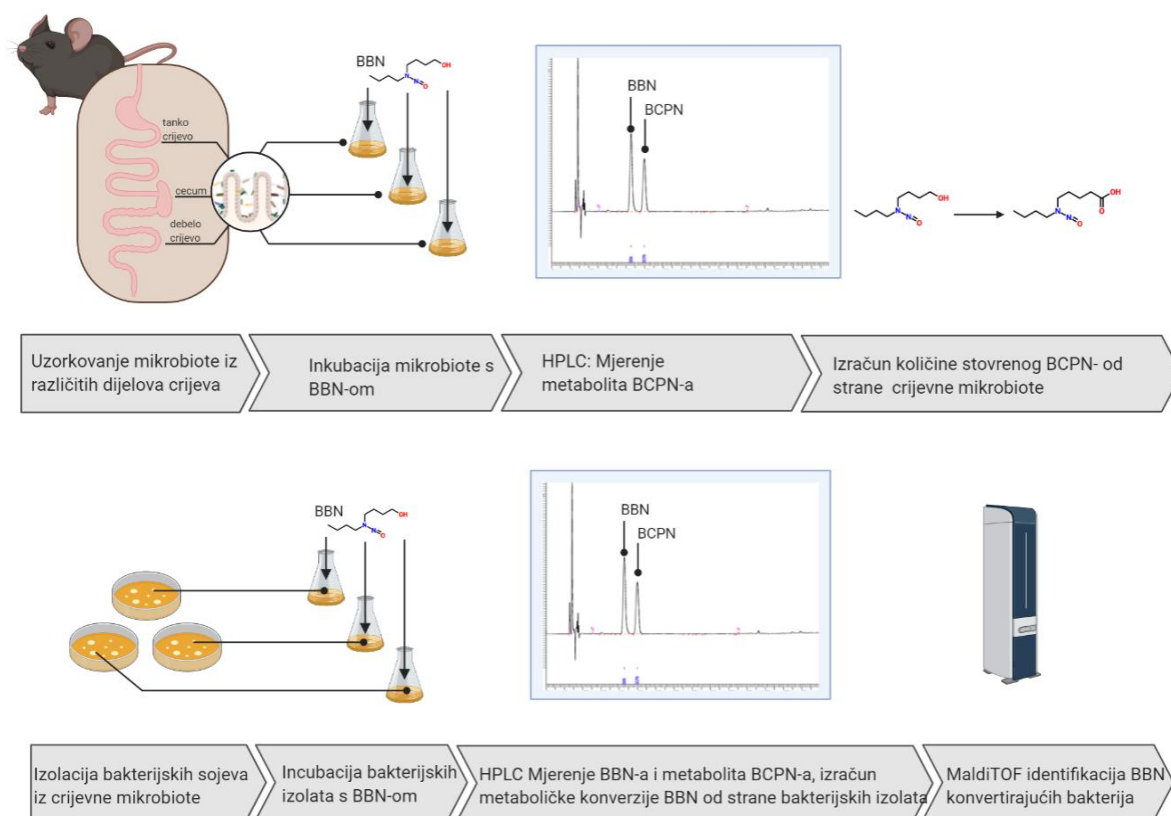
Protok mobilne faze iznosio je 1,2 ml/min. Ukupno je injektirano 10 μ l uzorka korištenjem autosamplera. Kolona je termostatisirana na temperaturi od 30°C.

Komponente BBN i BCPN u uzorku su identificirane uspoređivanjem njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarda. Prilikom svakog mjerenja uzoraka na HPLC-u, napravljeno je mjerenje i otopine standarda te su za određivanje pikova BBN-a i BCPN-a u uzorku korištena dobivena retencijska vremena u standardu. Približna retencijska vremena su bila: $R_t(\text{BBN}) = 7,72$ i $R_t(\text{BCPN}) = 9,00$.

3.19. Analiza konverzije BBN-a u BCPN crijevnim bakterijama

Ex vivo pokusima ispitivan je potencijal crijevnih bakterija da konvertiraju BBN u aktivni karcinogeni metabolit koji se izlučuje u urinu, BCPN. (Slika 12). Uzet je crijevni sadržaj miševa koji su tretirani dva tjedna antibioticima, te crijevni sadržaj kontrolnih miševa (koji nisu tretirani antibioticima), potom je taj sadržaj inkubiran s BBN-om u TSB mediju 24 sata na 37 ° C uz miješanje na 220 RPM. Korišten je crijevni sadržaj iz čitavog crijeva te pojedinačno crijevni sadržaj tankog crijeva, cekuma i debelog crijeva. BCPN u dobivenim

uzorcima mjeren je na HPLC-u na način opisan u prethodnom poglavlju. Budući da je konverzija bila najjača s crijevnim sadržajem iz tankog crijeva, izolirane su pojedinačne bakterije iz tankog crijeva miša (5 izolata) te su inkubirane s BBN-om u početnoj koncentraciji 20 – 30 milijuna stanica te u aerobnim te mikroaerofilnim uvjetima kisika (ostali uvjeti su bili kao i za crijevni sadržaj). Bakterije su potom identificirane na uređaju MaldiTOF.



Slika 12. Prikaz protokola eksperimenata analize konverzije BBN-a u BCPN crijevnim mikrobiomom i izolatima iz crijevnog mikrobioma

3.20 Analiza prisutnosti bakterija 16S sekvenciranjem te uzgojem u kulturi

Uspješnost redukcije mikrobiote antibioticima provjerena je na miševima tretiranim 2 te četiri tjedna antibioticima. Životinjama su uzeti svježi i nekontaminirani uzorci fecesa i urina. Uzorci su nanošeni na krvni agar te uzgajani u aerobnim i anaerobnim uvjetima preko noći za provjeru ukupne količine poraslih kolonija, odnosno ukupne količine anaerobnih i aerobnih bakterija u uzorku (kvantitativna analiza). Prilikom žrtvovanja miševa na kratkotrajnom tretmanu BBN-om sterilnim priborom uzeti su uzorci stolice te uzorci urina punkcijom iz mokraćnog mjehura. DNA je izolirana iz uzoraka pomoću *PowerSoil* kompleta (Qiagen, Njemačka) te je poslana na analizu 16S sekvenciranjem kako bi se odredile bakterije koje se nalaze u uzorcima (kvalitativna analiza). Metagenomsko sekvenciranje napravljeno

Illumina platformi na regiji V4 bakterijskog ribosomalnog gena 16S (amplikon od 250 parova bazi uparenih krajeva).

Za karakterizaciju raznolikosti vrsta (alfa raznolikost), određeno je bogatstvo vrsta (odnosno broj OTU-eva) i Shannonov indeks koji opisuje i brojnost i ravnomjernost prisutnih vrsta. Izračunava se kao relativan udio vrste (proporciju, p_i), koji se množi s prirodnim logaritmom tog udjela ($\ln p_i$), a dobiveni umnožak zbraja se po vrstama te množi s -1. Za procjenu različitosti mikrobioma između uzoraka i skupina uzoraka (beta raznolikost) izračunato je Unifrac filogenetsko stablo. „Unweighted“ (engl. neponderirani) Unifrac označava udio grana u filogeneskom stablu koje dijele promatrani uzorci ili skupine uzoraka (ne sadržava informaciju o ravnomjernosti vrsta), dok „Weighted“ (engl. ponderirani) Unifrac predstavlja udio zajedničkih grana ponderiranih po relativnoj proporciji vrsta (sadržava informaciju o brojnosti i ravnomjernosti vrsta). Dobivene matrice udaljenosti su vizualizirane PCA i PCoA analizom. Analiza glavnih komponenti (PCA ili engl. principal component analysis) je statistička metoda izdvajanja glavnih komponenti u podacima. PCA izdvaja prve dvije osi koje najviše odražavaju varijaciju u uzorcima stoga može prikazati različitosti visokodimenzionalnih podataka u dvodimenzionalnom grafu. PCoA (Principal coordinates analysis) je slična metoda kojom se reduciraju multidimenzionalni podaci u svojstvene vrijednosti i vektore.

3.21 Statistički postupci

Statistička obrada podataka (osim onih dobivenih sekvenciranjem) je napravljena u programu GraphPad Prism za Windows (GraphPad Software, USA). Distribucija podataka ispitivana je Shapiro-Wilk testom. Mann-Whitney test i Studentov T-test su korišteni za procjenu značajnosti kod neparametrijskih, odnosno parametrijskih podataka, dvosmjerni Studentov T-test za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitneyovim test za asimetričnu distribuciju. Za kategorijske podatke (tumorski stadij i količina degenerativnih promjena) korišten je hi-kvadrat test. Fisherov test je korišten za procjenu značajnosti pojave ulkusa po skupinama. Statistička analiza RNA-seq podataka izvedena je u programu R pomoću paketa DESeq2 s preporučenim zadanim parametrima. Procjena značajnosti napravljena je pomoću Wald testa, a FDR (engl. *False Discovery Rate*) p-vrijednosti manja od 0,01 i promjene omjera ekspresije (engl. *Fold change*, FC) $>\pm 2$ su bile granične vrijednosti za određivanje diferencijalno izraženih gena. Značajnost promjene izražaja gena dobivene metodom qPCR određivana je dvosmjernim Studentovim T-testom za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitneyovim testom za asimetrično distribuirane (Shapiro-Wilk test za distribuciju). Korelacija promjene omjera ekspresije gena dobivene metodom RNA-Seq i PCR u stvarnom vremenu procijenjena je koristeći Pearsonovu korelaciju, a značajnost koristeći dvosmjerni Studentovi T-test.

REZULTATI

4.1. Utjecaj mikrobiote na mokraćni mjehur

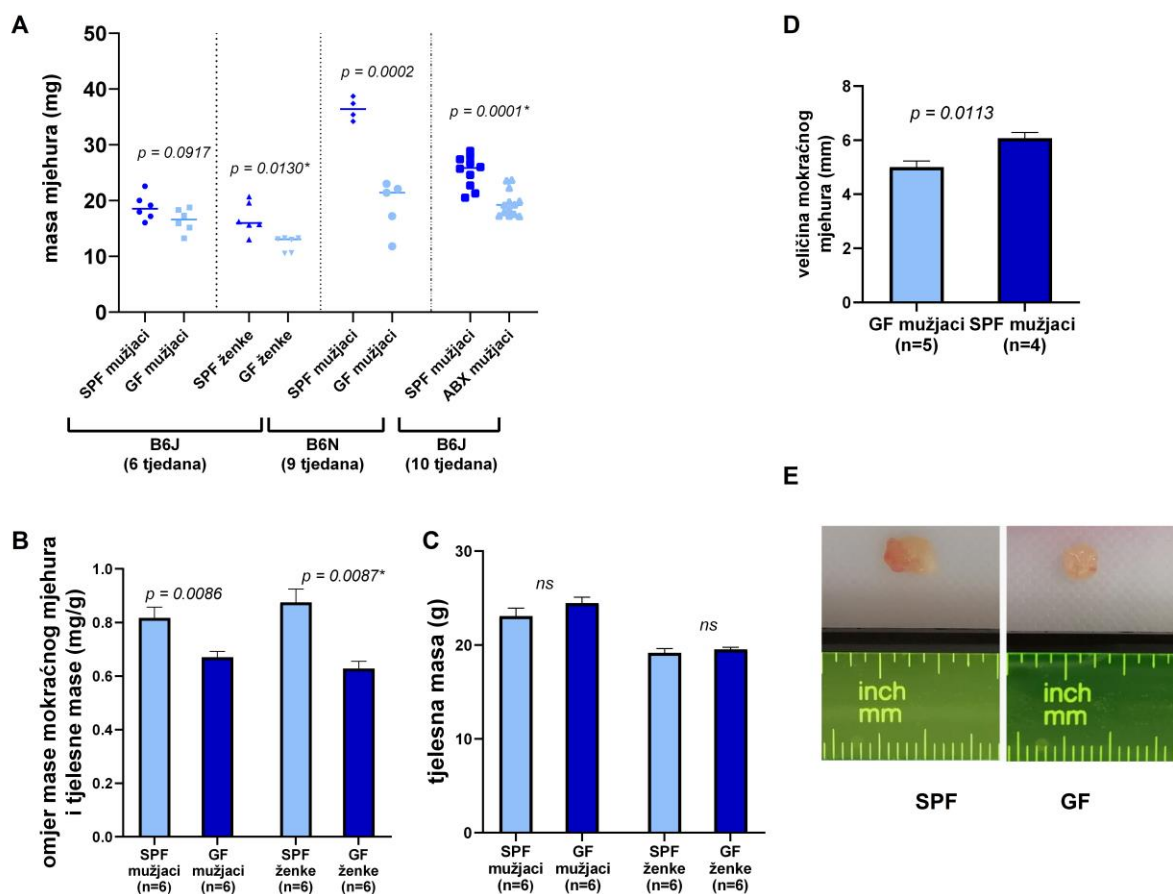
4.1.1. Masa i veličina mokraćnog mjehura u ovisnosti o mikrobioti

Mase mokraćnog mjehura te neke opće karakteristike akseničnih (GF) i miševa uzgajanih u uobičajenim uvjetima (SPF) prikazane su u Tablici 7 i na Slici 13. Prosječna masa mjehura akseničnih i antibioticima tretiranih miševa bila je 25% lakša u odnosu na mjehure SPF miševa. Razlika je bila značajna kod ženki miševa podsoja B6J ($p=0.005$, $n=12$), mužjaka podsoja B6N ($p=0.00003$, $n=9$) i mužjaka B6J tretiranih antibioticima ($p=0.0002$, $n=23$), dok kod mužjaka podsoja B6J uočena razlika nije bila značajna ($p=0.09$, $n=12$). Aksenični i SPF miševi nisu se razlikovali u ukupnoj tjelesnoj masi.

Tablica 7. Usporedba masa mokraćnog mjehura po analiziranim grupama

Status mikrobiote	Usta-nova	Podsoj	Broj životinja	Starost (tjedni)	Spol	Masa mokraćnog mjehura (mg) ^d	<i>P</i> – vrije-dnost	Omjer mase mjehura i tjelesne mase ^d	<i>P</i> – vrije-dnost ^e
SPF	IGC ^a	B6J	6	6	mužjaci	18.82 ± 2.31	0.09175	1.24 ± 0.14	0.0086
GF	IGC	B6J	6	6	mužjaci	16.45 ± 2.09		1.5 ± 0.12	
SPF	IGC	B6J	6	6	ženke	16.82 ± 2.83	0.0130	1.16 ± 0.17	0.0087
GF	IGC	B6J	6	6	ženke	12.28 ± 1.35		1.61 ± 0.18	
SPF	HZI ^b	B6N	4	9	mužjaci	36.43 ± 2.01	0.00023	-	-
GF	HZI	B6N	5	9	mužjaci	19.1 ± 4.65		-	
Kontrola (SPF)	USSM ^c	B6J	10	11	mužjaci	25.17 ± 2.85	0.0001	-	-
Antibiotska redukcija	USSM	B6J	13	11	mužjaci	19.5 ± 2.33		-	

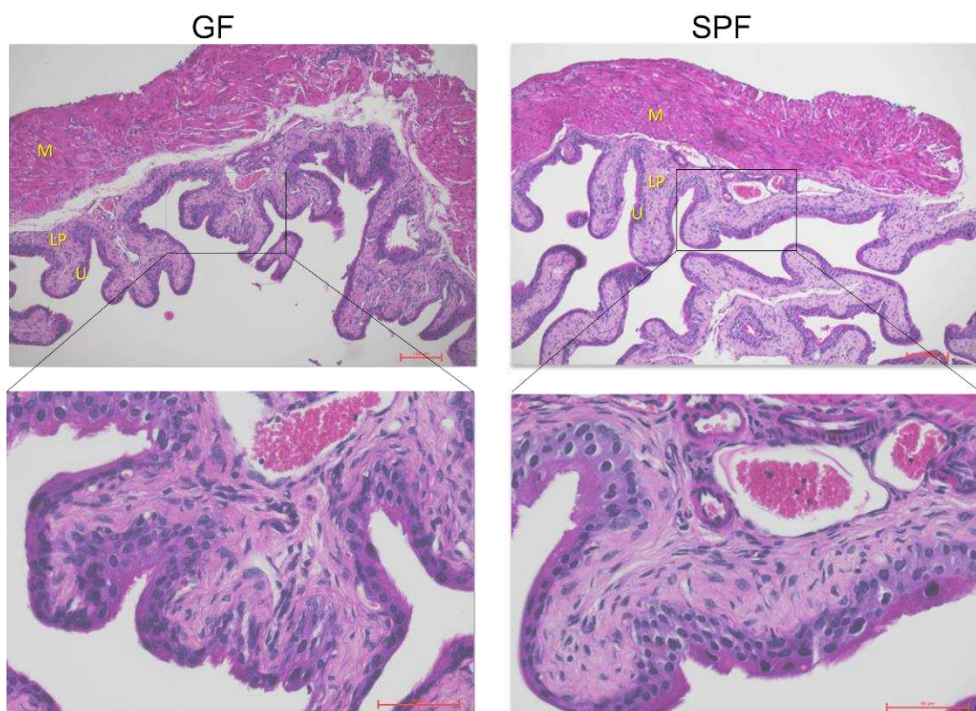
^aInstitut Gulbenikan de Ciencia, Oeiras, Portugal, ^bHelmholtz Centar za upalu, Braunschweig, Njemačka, ^cSveučilište u Splitu Medicinski fakultet, ^dsrednja vrijednost ± SD, ^e*P*-vrijednost je izračunata pomoću Studentovog T-Test za prvu i treću grupu te Mann-Whitney za drugu i četvrtu grupu miševa.



Slika 13. Usporedba mase i veličine mokraćnog mjehura GF i SPF miševa. **A.** Masa mokraćnog mjehura svih grupa miševa. **B.** Omjer mase mokraćnog mjehura i tjelesne mase za 6-tjedana stare B6J miševe. **C.** Tjelesna masa B6J miševa starih 6 tjedana. **D.** Veličina mjehura (duljina u mm) B6N-miševa starih 9 tjedana. Oznake predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardna pogreška. Studentov T-test (*p*-vrijednost bez zvjezdice) i Mann-Whitney test (*p*-vrijednost sa zvjezdicom) korišteni su za određivanje značaja **E.** Reprezentativne fotografije GF i SPF mjehura. (ABX - antibiotici, *ns* - neznajno).

4.1.2. Patohistološka analiza tkiva

Patohistološkom analizom tkiva mokraćnog mjehura GF i SPF životinja koristeći hemalaun-eozinom obojene preparate nisu pronađene nikakve razlike u građi, rasporedu i debljini glavnih slojeva tkiva te razlika u masi nije povezana s nalazima u histološkoj analizi preparata tkiva (Slika 14).

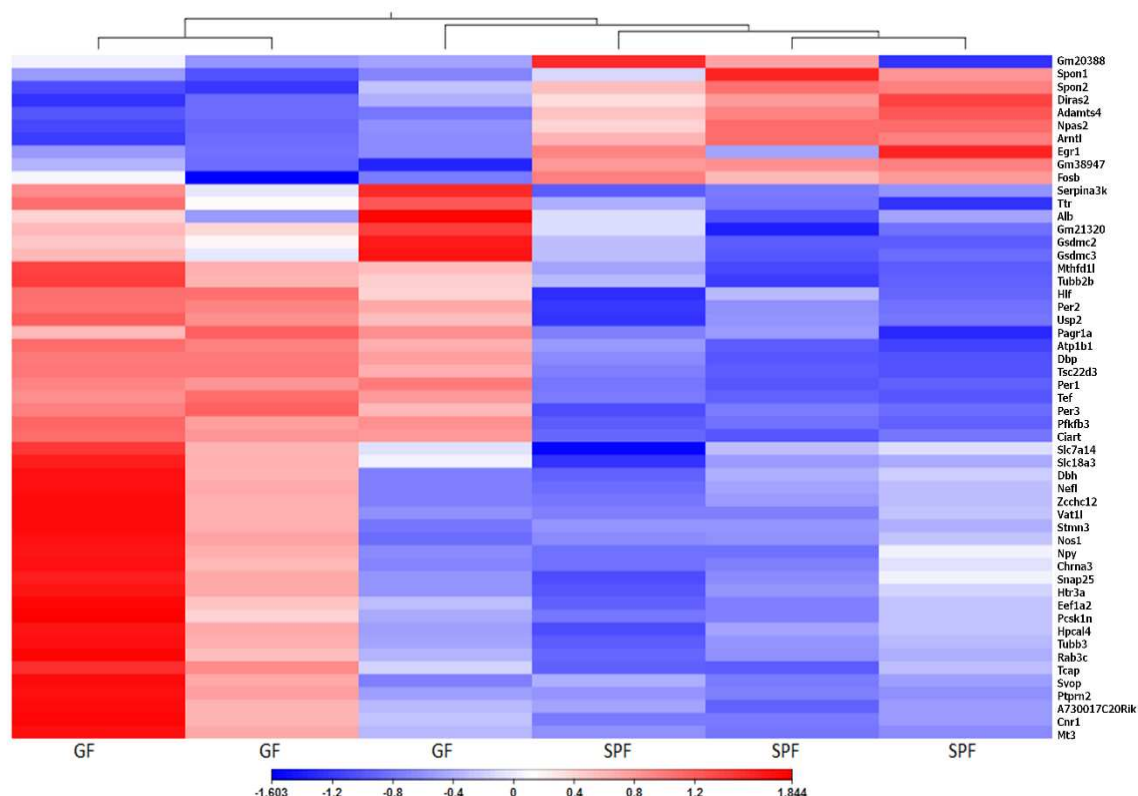


Slika 14. Tkivo mokraćnog mjehura GF i SPF životinja. Hematoksilin-eozin obojeni preparati. Slova predstavljaju slojeve: U – urotel. LP – lamina propria, M – mišićni sloj.

4.1.3. Izražaj gena kod akseničnih miševa

Transkriptom mokraćnog mjehura je promijenjen u miševa uzgojenih u akseničnim uvjetima u odnosu na SPF miševe. Kao prag značajnosti uzeta je dvostruka razlika u izražaju gena između grupa te FDR-(engl. *false discovery rate*, statistička korekcija za "lažne" promjene) korigirana p-vrijednost manja od 0.01. Ukupno je bilo 97 različito izraženih gena, od toga 84 gena s povećanim i 13 gena sa smanjenim izražajem u akseničnim miševa (Slika 15). Gen s najvećim smanjenjem izražaja je gen nepoznate funkcije Gm20388, s 44 puta nižom ekspresijom, te Gm38947, isto gen nepoznate funkcije, s 12 puta nižom ekspresijom, Arntl, je gen koji sudjeluje u regulaciji cirkadijanog ritma te je bio 4 puta manje izražen. Geni s najvećim povećanjem u izražaju bili su geni za imunoglobulinske lance Igkv4-68 (povećanje od 159 puta), Igkv1-122 (povećanje izražaja za 240 puta) i gen koji kodira za jedan od glavnih urinarnih proteina u miša Mup7 (engl. *major urinary protein 7*) koji je bio 208-puta više izražen.

Rezultati dobiveni RNA sekvenciranja provjereni su metodom kvantitativne reakcije lančane polimeraze za trinaest odabranih gena. Korelacijski koeficijent (R^2) za promjenu izražaja gena dobiven dvjema metodama bio je 0.9, a p-vrijednost manja od 0.0001, odnosno na taj su način rezultati dobiveni RNA sekvenciranjem potvrđeni na većem broju životinja.



Slika 15. Prikaz različito izraženih gena u tkivu mokraćnog mjehura u GF i SPF miševa. Prikazane su Z-vrijednosti (broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije).

Korištenjem KEGG (engl. *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes*) baze podataka pronađeno je 25 staničnih puteva sa značajno smanjenim izražajem gena i 5 puteva sa značajno povećanim izražajem gena. Analiza mrežnim alatom GO (eng. *gene ontology*, hrv. genska ontologija) pokazala je različito izražene gena u 14 bioloških procesa uključujući cirkadijani ritam, sinaptički prijenos signala i stanično signaliziranje (Tablica 8). Najobogaćenije stanične komponente (odnosno stanične komponente s najvećim porastom u genskom izražaju) prema GO analizi bile su izdanci živčanih stanica (dendriti), izdanci stanica i sinapse.

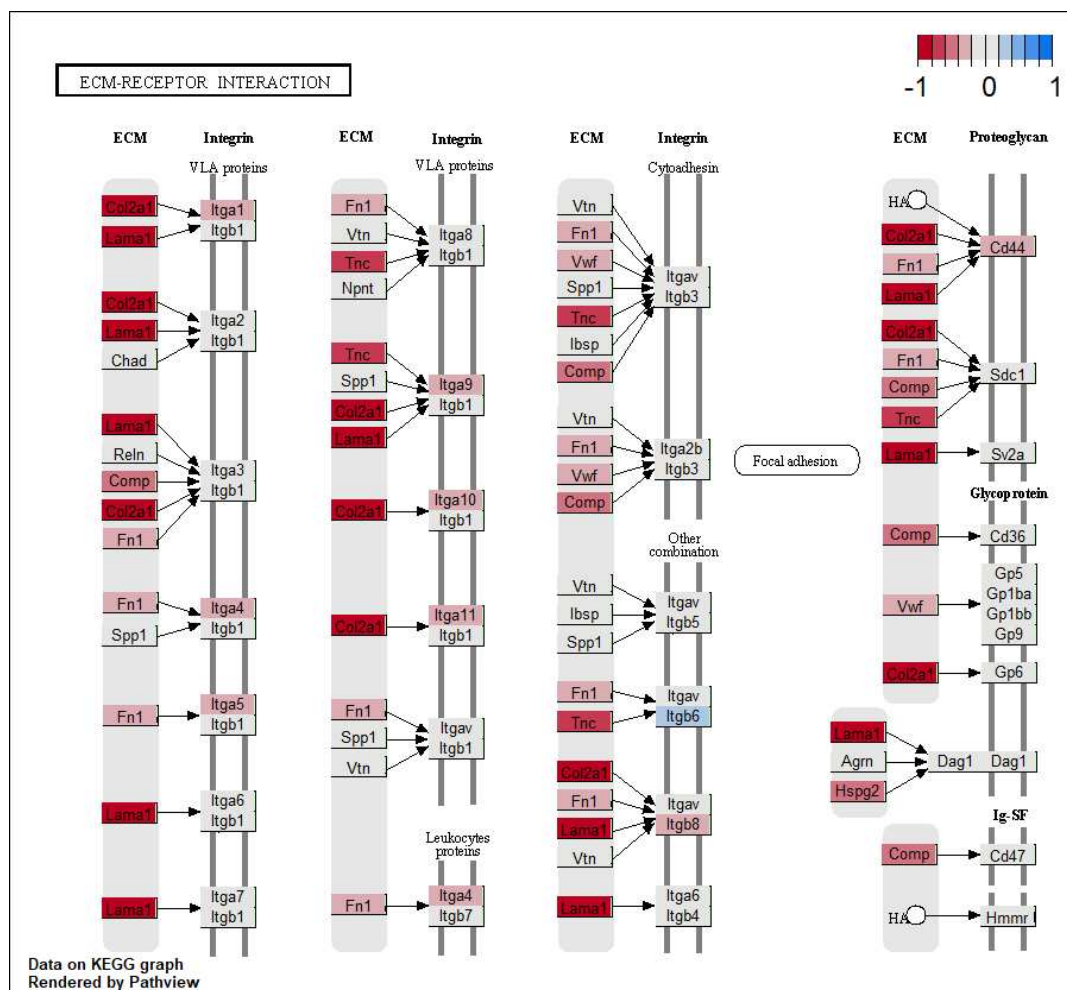
Tablica 8. Popis bioloških procesa obogaćenih u mjehurima GF miševa prema GO analizi.

GO Biološki proces	Broj gena u biol. procesu	Broj gena promijenjenog izražaja	Obogaćenje genskog izražaja	P-vrijednost	FDR p-vrijednost
Cirkadijani ritam	13	4	71.35	7.28E-07	5.92E-05
Ritmički procesi	13	4	71.35	7.28E-07	4.44E-05
Neuromuskularni sinaptički prijenos	47	4	19.74	6.83E-05	2.78E-03
Sinaptički prijenos	392	15	8.87	2.11E-10	2.58E-08
Medustanično signaliziranje	588	18	7.1	9.30E-11	2.27E-08
Stanična komunikacija	3269	28	1.99	2.48E-04	6.06E-03
Stanični procesi	8762	58	1.54	3.64E-05	1.78E-03
Egzocitoza vezikula u sinapsi	58	3	11.99	2.31E-03	3.75E-02

Procesi živčanog sustava	1393	16	2.66	3.13E-04	6.94E-03
Procesi u jednom višestaničnom organizmu	2258	23	2.36	1.08E-04	3.77E-03
Procesi višestaničnog organizma	2274	23	2.35	1.14E-04	3.49E-03
Odgovor na endogene podražaje	229	6	6.08	5.33E-04	1.08E-02
Biosintetički procesi	1719	17	2.29	1.50E-03	2.61E-02

Nekoliko cirkadijanih gena bilo je različito izraženo između GF i SPF miševa. Tako je gen *Arntl*, dio jezgrinog molekularnog mehanizma cirkadijanog sata, bio je manje izražen, dok je *Ciart*, cirkadijani gen koji negativno regulira ekspresiju ostalih cirkadijanih gena bio je pojačano izražen u GF miševima. Geni *Egr1*, *Fosb* i *Npas2* i *Nfil3* kodiraju cirkadijane faktore transkripcije te je njihova ekspresija značajno smanjena u tkivima mokraćnog mjehura GF miševa.

Nekoliko gena koji kodiraju za proteine izvanstanične tvari/matriksa (VSM) bilo je različito izraženo u GF i SPF miševa. Primjerice nekoliko genskih čvorova koji predstavljaju kumulativnu ekspresiju promjene više gena kolagena, laminina i tenascina imali su smanjen izražaj (Slika 16). Geni koji kodiraju za VSM proteine spondine *Spon2* i *Spon1* bili su manje izražen u mjehurima GF miševa. *Spon2* sudjeluje u prepoznavanju bakterija u VSM-u i aktiviranju imunološkog odgovora, dok *Spon1* ima ulogu u neurogenezi i održavanju cirkadijanog ritma (120,121). *Adamts4*, gen s cirkadijanom ekspresijom, koji kodira enzim uključen u kidanje agrekana i hrskavice, bio je manje izražen je u GF miševa. Metaloproteinaza *Mmp12*, uključena u rezanje elastina i remodeliranje VSM-a, bila je više izražena u GF mjehurima.



Slika 16. KEGG stanični put ‘Interakcija izvanstaničnog matriksa i membranskih molekula’. Zacrvenjeni su genski čvorovi koji imaju sniženu kumulativnu ekspresiju.

Geni koji su uključeni u regulaciju koncentracije kalcija i signalizaciju kalcijem u stanici su različito izraženi u mjehurima GF i SPF miševa. Kalcij služi kao drugi glasnik koji propagira brojne unutarstanične i izvanstanične signale, regulirajući staničnu proliferaciju i apoptozu kao i aktivnost enzima (122). Gen *Atp1b1* kodira za membranski protein koji održava gradijent natrijevih i kalijevih iona kroz staničnu membranu, bio je više izražen u GF miševima (123). Gen *Unc80*, koji kodira za dio složenog natrijevog NALCN kanala koji transportira natrijeve ione u stanice i igra ključnu ulogu u sposobnosti stanica neurona da odašilju membranski električni signal, bio je 14 puta više izražen u mjehurima GF miševa (124). Osim stanične signalizacije, regulatori transkripcije enzima za detoksikaciju bili su različito izraženi u mjehurima GF miševa. Transkripcijski faktori PAR bZip, Tef, Hlf and Dbp su ujedno i primarni senzori ksenobiotika, te su imali viši izražaj u tkivu mjehura GF miševa.

4.1.3.1. Izražaj gena imunološkog sustava

Budući da GF životinje nemaju bakterija, bilo je za očekivati da će receptori za prepoznavanje patogena i njihove signalne molekule biti različito izraženi zbog odsustva mikroba. Međutim, niti jedan receptor za prepoznavanje molekula patogena (tzv. PAMP-ova) nije bio različito izražen. Tri gena koja kodiraju proteine s protuupalnom ili imunosupresivnom funkcijom imali su povišen izražaj u GF mjehurima: član porodice TSC22 (Tsc22d3), alfa-1-kiselina glikoprotein 1 (Orm1) i inhibitor peptidaze serina ili cisteina (Serpina3k). Šest gena imunoglobulinskih lanaca imali su povećan izražaj u mjehurima GF životinja, uključujući lagane lance kapa i lambda, kao i nekoliko teških lanaca (Tablica 9).

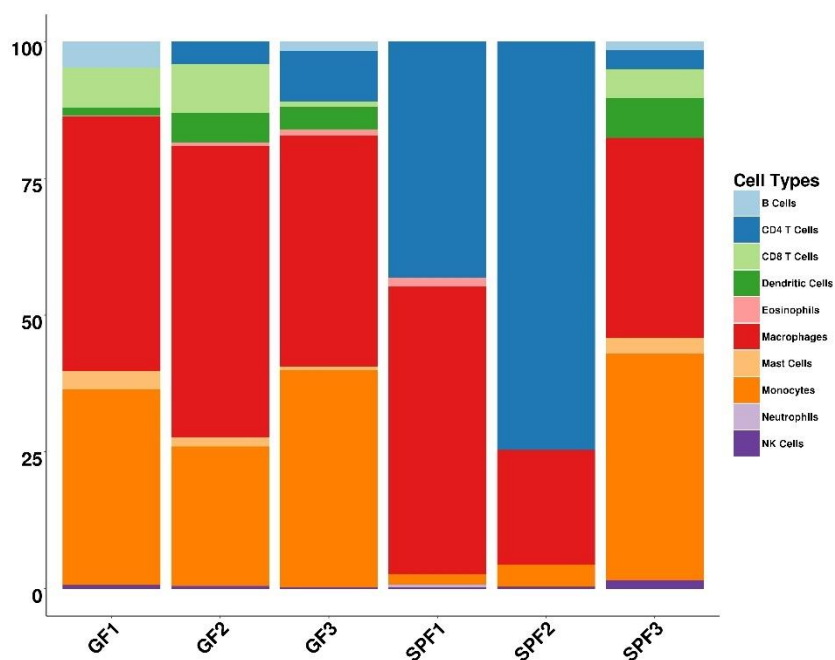
Tablica 9. Lista različito izraženih gena za imunoglobulinske lance.

Genska kratica (simbol)	Identifikacijska oznaka	Ime gena	Srednja vrijednost SPF izražaja ^a	Omjer promjene (GF vs. SPF)	FDR p-vrijednost
Iglc2	ENSMUSG00000076937	Imunoglobulin lambda konstantni dio 2	4	14.4	6.0E-03
Igkv15-103	ENSMUSG00000076523	Imunoglobulin kapa lanac varijabilni dio 15-103	7	20.7	2.4E-03
Iglv2	ENSMUSG00000076940	Imunoglobulin lambda varijabilni dio 2	1	60.2	1.9E-03
Ighv1-36	ENSMUSG00000094051	Imunoglobulin teški lanac varijabilni dio 1-36	0.3	159.0	6.3E-03
Igkv4-68	ENSMUSG00000076549	Imunoglobulin kapa varijabilni dio 4-68	0.3	159.5	3.8E-03
Igkv1-122	ENSMUSG00000095497	Imunoglobulin kapa lanac varijabilni dio 1-122	0.3	240.3	1.2E-03

^aSrednja vrijednost ukupnog zbroja je srednja vrijednost normaliziranog broja očitavanja za svaki gen u tri kontrolna (SPF) uzorka.

Iz RNA seq podataka napravljena je procjena sastava imunološkog mikrookoliša. Za to je korišten alat „ImmuCC“ koji iz transkriptomskih podataka procjenjuje relativni omjer 10 vrsta imunoloških stanica: B-stanica, CD4 T-stanica, CD8 T-stanica, dendritičkih stanica, eozinofila, makrofaga, mastocita, monocita, neutrofila i prirodnoubilačkih stanica. Rezultati su pokazali da su u mokraćnom mjehuru tri GF miša dominiraju monociti i makrofagi, dok su pak makrofagi i CD4 T-stanice dominantne u dva (od tri) uzorka SPF miševa (Slika 17). Osim ovih stanica detektirane su i ostale vrste imunoloških stanica, no u manjem postotku, te ne u svim

uzorcima. Rezultati nisu pokazali grupiranje uzoraka prema SPF i GF podijeli, stoga izgleda da se GF i SPF mjehuri ne razlikuju po sastavu rezidentnih imunoloških stanica.

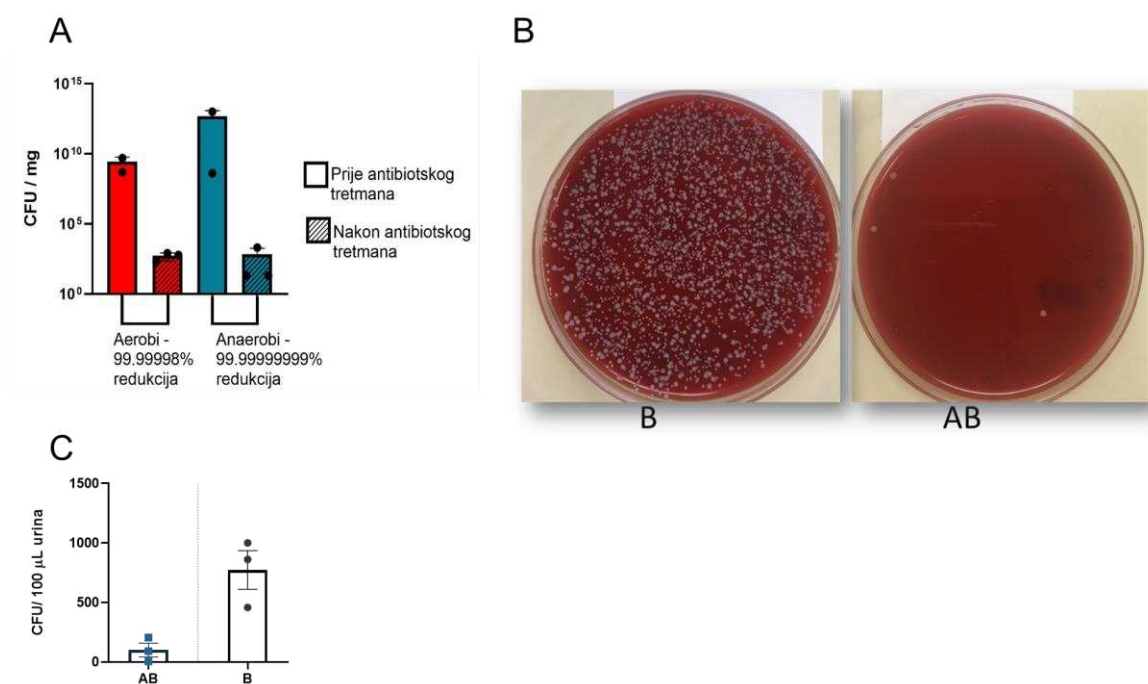


Slika 17. Relativan omjer imunoloških stanica u mokraćnom mjehuru GF i SPF miševa iz transkriptomskih podataka dobiven korištenjem alata „ImmuCC“.

4.2. Utjecaj mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura

4.2.1 Kvantitativna i kvalitativna potvrda antibiotske redukcije mikrobioma

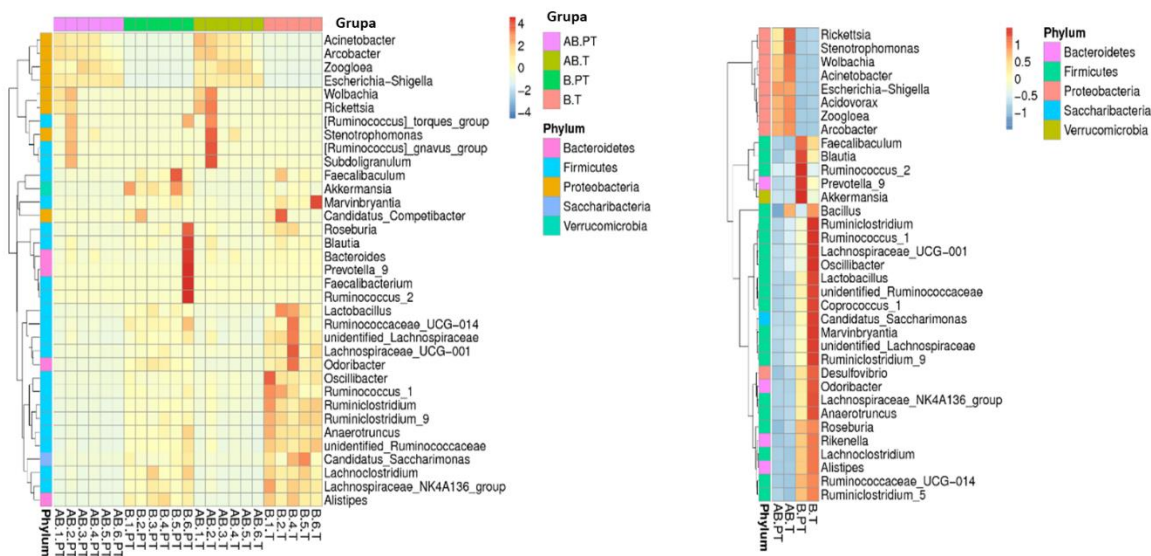
Kako bi se provjerila uspješnost redukcije mikrobioma korištenjem antibiotika, nasađeni su uzorci fecesa AB miševa (tretirani antibioticima) i B miševa (bez antibiotskog tretmana) na neselektivni krvi agar u anaerobnim i aerobnim uvjetima, a broj bakterija je izračunat kao CFU (engl. *colony forming unit*) po miligramu fecesa. Broj aerobnih bakterija u prosjeku se snizio za milijun puta (s 10^9 /mg na 10^3 /mg) nakon tretmana antibioticima, dok se broj anaerobnih bakterija smanjio za milijardu puta (s 10^{12} /mg na 10^3 /mg) (Slika 18), čime je dokazano da je antibiotska redukcija bakterija bila vrlo uspješna. Broj bakterija u urinu prikupljenog u metaboličkim kavezima bio je 7 puta niži u životinja s antibiotskom redukcijom mikrobiote, no moguće je da je kontaminacija s fecesom i bakterijama iz okoliša, utjecala na ovaj rezultat (Slika 18C).



Slika 18. **A** Broj poraslih bakterijskih kolonija (CFU) iz miligrama uzorkovanog fecesa u aerobnim i anaerobnim uvjetima **B** Primjeri ploča s nasađenim AB i B uzorcima fecesa, vidljiv je manji broj kolonija u uzorku miševa na antibiotskom tretmanu (AB uzorak) **C** Broj bakterija u urinu AB i B životinja.

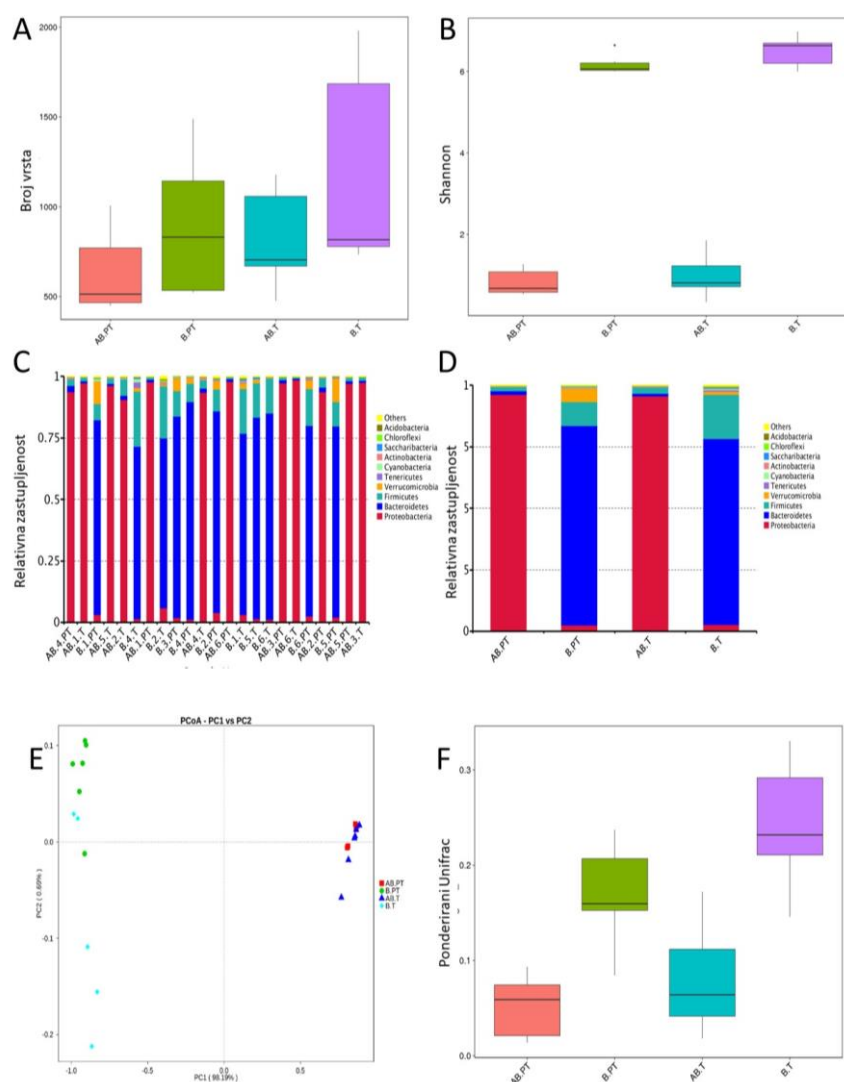
Za kvalitativnu analizu mikrobiote nakon antibiotskog tretmana, napravljeno je 16S sekvenciranje DNA izolirane iz fecesa i urina AB i B miševa. Sekvenciranje je napravljeno Illumina platformi na regiji V4 bakterijskog ribosomalnog gena 16S (amplikon od 250 parova baza) generiralo je oko 150,000 očitavanja po uzorku fecesa te 20-80,000 po uzorku urina.

Filtrirana (efektivna) očitavanja su grupirana u OTU-eve (engl. *taxonomic unit*) tako da zadovoljavaju kriterij o 97% sličnosti sekvence. Analiza zajednice mikroorganizama pomoću 16S sekvenciranja je relativna analiza, odnosno broj očitavanja predstavlja samo relativan omjer prisutnih sekvenci te se iz njega ne može doći do apsolutnog broja bakterijskih stanica.



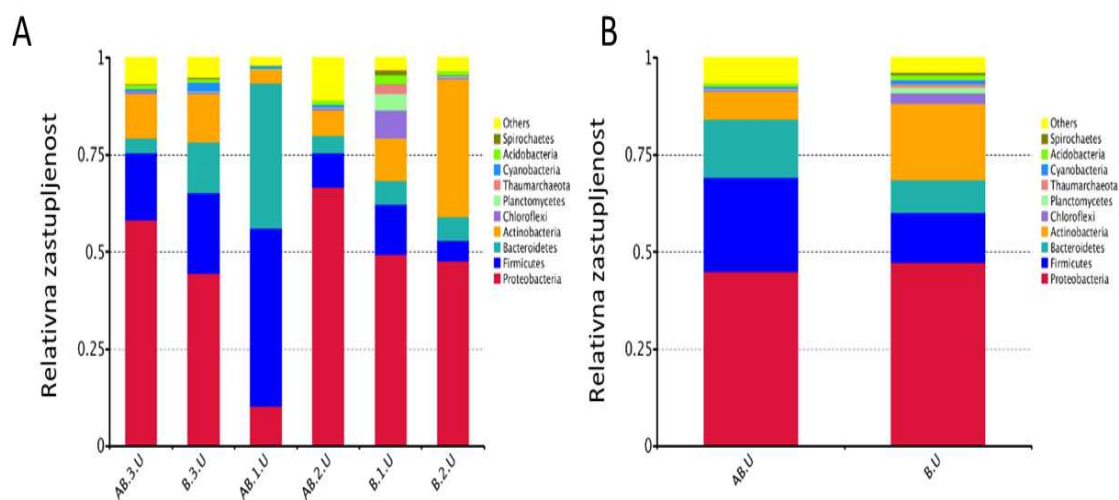
Slika 19. Bakterijski rodovi s najvećim razlikama među pojedinačnim uzorcima i grupama. (Uzorci .PT su uzeti na kraju predtretmana i prije početka tretmana BBN-om, odnosno nakon 2 tjedna antibiotika za AB životinje i vode za B životinje, uzorci .T su uzeti na kraju dvotjednog tretmana BBN-om za B životinje, odnosno antibioticima i BBN-om za AB životinje)

metodom Ponderiranog Unifrac, koja sadržava informaciju o brojnosti i ravnomjernosti zajedničkih vrsta među svim grupama, pokazala je manju vrijednost za AB miševe nego B miševe, odnosno od ukupnog broja pronađenih vrsta više ih je bilo u B miševa Slika 20F). Zaključno, iz rezultata 16S sekvenciranja vidljivo je da antibiotski tretman uvelike reducira raznolikost mikrobioma u fecesu. Kombiniranjem rezultata analize 16S sekvenciranjem te kvantitativne analize uzgojem u bakterijskoj kulturi možemo zaključiti da tretiranje miševa antibioticima smanjuje raznolikost i brojnost bakterijskih vrsta u probavnom traktu miševa: u fecesu ostaje 10^6 puta manje aerobnih te 10^9 puta manje anaerobnih bakterija. Ipak određen broj bakterija preživi, a od rezistentnih dominiraju one iz skupine *Proteobacteria*.



Slika 20. Rezultati 16S sekvenciranja uzoraka fecesa AB i B miševa prije i nakon dvotjednog tretmana BBN-om. **A** Broj bakterijskih vrsta (OUT-eva) **B** Shannon indeks alfa raznolikosti **C**. Relativna zastupljenost bakterijskih koljena po pojedinačnim uzorcima **D** Relativna zastupljenost bakterijskih koljena po grupama **E** i **F** Beta raznolikost - grupiranje uzoraka prema PCoA analizi te Unifrac analizi.

Analizom bakterijskog sastava urina 16S sekvenciranjem nisu pronađene razlike među skupinama AB i B. Sekvenciranjem je generiran malen broj ukupnih očitavanja u nekoliko uzoraka te je samim time kvaliteta analiziranih podataka bila niža. Budući da se radi o uzorcima s jako malim bakterijskom biomasom, bilo kakva kontaminacija u procesu izolacije te umnažanja DNA mogla je značajno utjecati na krajnji rezultat. Gledajući relativne omjere bakterijskih koljena, AB i B urin imaju sličan sastav. *Proteobacteria* dominiraju s gotovo 50% zastupljenosti, druge visoko zastupljene skupine su bile *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* (Slika 21).



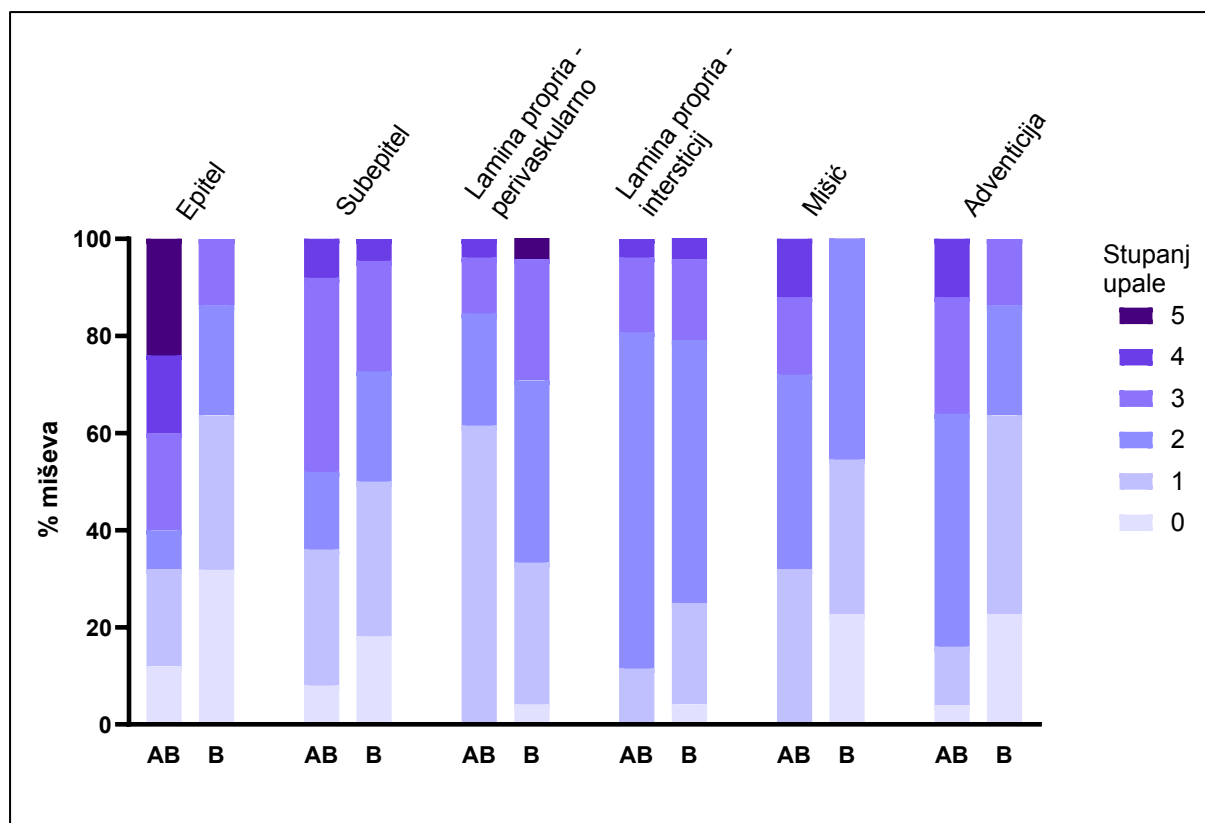
Slika 21. Rezultati 16S sekvenciranja uzoraka urina AB i B miševa nakon dvotjednog tretmana BBN-om. **A.** Relativna zastupljenost bakterijskih koljena po pojedinačnim uzorcima **B.** Relativna zastupljenost bakterijskih koljena po grupama.

4.2.1 Degenerativne promjene u urotelu nakon dvotjedne izloženosti BBN-u

Rezultati patohistološke analize mokraćnog mjehura nakon kratkotrajnog (dvotjednog) tretmana BBN-om pokazali su prisutnost jakog upalnog odgovora te degenerativnih promjena ili reaktivne atipije kod većine životinja. Predneoplastične (displazija) i neoplastične promjene nisu bile prisutne. Degenerativne promjene uključivale su blage i uniformne citološke promjene, poput povećanja jezgri s rahlim i pravilno raspoređenim kromatinom i jasno vidljivim jezgricama, smanjenu celularnost, hiperkromaziju, blagu dezorganizaciju staničnih slojeva i varijabilnost u veličini stanica ili jezgara i često upalni infiltrat unutar urotela. U proučavanom tkivu degenerativne promjene urotela smo svrstavali u tri kategorije: značajne, srednje, minimalne ili nepostojeće prema količini urotela zahvaćenog promjenama: <30% minimalne, 30% - 60% srednje i preko 60% značajne (Slika 22).

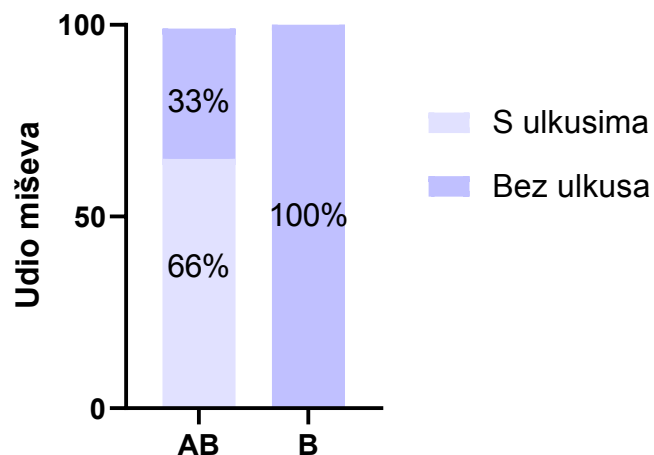


Slika 22. Relativni udjeli (postotci) miševa podijeljeni prema kategorijama degenerativnih promjena nakon dvotjednog tretmana BBN-om.



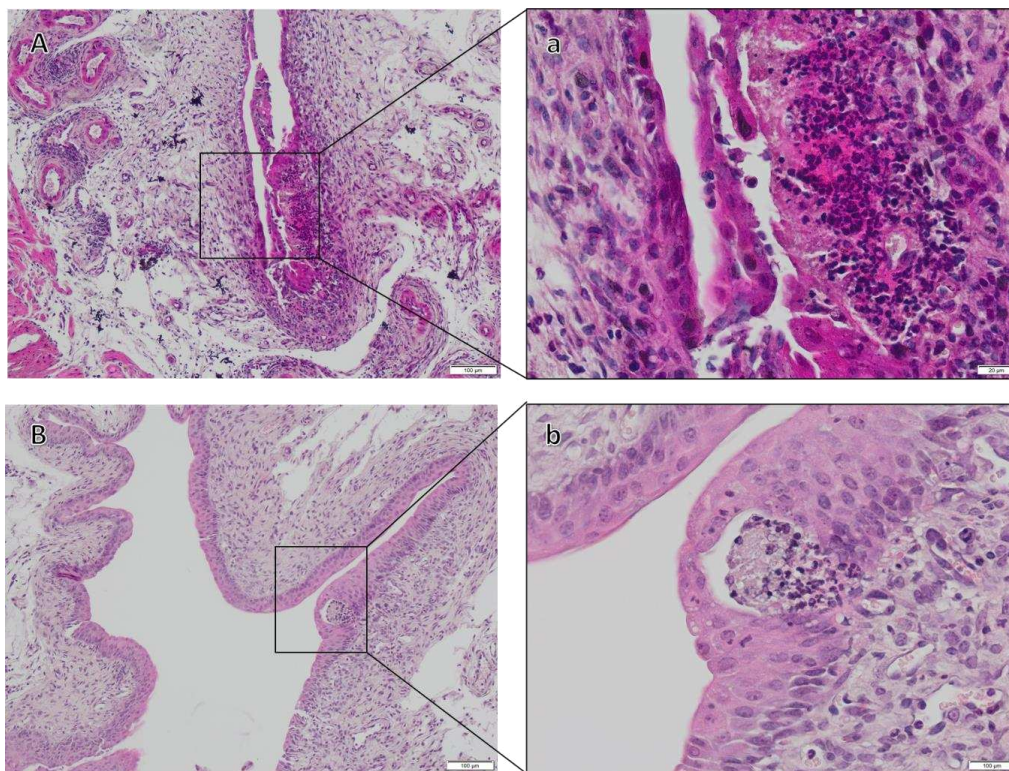
Slika 23. Relativni udjeli (postotci) AB i B miševa podijeljeni prema stupnjevima upale u slojevima mokraćnog mjehura.

Između promatranih skupina nije pronađena značajna razlika u količini degenerativnih promjena u promatranim kategorijama promjena, osim u prisutnosti ulkusa u urotelu (Slika 22). Stupanj upale u epitelu je bio veći u AB miševa nego u B miševa, što se poklapalo s pojavom ulkusa koji su bili ispunjeni granulocitnim leukocitima (Slika 23). Ulkusi su bili prisutni u 66% ($n=25/38$) AB miševa, a nisu prisutni u miševa bez redukcije mikrobiote ($n=0/40$) što predstavlja statistički značajnu razliku (p vrijednost <0.00001) (Slika 24).



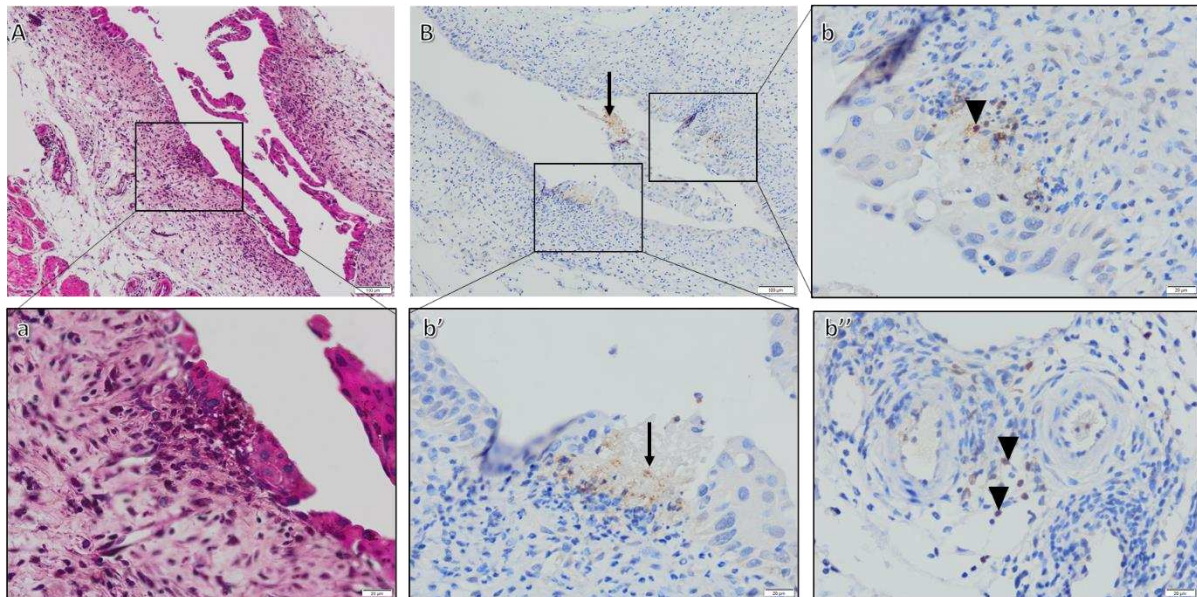
Slika 24. Relativni udjeli (postotci) miševa sa i bez ulkusa u mokraćnom mjehuru nakon dvotjednog tretmana BBN-om.

Ulkusi su na mjestu prekinutog urotela sadržavali fibrinogeni čep te mješavinu nekrotičnih stanica i granulocita (Slika 25). Osim ulkusa u tkivima antibiotski tretiranih životinja bili su prisutni subepitelni mikroapscesi i apscesi koji su moguća preteča ulkusa (Slika 25).

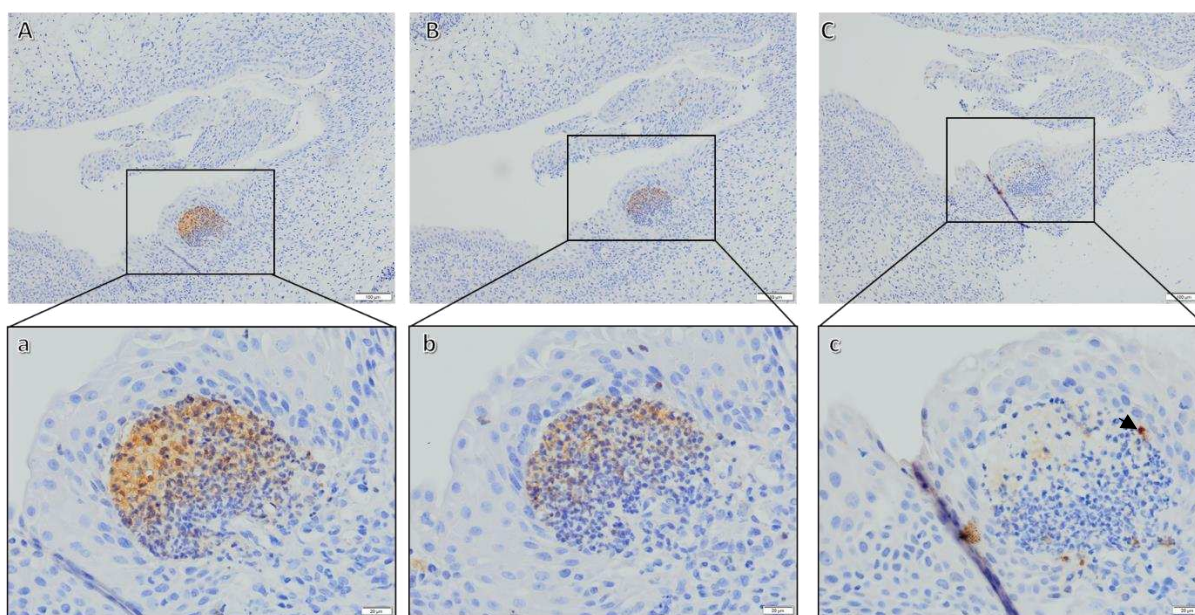


Slika 25. Promjene u urotelu AB miševa nakon dvotjednog tretmana BBN-om, **A, a** Ulkus **B, b** Subepitelni apsces

Imunohistokemijskim bojanjem s markerima za različite granulocite te druge imunološke markere nije jednoznačno okarakteriziran imunološki infiltrat ulkusa zbog nespecifičnog bojanja staničnog detritusa (Slika 26 i Slika 27). Imunohistokemijskim bojanjem pokazano je da su poneke stanice u ulkusu pozitivne na Embp (marker eozinofila), dok se veći dio ulkusa, uključujući stanični detritus, boja pozitivno na Mmp9, metaloproteazu koju mogu sadržavati različiti leukociti te Ly6g, marker neutrofila (Slika 27).

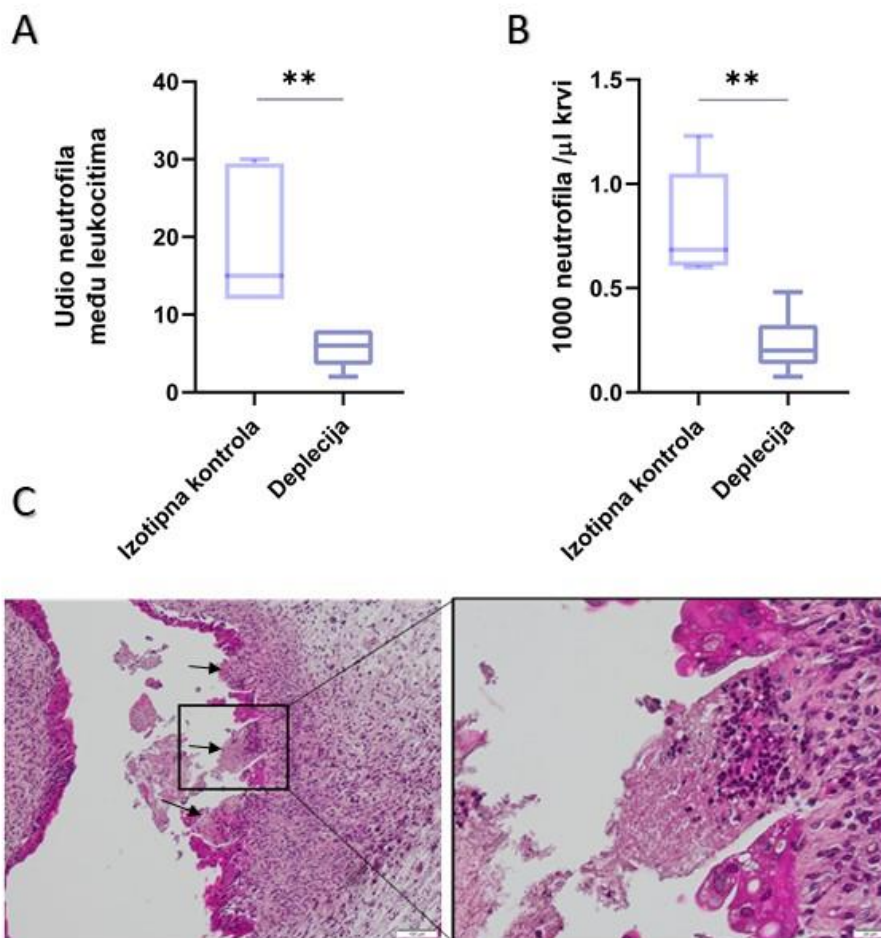


Slika 26. Ulkus i subepitelni apsces. **A, a** Ulkus i subepitelni apsces (u crnim kvadratima) obojen HE bojanjem **B, b, b''** isti preparat obojen markerom neutrofila (Ly6g), vidljive pozitivne stanice (glava strelice) kao i nespecifično bojanje (strelica) **b''** isti preparat, primjer specifičnog bojanja neutrofila Ly6g markerom.



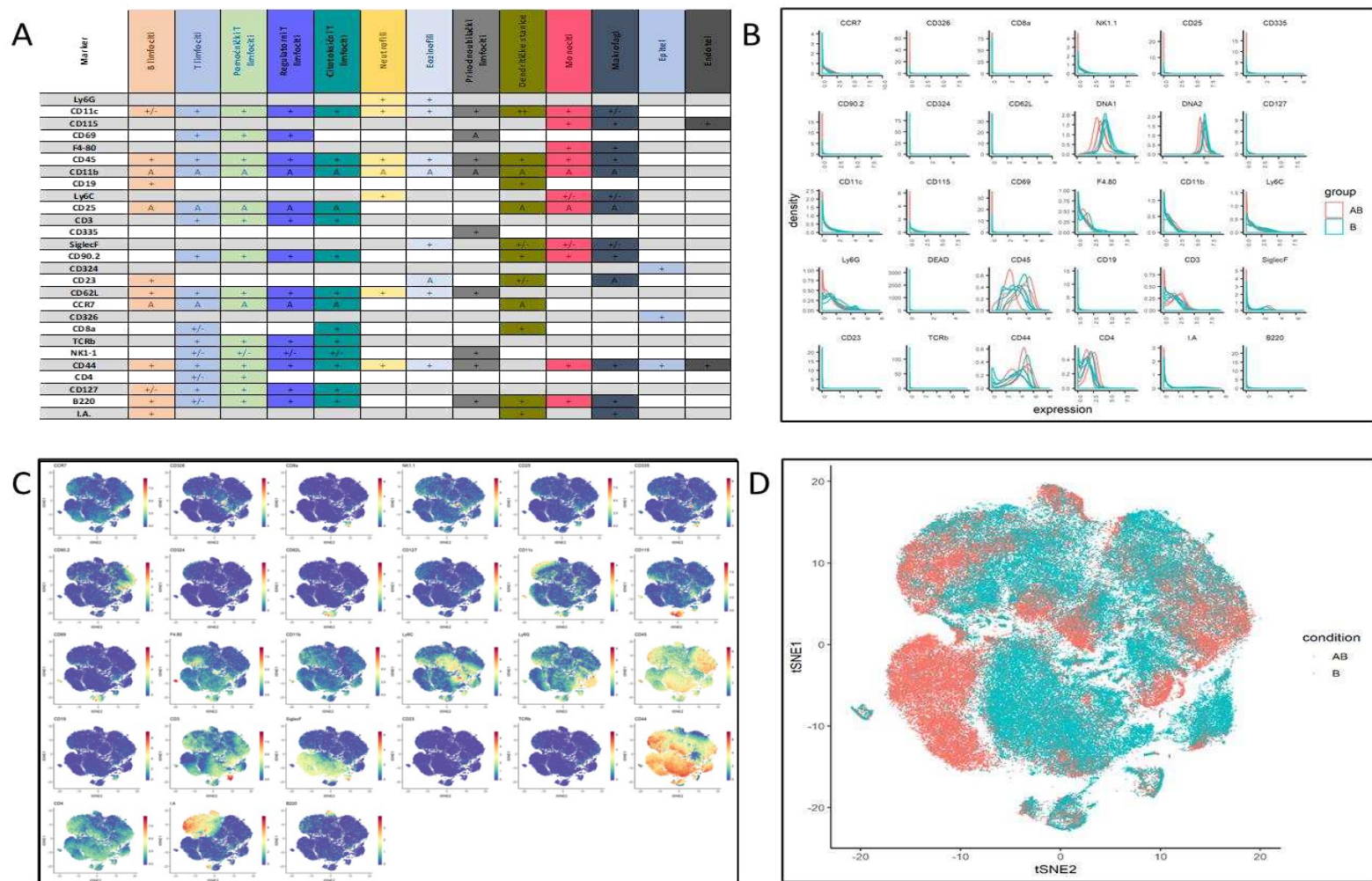
Slika 27. Imunohistokemijsko bojanje subepitelnog apscesa **A,a** Marker neutrofila (Ly6g), vidljivo nespecifično obojenje staničnog detritusa **B,b** Marker Mmp9 (prisutan u raznim imunološkim stanicama, poglavito neutrofilima), vidljivo specifično i nespecifično obojenje **C,c** Marker eozinofila (Embp), vidljivo specifično bojanje manjeg broja stanica.

Kako bismo dokučili jesu li granulociti u ulkusima uglavnom neturofili i jesu li odgovorni za nastanak ulkusa, izveden je pokus neutrofilne deplecije pomoću protutijela koje se specifično veže na površinsku molekulu na neutrofilima te dovodi do njihovog uklanjanja. Deplecijom je postignuto značajno smanjenje broja neutrofila u krvotoku miševa (Slika 28A i B), no nije dobiveno manje ulkusa, što kazuje da ulkuse ne uzrokuju neutrofili svojim djelovanjem (Slika 28C).



Slika 28. Rezultati deplecije neutrofila. **A.** Smanjen udio neutrofila među leukocitima krvi nakon primjene deplecijskog protutijela **B.** Smanjen ukupan broj neutrofila u krvi nakon primjene deplecijskog protutijela **C.** HE obojen preparat mjehura nakon uspješne deplecije neutrofila, vidljiva su tri ulkusa u urotelu (strelice).

Kako bi se izbjegao problem nespecifičnog bojanja u ulkusima s imunohistokemijskim markerima te kako bi se napravila sveobuhvatna analiza imunološkim stanicama u mjehuru, izolirane su stanice mjehura AB i B miševa nakon dvotjednog tretmana te analizirane masenom citometrijom. Upotrijebljen je panel markera širokog spektra za sveobuhvatnu karakterizaciju imunoloških stanica u tkivu (Slika 29A). Uporabom tSNE algoritma za vizualizaciju i analizu visoko dimenzionalnih podataka, pokazano je da, od korištenih markera, najveću razliku među grupama pokazuju Siglec-F pozitivne stanice, (Siglec-F je molekula koja se najčešće nalazi na eozinofilima) (Slika 29B, C, D). Budući da je prethodnim imunohistokemijskim bojanjima pokazano da dominantne stanice u ulkusu nisu eozinofili te da su masenom citometrijom karakterizirane stanice iz čitavog tkiva, ne samo iz ulkusa, ostaje da se ova tema dodatno prouči. No pak možemo reći da uklanjanjem bakterija antibiotskim tretmanom dovodimo do promjene dinamike upalnog odgovora i do pojačanog nakupljanja Siglec-F granulocita koji možda dovode do oštećenja u urotela i ulkusa.



Slika 29. Karakterizacija imunoloških stanica u mokraćnom mjehuru masenom citometrijom. **A.** Tablica korištenih markera te imunološke stanice koje ih izražavaju (A- aktivirane). **B.** Ekspresija promatranih markera u pojedinačnim uzorcima. **C.** Ekspresija markera nakon tSNE vizualizacije klastera. **D.** Razlike između AB i B uzoraka u tSNE klasterima – samo AB uzorci imaju CD44⁺CD45⁺SiglecF⁺ klaster.

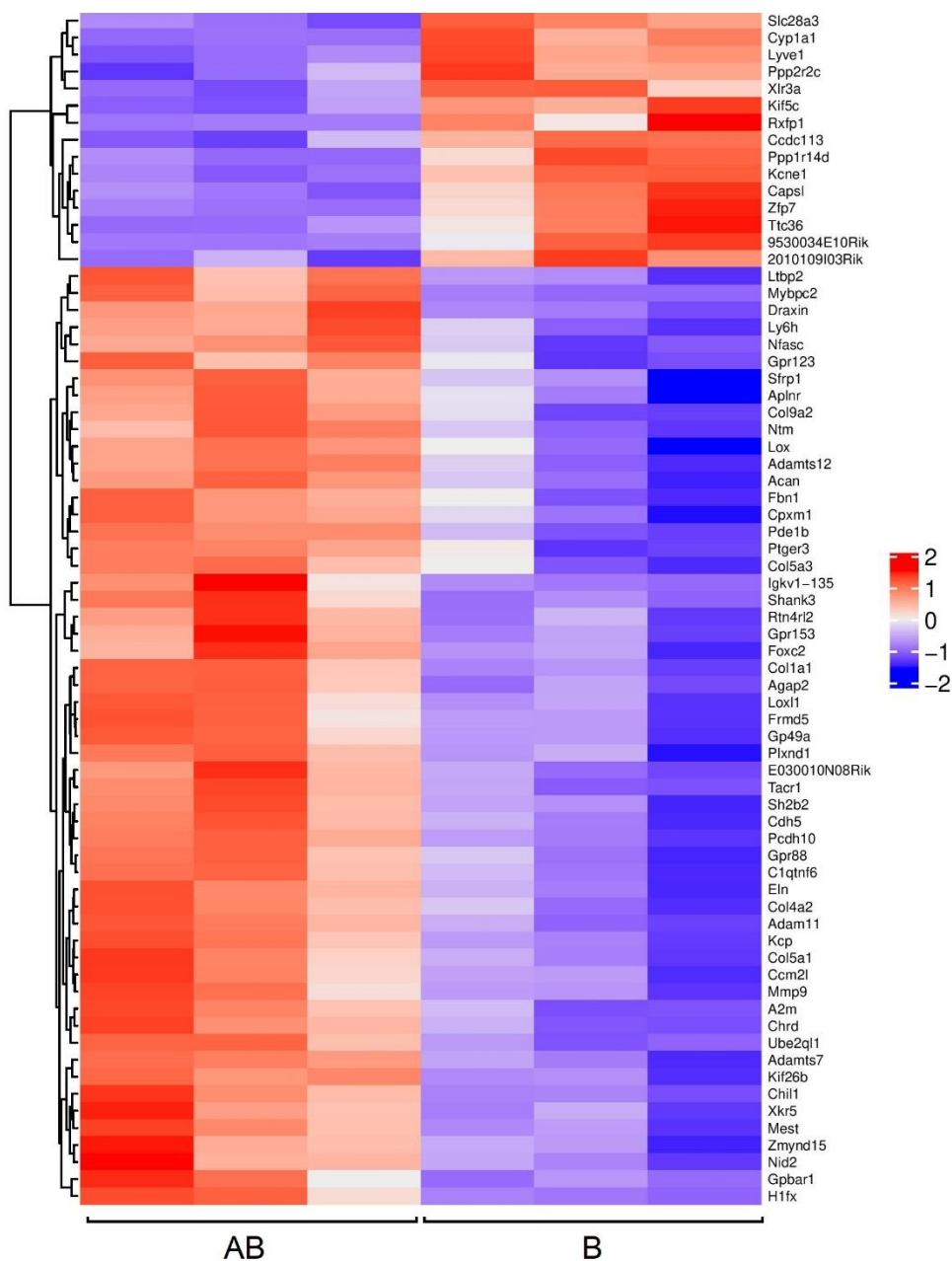
4.2.3 Izražaj gena u mokraćnom mjehuru nakon dvotjedne izloženosti BBN-u

RNA sekvenciranjem pokazano je da je ukupan transkriptom mokraćnog mjehura miševa na dvotjednom BBN tretmanu mijenja kada se miševе dodatno tretira i s antibioticima. Za prag značajnosti je uzeta dvostruka razlika u izražaju gena između grupa s FDR-korigiranom p-vrijednošću manjom od 0.01 te je utvrđeno 70 značajno, različito izraženih gena između dvije skupine miševa (AB i B). Odnosno bilo je 15 gena sa smanjenim izražajem, a 55 s povećanim izražajem u mjehurima AB miševa u usporedbi s B miševima (Slika 30). Najpromijenjeniji geni bili su Ppp1r14d, regulatorna inhibitorna podjedinica protein fosfataze 1 uključene u razne procese u stanici poput metabolizma glikogena i kontrakcije mišića, te Xlr3a, X-vezan gen nedovoljno istražene funkcije, oba gena su imali 6 puta nižu ekspresiju u AB miševa. Geni s najvećim povećanjem izražaja bili su Igkv1-135 - imunoglobulinski kapa lagani lanac nepoznate funkcije (11 puta) te A2m - alfa 2 makroglobulin je inhibitor koagulacije krvi koji inhibira trombin (4 puta).

Dobiveni podatci dalje su analizirani pomoću alata Gene Ontology (GO) i mrežnog sučelja GOrilla te su diferencijalno izraženi geni sistematizirani prema biološkim procesima i staničnim komponentama. U tkivu mjehura AB miševa pojačani su procesi organizacije kolagena i struktura izvanstaničnog matriksa (Tablica 10), a nije bilo promjena u procesima povezanim s imunološkim odgovorom.

Tablica 10. Biološki procesi promijenjeni u AB miševa

Biološki proces	Broj gena uključenih u biološki proces	Broj gena promijenjene ekspresije	Obogaćenje genskog izražaja	P-vrijednost	FDR p-vrijednost
Organizacija kolagenskih vlakana (GO:0030199)	11	3	89.3	9.59E-06	1.98E-02
Organizacija izvanstaničnog matriksa (GO:0030198)	56	4	23.39	3.37E-05	3.48E-02
Organizacija nadstaničnih struktura (GO:0043062)	63	4	20.79	5.21E-05	3.59E-02

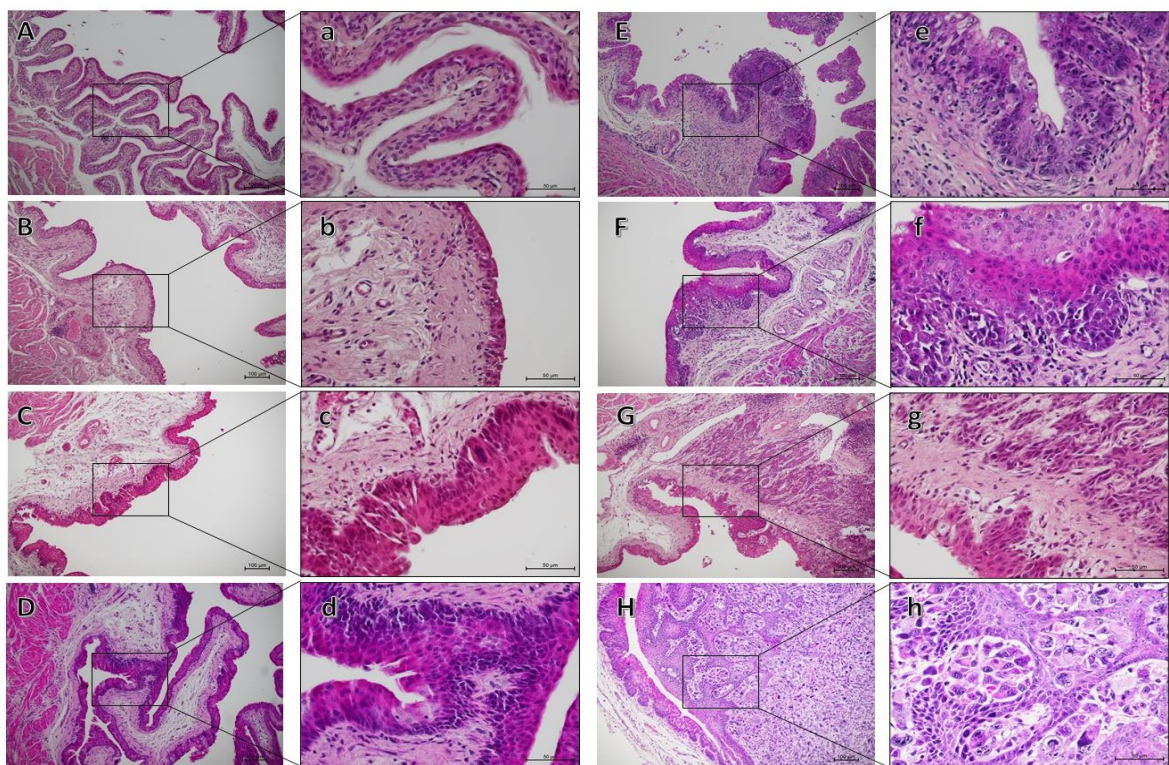


Slika 30. Prikaz različito izraženih gena u tkivu mokraćnog mjehura u AB i B miševa na dvotjednom tretmanu. Prikazane su Z-vrijednosti (broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije).

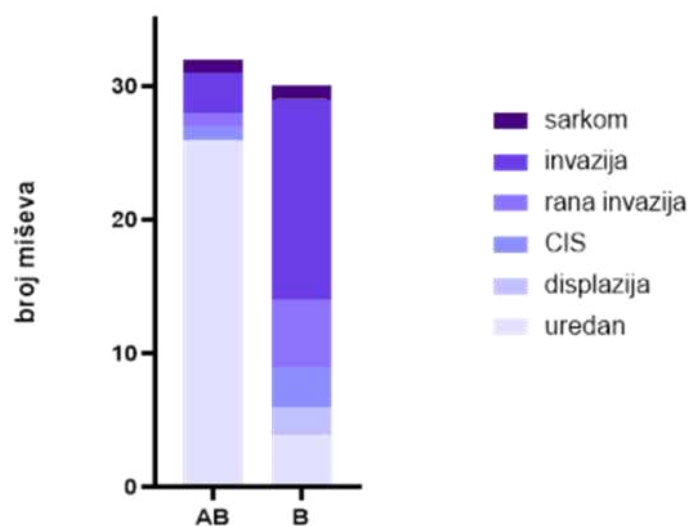
4.2.4 Tumorski stadij nakon dugotrajnog tretmana BBN-om

Patohistološkom analizom mokraćnog mjehura nakon duge izloženosti BBN-u ispitana je prisutnost predneoplastičnih (displazija) i neoplastičnih promjena u tkivu mokraćnog mjehura. Tkivni preparati su svrstavani u sljedeće kategorije: uredno tkivo/reaktivna atipija, displazija, CIS, rana invazija u laminu propriju, kasna invazija (T1-T3) te invazivni urotelni karcinom s sarkomatoidnom diferencijacijom (Slika 31). Uzorci kod kojih su bile su prisutne samo degenerativne promjene i upalni infiltrat, no stanice su zadržavale uniformnost svrstavani su u kategoriju uredan/reaktivna atipija, dok je kod displazije bio izražen pleomorfizam, smanjena diferenciranost, hiperkromazija i natiskivanje jezgara, odnosno obilježja predneoplastičnih promjena. Stadij *carcinoma in situ* ili CIS karakterizirao je izražen pleomorfizam, hiperkromatske jezgre, mitoze u gornjim slojevima i diskohezivne stanice te je razlika između CIS-a i displazije u slučajevima kad to nije bilo jasno iz drugih parametara, potvrđivana je Ki67 bojanjem, odnosno ispitivanjem proliferativne aktivnosti stanica po slojevima. Invazije su podijeljene u ranu i kasnu invaziju: rana invazija je određena kao pojava jedne ili nekolicine stanica koje su prešle bazalnu membranu, dok se kasna invazija odnosi na sve ostale invazivne oblike karcinoma osim sarkomatoidne diferencijacije koja je izdvojena u zasebnu kategoriju. U slučaju kada nije bilo jasno posrijedi li invazija, preparati su bojani s Krt5, urotelnim markerom kako bi se ispitalo prisustvo urotelnih stanica iza bazalne membrane. Od ostalih diferenciranih oblika, kod nekih invazivnih tumora zabilježena je pojava pločaste diferencijacije u manjem dijelu tumorskog tkiva. Papilarni oblici (Ta) nisu zabilježeni, a moguća invazija u druge organe, limfne čvorove nije ispitivana.

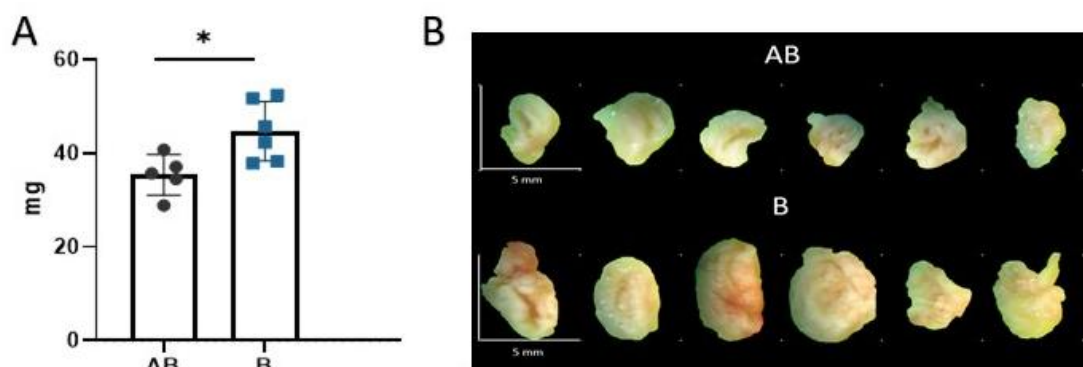
Rezultati patohistološke analize mokraćnog mjehura su pokazali značajno (p -vrijednost= $1.6 \cdot 10^{-5}$, $n=62$) manju incidenciju tumora u miševa koji su uz karcinogen BBN uzimali i antibiotike (AB miševi). Miševi grupe AB su imali manje uznapredovalu tumorsku bolest (stadij) u usporedbi s B miševima (Slika 32). Većina AB miševa bila je u potpunosti bez tumorske bolesti (81%, $n=26/32$), dok je većina B miševa razvila predneoplastične i neoplastične promijene u tkivu mjehura (86%, $n=26/30$). Invazivni tumori, najagresivniji tip tumora, su pronađeni kod 70% ($n=26/30$) B miševa te u 15% ($n=5/32$) AB miševa. Sveukupno, smanjena je incidencija i razvoj agresivnih tipova tumora u miševa kojima je antibioticima reducirana mikrobiota što sugerira važnu ulogu mikrobiote u razvoju tih tumora. AB i B mjehuri nakon završenog tretmana mogli su se razlikovati se i bez mikroskopa, tj. mjehuri miševa grupe AB su manji, veličinom istovjetni zdravim mjehurima, dok su mjehuri B miševa bili vidljivo veći (Slika 33).



Slika 31. Patohistološke kategorije tkiva nakon dugotrajnog tretmana BBN-om. **A, a.** Uredan preparat netretiranog miša (kontrolni uzorak), **B, b.** Uredan preparat, **C, c.** Reaktivna atipija, **D, d.** Displazija, **E, e** CIS (*carcinoma in situ*), **F, f** Početna invazija tumora, **G, g** Invazivni tumor, **H, h** Invazivni tumor sa sarkomatoidnom diferencijacijom.



Slika 32. Broj miševa AB i B skupine s određenim tumorskim stadijem nakon dugotrajnog tretmana BBN-om.

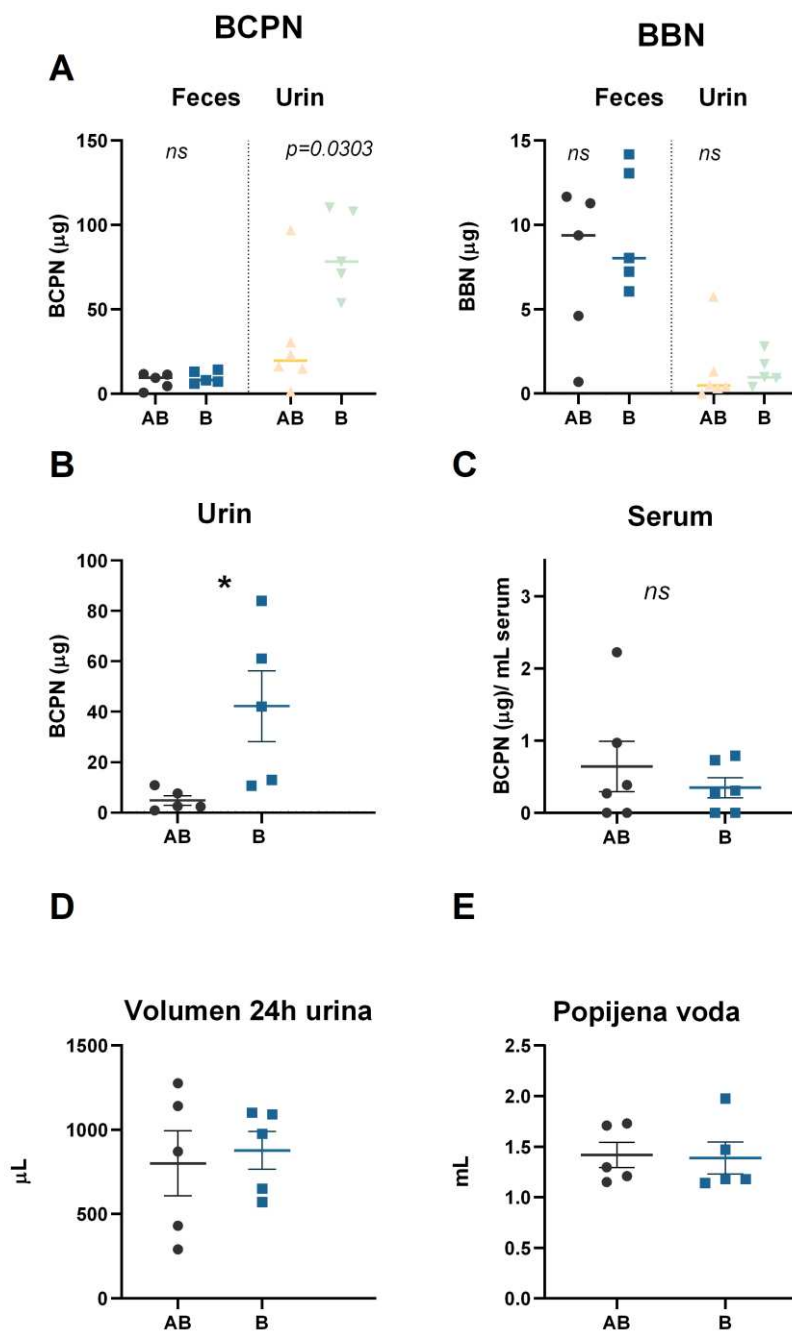


Slika 33. A. Mase mokraćnih mjehura miševa AB i B nakon dugotrajnog tretmana BBN-om. (srednja vrijednost $\pm$ SD) B Fotografije AB i B mjehura nakon dugotrajnog tretmana BBN-om.

4.2.5 Količine prokarcinogena BBN-a i njegovog metabolita BCPN-a u urinu i fecesu miševa

Budući da se BBN u tijelu miša oksidira u karcinogeni BCPN koji se potom izlučuje urinom te uzrokuje tumore u mokraćnom mjehuru, zanimalo nas je utječe li mikrobiota (odnosno redukcija mikrobioma nakon antibiotskog tretmana) na pretvorbu BBN-a u BCPN. Također je istražen put izlučivanja ta dva spoja iz organizma kako bi protumačili primijećenu razliku u karcinogenezi mokraćnog mjehura. U tu je svrhu miševima grupe AB i B analiziran urin i feces izlučene tijekom 24 sata, a nakon 3 tjedna i 6 tjedana BBN tretmana. Miševima je mjeran volumen popijene vode radi izračuna količine unesenog BBN-a. Uz to je jednoj skupini miševa nakon 5 tjedana tretmana analiziran i serum. Količine BBN-a i BCPN-a izmjerene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC).

U urinu je izmjereno znatno više BCPN-a ($54.9 \pm 40.0 \mu\text{g}$) nego BBN-a ($1.9 \pm 1.1 \mu\text{g}$) što potvrđuje da je BCPN glavni urinarni metabolit BBN-a, kao što se navodi u literaturi (108,125). Nadalje, izmjeren je od 3 puta (u 3. tjednu tretmana) do 8 puta (u 6. tjednu tretmana) veća količina BCPN-a u urinu B miševa nego AB miševa (Slika 34A i B). Količina BBN-a u urinu nije se značajno razlikovala među grupama. Volumen popijene vode (u kojoj je bio 0.05% BBN) te volumen izlučenog urina u 24 sata nije se razlikovao među grupama (Slika 34D i E). U fecesu su detektirani BBN i BCPN i to u znatno manjim količinama nego u urinu (BBN = $1.5 \pm 1.7 \mu\text{g}$, a BCPN = $8.6 \pm 4.2 \mu\text{g}$) te se količine BBN-a i BCPN-a u fecesu nisu značajno razlikovale među grupama (Slika 34A). U serumu miševa na 5 tjedana dugom tretmanu detektirane su male količine BCPN-a ($0.50 \pm 0.65 \mu\text{g /mL}$ seruma), a količina BBN-a je bila premala za detekciju (Slika 34C). Nadalje količine BCPN-a u serumu se nisu značajno razlikovale između grupa.

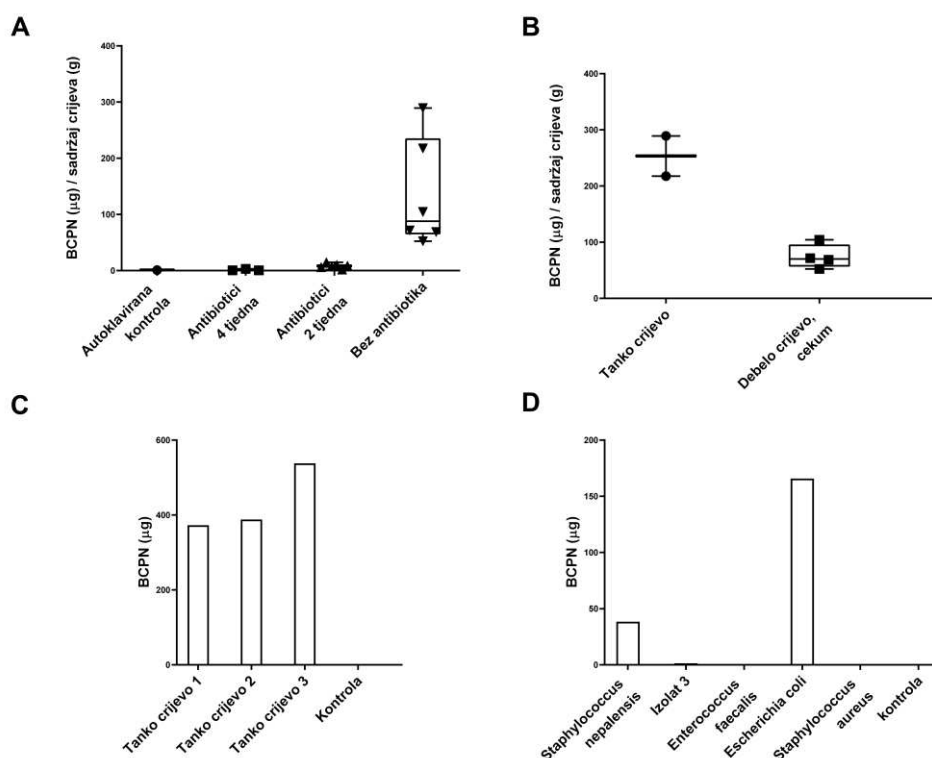


Slika 34. Mjerenje količina BBN-a i BCPN-a u izlučinama i serumu miševa. **A.** Količine BBN-a i BCPN-a u 24-satnom urinu i fecesu miševa nakon tri tjedna tretmana BBN-om **B.** Količine BCPN-a (karcinogenog metabolita BBN-a) u urinu miševa nakon 6 tjedana tretmana BBN-om **C.** Količine BCPN-a izmjerene u serumu miševa nakon 5 tjedana tretmana BBN-om. **D** Volumen urina prikupljenog u 24 sata u metaboličkom kavezu **E** Volumen popijene vode s 0.05% BBN-a tijekom 24-satnog uzorkovanja izlučina u metaboličkom kavezu. Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnom greškom.

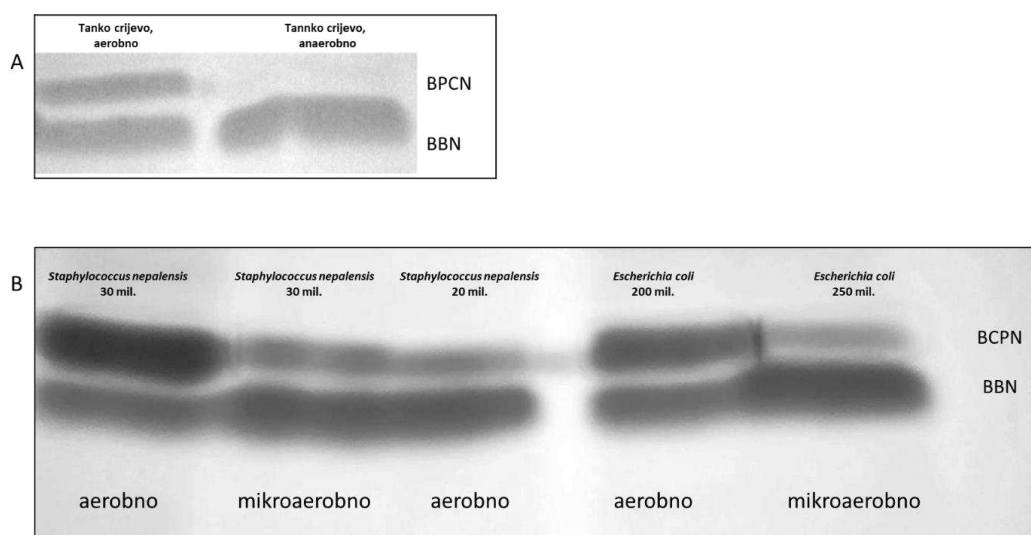
4.2.6 Testiranje sposobnosti mikrobiote za konverziju BBN-a u BCPN

Kako bi se ispitalo može li crijevna mikrobiota sama napraviti konverziju BBN-a u BCPN te doprinosi li ta konverzija većoj količini BCPN-a u izlučevinama B miševa, proveden je *ex vivo* pokus inkubacije BBN-a sa sadržajem crijeva uzetog od antibiotski tretiranih miševa i njihovih kontrola nakon čega je mjereno stvaranje BCPN-a. Pokazano je da sadržaj crijeva izvan tijela može konvertirati BBN u BCPN. Nadalje, sadržaj crijeva miševa tretiranih 2 tjedna i 4 tjedna antibioticima proizvodio je značajno manje BCPN-a od sadržaja crijeva od kontrolnih miševa (bez antibiotskog tretmana), a u uzorcima autoklaviranog (steriliziranog) crijevnog sadržaja inkubiranog s BBN-om, nije detektiran BCPN (Slika 35A). Sadržaj crijeva je podijeljen na sadržaj iz tankog crijeva, cekuma i debelog crijeva te je pronađeno da je najviše BCPN-a stvarao sadržaj tankog crijeva (Slika 35B). Potom je uzet sadržaj iz tri dijela tankog crijeva, koji okvirno odgovaraju duodenumu (1), jejunumu (2) i ileumu (3) te je pronađeno da sva tri uzorka stvaraju slične količine BCPN-a (Slika 35C). Budući da je konverzija bila najjača s crijevnim sadržajem iz tankog crijeva, izolirane su pojedinačne bakterije iz tankog crijeva te testirane na sposobnost konverzije BBN-a u BCPN. Od pet dobivenih bakterijskih izolata iz tankog crijeva, dva su (*Escherichia coli* i *Staphylococcus nepalensis*) vršila pretvorbu BBN-a u BCPN (Slika 35D).

Budući da je konverzija BBN-a u BCPN obuhvaća dvije oksidativne reakcije, pretvorbu iz alkohola u aldehyd, potom pretvorbu aldehyda u karboksilnu kiselinu, proveden je *ex vivo* test inkubacije sadržaja tankog crijeva s BBN-om u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Pokazano je da bakterije konvertiraju BBN u BCPN samo u aerobnim uvjetima, jer je za reakciju konverzije potreban kisik (Slika 36A). Nadalje testirana je ova reakcija i u mikroaerobnim uvjetima, te su inkubirani bakterijski izolati koji su se pokazali sposobnim za konverziju (*E. coli* i *S. nepalensis*) s BBN-om u mikroaerobnim i aerobnim uvjetima. Rezultati testa su pokazali da bakterije u aerobnim uvjetima u većoj mjeri vrše konverziju nego u mikroaerobnim uvjetima, odnosno da je konverzija BBN-a u BCPN ovisna o količini dostupnog kisika (Slika 36B).



Slika 35. Testiranje sposobnosti crijevnog sadržaja na konverziju BBN-a u BCPN prilikom *ex vivo* inkubacije. **A.** Usporedba potencijala stvaranja BCPN-a crijevnim sadržajem miševa tretiranih antibioticima, crijevnim sadržajem miševa bez tretmana antibioticima te kontrolnog sadržaja crijeva steriliziranog autoklaviranjem. **B.** Usporedba potencijala stvaranja BCPN-a crijevnog sadržaja uzetog iz tankog crijeva, te cekuma i debelog crijeva. **C.** Usporedba potencijal konverzije BBN- u BCPN crijevnog sadržaja uzetog iz 3 dijela tankog crijeva (1- duodenum, 2 – jejunum, 3 – ileum) **D.** Potencijal konverzije BBN-a u BCPN bakterijskih izolata iz tankog crijeva.



Slika 36. Identifikacija i semi-kvantifikacija BBN i BCPN tankoslojnom kromatografijom. **A.** Sadržaj tankog crijeva inkubiran s BBN-om u aerobnim i anaerobnim uvjetima **B.** Usporedba *S. nepalensis* i *E. coli* sposobnosti za konverziju BBN-a u BCPN u aerobnim i mikroaerobnim uvjetima

RASPRAVA

Mikrobiota utječe na mnoge procese u organizmu domaćina, primjerice na probavu, rad imunološkog sustava, ponašanje, ali i na pojavu raznih bolesti. Mikrobi direktno utječu na obližnje tkivo, primjerice aktivirajući bakterijske receptore i modulirajući imunološki odgovor. Mogu i indirektno djelovati na udaljene organe, na primjer stvarajući metabolite koji dopijevaju u krv, a iz krvi u razna tkiva, modulirajući koncentracije endogenih molekula (npr. hormona) i ksenobiotika ili pak potičući sistemsku upalu. Napredak metoda sekvenciranja DNA omogućio je mapiranje tisuća bakterija koje žive u ljudskom organizmu, ali za otkrivanje načina na koji mikroorganizmi djeluju na domaćina potrebna su znatno složenija istraživanja i korištenje laboratorijskih životinja. Različite se strategije koriste za otkrivanje interakcija i mehanizama kojima mikrobi utječu na domaćina. Tako možemo vidjeti kako uklanjanje mikrobiote utječe na promatrani proces u organizmu usporedbom životinja naseljenih mikrobima sa sterilnim (akseničnim) životinja ili sa životinja kojima je antibioticima reducirana mikrobiota. U ovoj disertaciji su disertaciji korištene takve strategije da istražimo utjecaj mikrobiote na mokraćni mjehur te na razvoj tumora mokraćnog mjehura. Metodom RNA sekvenciranja uspoređen je ukupni transkriptom mokraćnog mjehura miševa bez mikrobioma (akseničnih) i onih sa standardnim, "normalnim", mikrobiomom (SPF - mikrobiom bez patogeneza). Nadalje, kako bi se istražio utjecaj mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura, korišten je BBN model za induciranje karcinogeneze u mokraćnom mjehuru miševa sa standardnom mikrobiotom i onih kojima je reducirana mikrobiota antibioticima. BBN je najčešće korišten model za induciranje tumora mokraćnog mjehura u laboratorijskim životinjama, a tumori koje izaziva su po histoloških i mutacijskim osobinama nalik na invazivne tumore mokraćnog mjehura čovjeka.

5.1. Utjecaj mikrobiote na mokraćni mjehur

Rezultati istraživanja na akseničnim (GF) i SPF životinjama pokazuju da mikrobiota utječe na izražaj gena u mokraćnom mjehuru kao i na masu te veličinu mokraćnog mjehura. Mokraćni mjehur akseničnih miševa u prosjeku je 25% lakši od mokraćnog mjehura životinja uzgajanih u standardnim, SPF, uvjetima. Rezultat je dobiven proučavanjem GF i SPF miševa iz dvije različite životinjske nastambe i dva različita podsoja (B6N i B6J) laboratorijskih miševa soja C57BL/6. Iako su poznate neke razlike između akseničnih i konvencionalnih životinja poput toga da aksenične životinje imaju manje masnog tkiva ili pak uvećan cekum, ovo je prvo izvješće o smanjenoj masi i veličini mokraćnog mjehura u GF miševa. Ipak, patohistološka analiza uzoraka tkiva nije otkrila nikakve strukturne razlike u tkivu mokraćnog mjehura između mjehura GF i SPF miševa.

Da bi otkrili moguće razloge smanjene mase i veličine mokraćnog mjehura kod GF miševa, analizirana je ekspresija gena za koje je poznato su važni u razvoju mokraćnog

mjihura. Pretpostavljeno je da izostanak mikrobiote tijekom embrionalnog rasta može rezultirati smanjenom masom i veličinom mokraćnog mjehura. Među svim genima koji su uključeni u embrionalni razvoj mokraćnog mjehura samo je gen koji kodira Versican, proteoglikan u izvanstaničnom matriksu, značajno smanjen. Budući da je Versican povezan samo s određenim poremećajem oka, vitroretinopatijom, koja nije prisutna u GF miševa, najvjerojatnije nije odgovoran za uočeno smanjenje mase i veličine mokraćnog mjehura. Da bi se potvrdilo da smanjena masa mokraćnog mjehura nije razvojna anomalija uvjetovana mikrobiotom, provjereno je je li moguće inducirati takvu promjenu u miševa izloženih standardnoj mikrobioti. U tom cilju je reducirana je mikrobiota miševima uzgajanih u SPF uvjetima primjenom pet antibiotika širokog spektra. Nakon redukcije mikrobiote antibioticima ponovno je uočeno smanjenje mase mokraćnog mjehura. To pokazuje da smanjenje mase mokraćnog mjehura nije razvojno određeno, već prilagodljiva promjena mjehura kao odgovor na odsutnost mikrobiote ili njezinih proizvoda. Da bi se uočile razlike u sastavu stanica koje čine tkivo mokraćnog mjehura, uspoređivana je ekspresija genskih markera za sve tipove stanica mokraćnog mjehura, ali nisu pronađene značajne promjene. Poznato je da mikrobiota kontrolira veličinu mišića te da aksenični miševi imaju manju mišićnu masu (126). Budući da mišić čini znatan dio mase mokraćnog mjehura, provjerena je ekspresija gena koji kontroliraju veličinu mišića kako bi se vidjelo postoji li smanjenje njegove ekspresije koje bi moglo biti povezano s redukcijom mase mjehura. Međutim, nisu pronađeni različito izraženi geni koji bi objasnili uočene razlike. Drugo objašnjenje razlike u masi može biti razlika u sastavu izvanstaničnog matriksa (VSM), još jedne komponente tkiva koja čini značajan dio mase mjehura. Kumulativna ekspresija grupe gena uključenih u VSM poput gena za kolagene, tenascine i laminine bila je smanjena u GF miševima, a enzim koji razgrađuje izvanstanični matriks Mmp12 je imao veći genski izražaj. Možda promjene u sastavu i količini navedenih proteina izvanstanične tvari dovode do poremećaja u građi mjehura koji utječu na ukupnu masu tkiva. Konačno, moguće je da bi razlika u masi mogla biti i zbog promjena na posttranskripcijskoj razini, koje ne možemo objasniti samo proučavajući transkriptom (127). Imajući u vidu da cjelokupna histologija mokraćnog mjehura nije promijenjena kod GF miševa, razumno je pretpostaviti da su različite komponente mokraćnog mjehura proporcionalno smanjene učinkom složene regulatorne mreže, kontrolirane mikrobiotom, u čemu bi geni izvanstaničnog matriksa mogli imati vodeću ulogu. Opisan vrlo zanimljiv fenotip, no razlog njegovog nastanka pravi uzrok smanjenja mase mokraćnog mjehura zbog promjene mikrobiote treba rasvijetliti dodatnim pokusima.

Izražaj gena cirkadijanog ritma promijenjen je u mjehurima GF miševa što je u skladu s nekoliko istraživanja koja pokazuju da crijevna mikrobiota regulira cirkadijani ritam domaćina (128). Cirkadijane oscilacije su promijenjene u akseničnih miševa i u miševa s antibiotski reduciranim mikrobiomom. Ova istraživanja su pokazala da su geni cirkadijanog ritma značajno sniženi u mjehurima akseničnih miševa, dok je Nfil3, negativni regulator transkripcije tih gena, imao pojačan izražaj. Miševi bez gena za Per1 i Per2 (takozvani *knock-*

out miševi) imaju aritmički raspored mokrenja što pokazuje da ti geni kontroliraju obrazac mokrenja (129). Ovi rezultati pokazuju da mikrobiota utječe na cirkadijani izražaj gena u mokraćnom mjehuru što sugerira da mikrobiota utječe i na dnevno-noćni ritam pražnjenja mokraćnog mjehura. Nekoliko gena koji su uključeni u rad neurona imalo je povećanu ekspresiju u mokraćnom mjehuru GF miševa. Poznato je da mikrobiota crijeva može utjecati na razvoj i funkciju živčanog sustava oslobađanjem različitih metabolita i modulacijom imunoloških stanica (130). Simpatički i parasimpatički živci koji kontroliraju mišiće mokraćnog mjehura prilikom nakupljanja i eliminacije urina kontrolirani su kolinergičkim nikotinskim receptorima (49). Geni koji kodiraju podjedinice tih receptora, kao i za enzime koji sudjeluju u sintezi i izlučivanju acetilkolina, imaju povećanu ekspresiju u GF mjehurima. Ove promjene, zajedno s primijećenim promjenama gena cirkadijanog ritma, mogu objasniti cirkadijani obrazac mokrenja.

Proučavanje izražaja gena otkrila je još neke zanimljive činjenice. Veza između mikrobiote i izražaja MUP (od engl. *major urinary proteins*) proteina (koji ne postoje u čovjeka, dok su u miša dominantni proteini u urinu), prethodno je opisana (131). MUP proteini djeluju kao prijenosnici feromona koji su odgovorni za urinarni miris. Proizvode se uglavnom u jetri, a njihova proizvodnja je smanjena u miševima bez mikrobiote (132). U ovom istraživanju otkriveno je da su geni Mup7 i Mup22 (predviđeni gen Gm21320) bili prekomjerno izraženi u mjehurima akseničnih miševa što bi mogao biti mehanizam kompenzacije za njihovu smanjenu ekspresiju u jetri. Drugi zanimljiv nalaz bila je aktivacija ekspresije šest gena imunoglobulinskih lanaca u mjehurima akseničnih miševa. To bi moglo biti posljedica činjenice da su ovi miševi imaju povećanu koštanu masu i koštanu srž, tj. povećan rezervoar plazma stanice koje stvaraju imunoglobuline (133). Nekoliko genskih biljega za B stanice ima povećanu ekspresiju u akseničnim mjehurima, ali ne značajno. Pored plazma stanica koštane srži, neke epitelne stanice i stanice tumora također mogu proizvoditi gene imunoglobulinskih lanaca (134). Nije poznato mogu li zdrave urotelne stanice stvarati imunoglobulinske lance i kakva bi bila njihova funkcija u mjehuru.

Rezultati ovog istraživanja dodatno naglašavaju važan učinak mikrobiote na organizam domaćina. Budući da su aksenični miševi lišeni mikrobiote crijeva i mjehura, u ovim je rezultatima nemoguće razlikovati učinak mikrobiote mokraćnog mjehura od mikrobiote crijeva. Međutim, pokazano je da uklanjanje svih mikrobiota iz tijela mijenja izražaj gena u mokraćnom mjehuru i, začudo, utječe na masu i veličinu mokraćnog mjehura. Kako bi se razjasnili mehanizmi i fiziološka važnost uočenih transkripcijskih promjena i promjena u veličini organa, potrebna su dodatna istraživanja usmjerena na mehanizme navedenih procesa.

5.2. Utjecaj mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura

Utjecaj mikrobiote na razvoj tumora mokraćnog mjehura istražili smo pomoću BBN modela za induciranje karcinogeneze u mokraćnom mjehuru te uklanjanjem mikrobiote antibioticima. Kako bi se promjerila ž uspješnost korištenja antibiotika u uklanjanju mikrobiote napravljena je kvantitativna analiza bakterijskom kulturom (urinokulturom) te analiza sastava mikrobioma 16S sekvenciranjem. Analizom rezultata 16S sekvenciranja potvrđeno je smanjenje bogatstva bakterijskih vrsta u fecesu miševa tretiranim antibioticima. Pronađeno je manje OTU-eva te smanjen Shannon index alfa raznolikosti. U fecesu AB miševa dominira koljeno *Proteobacteria*, dok je kod B miševa najzastupljenije koljeno *Bacteroidetes*. Iako je koljeno *Proteobacteria* bilo dominantno, ovi rezultati ne govore o ukupnom broju tih bakterija u crijevima AB miševa, već da antibiotskim tretmanom uspješnije uklanjamo bakterije iz drugih koljena, čime dolazi do dominacije bakterija ovog koljena. Da je ukupan broj bakterija smanjen potvrđeno je nasadivanjem uzoraka urina i fecesa na krvni agar te mjerenjem poraslih bakterijskih kolonija u anaerobnim i aerobnim uvjetima. Utvrđeno je milijun puta manje aerobnih te milijardu puta manje anaerobnih bakterija u fecesu miševa nakon antibiotskog tretmana. Nadalje, pokazano je da se mikrobiom crijeva mijenja tijekom tretmana BBN-om, odnosno da BBN utječe na sastav mikrobiote u crijevima. Pronađen je veći broj OTU-eva te veći Shannon indeks nakon tretmana BBN-om i to u obje skupine miševa (sa i bez antibiotika). Iz rezultata ove studije vidljivo je da BBN dovodi do obogaćenja određenih vrsta - članovi roda *Bacillus* bili su obogaćeni u crijevnom mikrobiomu antibiotski tretiranih i netretiranih miševa nakon tretmana BBN-om, a poznato je da imaju velik metabolički potencijal za transformiranje raznih toksičnih supstanci (135). Do sada nije ispitan utjecaj BBN-a na crijevu mikrobiotu, a u radu C. Forster i suradnika pokazano je da dugotrajni tretman BBN-om dovodi do promjene urinarne mikrobiote: miševi na BBN tretmanu imali su više rodova *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Bifidobacterium* i *Ureaplasma Actinobaculum* te manje *Actinomyces* u urinarnom mikrobiomu nakon tretmana BBN-om (113). Ovi rezultati upućuju na to da tretman BBN-om dovodi do obogaćenja bakterijskih vrsta u stolici koje možda imaju sposobnost njegove detoksikacije. Rezultati analize 16S sekvenciranja za uzorke urina pokazali su sličan sastav mikrobiote u miševa s i bez antibiotske redukcije iako su korišteni su antibiotici koji djeluju i na mikrofloru u mokraćnom mjehuru. U AB i B urinu dominiraju bakterije koljena *Proteobacteria* s gotovo 50% zastupljenosti, druge zastupljenije skupine bile su *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*. Zaključno, antibiotski tretman smanjuje ukupan broj te raznolikost prisutnih bakterijskih vrsta u fecesu. Ipak, određen broj bakterija ostane i nakon tretmana antibioticima i to dominantno bakterije iz skupine *Proteobacteria*, kako je zabilježeno i u drugim studijama (136). S druge strane, u urinu nije detektirana razlika u bakterijskom sastavu, iako je smanjen ukupan broj bakterija.

Patohistološkom analizom mokraćnog mjehura miševa na kratkotrajnom i dugotrajnom tretmanu BBN-om s ili bez tretmana antibioticima dobivena su dva važna nalaza o utjecaju

antibiotske redukcije mikrobioma na tumore mokraćnog mjehura: (1) pojačan je upalni odgovor na degenerativne promjene u urotelu uzrokovane BBN-om nakon dvotjednog tretmana, i (2) smanjena je ukupna incidencija tumora te je prisutno manje tumora invazivnih stadija nakon kroničnog, petomjesečnog, tretmana. Većina AB miševa (tretirani BBN-om i antibioticima) bila je bez tumorske bolesti, dok je velika većina miševa iz grupe B (tretirani samo BBN-om) razvila neoplastične promijene u tkivu mjehura. Više je studija pokazalo da aksenični i antibiotski tretirani miševi razvijaju manje tumora od konvencionalno uzgajanih miševa (14). Do sada se je taj učinak najviše povezivao sa štetom koje bakterije i imunološke stanice uzrokuju lokalnim djelovanjem u tkivu. Primjerice bakterije svojim proupalnim molekulama (MAMP-ovi) dovode do kronične upale, oštećuju tkivo i potiču mutacije, a posljedično se u tkivu aktivira proliferacija radi obnove. Sinergijom tih događaja inicira se tumor te se stvori povoljno okruženje za njegov daljnji razvoj (23). Budući da smo uočili promjene u ranom upalnom odgovoru i oštećenju tkiva nakon dvotjednog tretmana BBN-om, postoji mogućnost da te promjene dovode do kasnijih razlika u razvoja tumora. Uklanjanjem bakterija iz tijela miša antibiotskim tretmanom, dolazi do pojačanog nakupljanja granulocita i razvoja apscesa u lamini propriji te oštećenja urotela i nastanka ulkusa. Uništenje epitelne barijere jedan je od mehanizama bakterijski potaknute karcinogeneze, primjer je ulcerativni kolitis. Do sada nije opisano da stvaranje ulkusa i apscesa može spriječiti karcinogenezu. Jedan od mogućih mehanizama kojim bi se to moglo dogoditi jest da ulkusi dovode do pojačanog uništavanja urotela na mjestima na kojima se pojavljuju tumor-prekursorske stanice. Analizom transkriptoma AB i B miševa nakon akutnog izlaganja kancerogenima nije pronađena naznaka mehanizma koji pokreće ovakav promijenjen imunološki odgovor. S druge strane, vidljiva je pojačana ekspresija gena za kolagene te strukture izvanstaničnog matriksa u AB miševa. Najvjerojatnije su ti procesi aktivirani radi obnove tkiva nakon razvoja ulkusa, odnosno vidljiva je posljedica, ali ne i uzrok za ovakav odgovor tkiva. Proučavanjem ukupnog transkriptoma tkiva često ne možemo vidjeti promjene koje se zbivaju u manjem dijelu tkiva, primjerice u urotelu jer bude "maskiran" događajima u ostatku tkiva (kojeg je puno više). Također na razini transkriptoma se ne vide promjene na posttranskripcijskom nivou ili pak na proteinskom nivou. To su mogući razlozi zašto analizom transkriptoma nije pronađeno ništa što bi mogli povezati s pojavom ulkusa. Budući da su ulkusi puni staničnog detritusa koji onemogućuje nespecifično imunohistokemijsko bojanje, bilo je teškom tim pristupom okarakterizirati stanice koje se nalaze unutar njega iako je standardna patološka analiza ukazivala na nakupljanje granulocita. Da bi se testirala uloga neutrofila, najvjerojatnijih "krivaca" za razvoj ulkusa, napravljena je njihova deplecija u miševima. Rezultati su pokazali da sistemsko uklanjanje neutrofila ne utječe na pojavu ulkusa u mjehuru iz čega se može zaključiti da neutrofili nisu odgovorni za nastanak istih. Nadalje, analizom imunoloških stanica širokim panelom imunoloških markera metodom masene citometrije pokazano je da su u mjehuru AB miševa zastupljenije SiglecF pozitivne stanice nego u B miševa. Ovi nalazi zahtijevaju dalje istraživanje, kako stanica koje se nalaze unutar ulkusa te mehanizma koji dovode do njih, tako i utjecaja ulkusa na tumorsku

patologiju. Osim razlike u sastavu imunoloških stanica, moguće je da za nastanak ulkusa bio zaslužan ograničen prolazak neutrofila kroz urotel zbog čega su nastajali prvo mikroapscesi pa zatim i ulkusi. Migracija granulocita (neutrofila) ovisi o njihovoj kemotaksiji prema Cxc kemokinima koje produciraju epitelne stanice. Interleukin 8 u ljudi (u miša su to najvjerojatnije njegovi homolozi Kc, Mip-2i Lix) dovodi do njihovog influksa u laminu propriju, no nije dovoljan za prolazak kroz epitel (137). Migracija preko inficiranih mukoznih površina ovisi o kemokinskim receptorima koje izražavaju urotelne stanice, Cxcr1 i Cxcr2. Kao posljedica povećanja ekspresije tih kemokina, koja se događa prilikom infekcije urotela, stanice vežu veće količine IL-8 te dolazi do brzog prelaska stanica u lumen. Bez IL-8 receptora, ove stanice se nakupljaju u tkivima (138). Moguće je da u antibiotski tretiranih miševa zbog smanjene prisutnosti baterija u urinu, smanjena ekspresija Cxcr1 i Cxcr2 u urotelu te da to sprječava prolazak granulocita kroz urotel te dolazi do subepitelnih apscesa. Iako ovo nismo pronašli analizom transkriptomskih podataka, no moguće je da za detekciju ovakve promjene trebalo proučavaj izražaj u samom urotelu, ne u ukupnom mokraćnom mjehuru.

Najzanimljiviji nalaza patohistološke analize mjehura miševa na dugotrajnom tretmanu BBN-om i antibioticima bio je nalaz mjehura koji su bili potpuno zdravi s malo upalnih stanica. Ovakvi rezultati sugerirali su da smanjen udio tumora kod ovih životinja nije rezultat promijenjenog imunološkog odgovora na tumor, već da su ti mokraćni mjehuri bili manje izloženi djelovanju karcinogena.

5.3. Mikrobiota crijeva vrši pretvorbu BBN-a oksidacijom u kancerogeni BCPN

N-butyl-N-(4-hidriksibutil)nitrozamin (BBN) se u tijelu miša metabolizira u aktivni kancerogeni spoj BCPN. BCPN se izlučuje urinom, pa je postojala mogućnost da je metabolizam ovog spoja ili njegovo izlučivanje urinom promijenjeno. Već su bile opisane razlike u podložnosti raku između sojeva štakora koji su se razlikovali po metabolizmu ovog spoja odnosno po količini izlučenog karcinogena (139). Kvantificiranjem BCPN-a u urinu miša pronađeno je da su količine BCPN-a u urinu miševa s mikrobiotom bile nekoliko puta više u odnosu na miševe s antibiotski reduciranom mikrobiotom. Također je kvantificiran BCPN u mišjem fecesu te je pronađeno da obje grupe miševa izlučuju slične količine BCPN-a u fecesu te da su te količine znatno manje od onih u urinu. Ukupno je u izlučinama miševa s mikrobiotom bilo više BCPN-a u usporedbi s onima u kojih je mikrobiota bila reducirana, na temelju čega je bilo jasno da je postojanje crijevne mikrobiote povezano sa stvaranjem veće količine BCPN-a u tijelu miša. Napravljena je pretpostavka da crijevna mikrobiota može metabolizirati BBN u BCPN suprotno uvriježenom vjerovanju da se ta reakcija oksidacije odvija isključivo u jetri miševa. Nakon toga je ispitana sposobnost crijevne mikrobiote na reakciju konverzije BBN-a u BCPN inkubacijom BBN i mikrobiote tj. sadržaja crijeva izvan

tijela (*in vitro*) miša te je otkriveno da crijevna mikrobiota metabolizira BBN u BCPN(!). Zatim je uspoređena antibiotski reducirana crijevna mikrobiota i standardna (SPF) mikrobiota na sposobnost konverzije te je pronađeno da antibiotski reducirana crijevna mikrobiota stvara puno manje količine BCPN-a, a što je u skladu sa smanjenom količinom izlučenog BCPN-a u životinja na antibiotskom tretmanu (AB miševi). Uspoređeni su i različiti dijelovi crijeva (tanko crijevo, cekum i debelo crijevo) te je pronađeno da mikrobiota tankog crijeva stvara najveće količine BCPN-a. Potom su bakterijski izolati iz tankog crijeva podvrgnuti testu konverzije, a od 5 ispitanih izolata pronađena su dva koja imaju sposobnost za BBN u BCPN konverziju, *Escherichia coli* i *Staphylococcus nepalensis*.

Iako se za lumen crijeva pretpostavlja da je anaeroban, točnije je da u donjim dijelovima crijeva postoje postoji gradijent koncentracije kisika koji opada kako se odmičemo od epitela crijeva, odnosno uz epitel vladaju mikroaerobni uvjeti, dok u sredini lumena vladaju anaerobni uvjeti (140). Budući da je aktivacija BBN-a u BCPN oksidativna reakcija, tj. za nju je potreban kisik, testirana je sposobnost bakterija da izvode konverziju u anaerobnim, aerobnim i mikroaerobnim uvjetima, tako simulirajući koncentraciju kisika u crijevima. U anaerobnim uvjetima, očekivano, nije bilo stvaranja BCPN-a. S druge strane u aerobnim i u mikroaerobnim uvjetima bakterije su stvarale BCPN. Ovaj rezultat ukazuje na to da su crijevni mikrobi sposobni za oksidacijsku reakciju u mikroaerobnim uvjetima koji vladaju u crijevima. Ova opažanja zajedno s opažanjem da miševi s reduciranom mikrobiotom imaju manje količine BCPN-a u izlučinama, upućuju na to da crijevni mikrobi generiraju dodatni BCPN iz BBN-a te tako doprinose ukupnoj količini BCPN-u u tijelu miša. Razmatrajući zajedno rezultate o bakterijskoj konverziji BBN-a u BCPN s rezultatima patohistološke analize koji pokazuju manje tumora u životinja s reduciranom mikrobiotom, postalo je jasno da mikrobiota stvara dodatne količine kancerogenog BCPN-a koji završava u urinu što dovodi do znatnijeg razvoja zloćudnih tumora u mjehuru miševa (koji nisu primali antibiotike, grupa B). Poznato je da se konverzija BBN-a u BPCN odvija u jetri, a ovim je istraživanjima pokazano da crijevna mikrobiota također može pretvoriti BBN u BCPN i uzrokovati njegovo nakupljanje u urinu.

Velik udio karcinoma pripisuje se izloženosti okolišnim karcinogenima, od kojih mnogi uzrokuju zloćudnu preobrazbu stanica nakon metaboličke aktivacije. Uloga crijevne mikrobiote, koja kodira stotinjak puta više gena od ljudskog genoma, u karcinogenezi izazvanoj ksenobioticima tek se počinje istraživati. Ovo je prvi dokaz o proizvodnji karcinogena od strane crijevnih bakterija te o uzročnoj povezanosti crijevne mikrobiote i nastanka raka mokraćnog mjehura. Osim crijevne mikrobiote, moguće je da i mikrobiota u mokraćnom mjehuru doprinosi stvaranju karcinogenog BCPN-a. Iz prethodnih studija znamo da su *Proteobacteria* predominantno bakterijsko koljeno u zdravom i tumorskom tkivu mokraćnog mjehura. *Cupriavidus spp.*, *Brucellaceae*, *Acinetobacter*, *Anoxybacillus*, *Escherichia*, *Shigella*, *Geobacillus*, *Pelomonas*, *Ralstonia*, i *Sphingomonas* bili obogaćeni u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura (103). Za *E. coli* u ovom istraživanju je pokazano da vrši

BBN-BCPN konverziju, a ostaje istražiti jesu li bakterije za koje je pokazano da su zastupljene u tumorskom tkivu sposobne raditi opisanu konverziju te potiču li tumorigenezu stvaranjem karcinogena BCPN. Nadalje, ostaje da se testira mogućnost konverzije drugih prokarcinogenih kemikalija od strane mikrobiote te doprinos tih procesa nastanku različitih tumora. Jednako tako, treba identificirati gen(e) koji vrše konverziju BBN u BCPN. Razumijevanje čimbenika koji utječu na doprinos mikrobioma metabolizmu karcinogena mogle bi se objasniti interpersonalne razlike u podložnosti za razvoj raka te pružiti mogućnosti za razvitak personaliziranih intervencija temeljenih na mikrobiomu, u čemu bi identifikacija pojedinih bakterijskih sojeva koji imaju sposobnost metaboličke pretvorbe BBN-a moglo bi poslužiti kao polazna točka.

ZAKLJUČCI

1. Mikrobiota utječe na masu mokraćnog mjehura. Mokraćni mjehuri akseničnih miševa i miševa tretiranih antibioticima u prosjeku su 25% lakši od mokraćnih mjehura miševa sa standardnom mikrobiotom.
1. U odsustvu mikrobiote poremeti se izražaj gena cirkadijanog ritma u mokraćnom mjehuru, kao i izražaj gena za molekule izvanstanične tvari.
2. Miševi tretirani antibioticima i N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozaminom (BBN) razvijaju intenzivniji imunološki odgovor u urotelu nego miševi tretirani samo BBN-om). Dvije trećine miševa tretiranih antibioticima i BBN-om razvije subepitelne apscese, neovisno o neutrofilima.
3. Miševi tretirani antibioticima i BBN-om razvijaju znatno manje invazivnih tumora nego miševi tretirani samo BBN-om (p -vrijednost= $1.6 \cdot 10^{-5}$, $n=62$).
4. Sprječavanje nastanka tumora povezano je sa smanjenom količinom karcinogenog BBN-ovog metabolita - BCPN u urinu.
5. Crijevna mikrobiota ima sposobnost stvaranja karcinogenog BCPN-a iz BBN-a čime doprinosi ukupnoj količini BCPN-a u urinu i razvoju tumora. Ovo je prvi dokaz da crijevna mikrobiota metaboliziranjem neke kemikalije omogućuje razvoj zloćudnih tumora.

KRATKI SAŽETAK

Provedena istraživanja pokazala su da mikrobiota utječe na mokraćni mjehur kao i na razvoj tumora mokraćnog mjehura. Uzgoj miševa u sterilnim (akseničnim) uvjetima kao i redukcija mikrobiote antibioticima dovodi do smanjenja mase mokraćnog mjehura te do promjene izražaja gena koji kodiraju proteine izvanstanične tvari i gena koji kontroliraju cirkadijani ritam. Poveznica mikrobiote i cirkadijanog ritma opisana je za druga tkiva, a ovo je prvi opis slične povezanosti u mokraćnom mjehuru kao i utjecaja mikrobiote na masu mjehura.

Nadalje, mikrobiota utječe na razvoj tumora mokraćnog mjehura te je pokazano da redukcija mikrobiote antibioticima sprječava razvoj tumora karcinogenom BBN-om. Najvjerojatniji razlog za to je smanjeno stvaranje aktivnog karcinogenog spoja BCPN iz BBN-a te smanjeno nakupljanje tog spoja u urinu i vjerojatno u tkivu mokraćnog mjehura. Poznato je da se konverzija BBN-a u BCPN odvija u jetri, a ovim je istraživanjima pokazano da crijevna mikrobiota također može pretvoriti BBN u BCPN i uzrokovati njegovo nakupljanje. Ovo je prvi dokaz o uzročnoj povezanosti crijeвне mikrobiote i nastanka raka mokraćnog mjehura, kao i o proizvodnji karcinogena u crijevnim bakterijama. Provedena istraživanja rezultirala su temeljnim biološkim otkrićima koja mogu biti od kliničkog značaja.

KRATKI SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY)

This study showed that the microbiota affects the healthy urinary bladder as well as the dynamics of the development of urinary bladder tumors. Axenic mice and those with antibiotic reduction of microbiota had decreased urinary bladder mass as well as changes in the expression of genes encoding extracellular matrix proteins and genes that control the circadian rhythm. The link between microbiota and the circadian rhythm has been described for other tissues, but this is the first evidence that it also exists in bladder tissue.

Furthermore, the development of urinary bladder tumors is affected by the microbiota - antibiotic reduction of the microbiota greatly slows down the dynamics of tumor development caused by carcinogenic BBN. The most likely reason for the decrease in tumor dynamics is the reduced amount of the active carcinogen BCPN in the urine that was found in the BBN and antibiotics treated mice. It was shown *ex vivo* that the gut microbiota is capable of the production of the carcinogenic BCPN from BBN. Until now, it was known that the conversion of BBN to BPCN takes place in the liver, but this study showed that the intestinal microbiota also can perform this conversion and contribute to the total amount of this carcinogen. This is the first evidence of a causal relationship between intestinal microbiota and the development of bladder cancer, as well as the production of carcinogens in intestinal bacteria. The conducted research has resulted in fundamental biological discoveries that may be of clinical significance.

LITERATURA

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):1–14.
2. McFall-NoAi MJ. The development of cooperative associations between animals and bacteria: Establishing détente among domains. *Am Zool.* 1998;38(4):593–608.
3. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260–70.
4. Goryacheva II, Andrianov B V. Biological effects of the symbiosis between insects and intracellular bacteria *Wolbachia pipientis*. *Biol Bull Rev.* 2016;6(6):530–44.
5. Thomas-White K, Brady M, Wolfe AJ, Mueller ER. The Bladder Is Not Sterile: History and Current Discoveries on the Urinary Microbiome. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 2016;11(1):18–24.
6. Kumar M, Ji B, Zengler K, Nielsen J. Modelling approaches for studying the microbiome. *Nat Microbiol.* 2019;4(8):1253–67.
7. Ehrlich SD. MetaHIT: The European Union Project on Metagenomics of the Human Intestinal Tract. In: Nelson KE, editor. *Metagenomics of the Human Body*. New York, NY: Springer Science+Business Media; 2011. 307–16.
8. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature.* 2007;449(7164):804–10.
9. Li J, Wang J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):834–41.
10. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Division on Earth and Life Studies; Institute for Laboratory Animal Research; Roundtable on Science and Welfare in Laboratory Animal Use. *Animal Models for Microbiome Research: Advancing Basic and Translational Science: Proceedings of a Workshop*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2018.
11. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol.* 2007;19(2):59–69.
12. Al-Asmakh M, Zadjali F. Use of germ-free animal models in microbiota-related research. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(10):1583–8.
13. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3698–703.
14. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(11):800–12.
15. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 2013;499(7456):97–101.
16. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med.* 1910;3(Surg Sect.):1–48.
17. Kresowik TP, Griffith TS. *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 2009;1(2):281–8.
18. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.*

- 2010;140(6):883–99.
19. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254–8.
20. Marongiu L, Gornati L, Artuso I, Zanoni I, Granucci F. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *J Leukoc Biol*. 2019;106(1):147–60.
21. LaRue H, Ayari C, Bergeron A, Fradet Y. Toll-like receptors in urothelial cells—targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*. 2013;10(9):537–45.
22. Fischer H, Yamamoto M, Akira S, Beutler B, Svanborg C. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur J Immunol*. 2006;36(2):267–77.
23. Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J Pathol*. 2018;244(5):667–76.
24. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348(6230):80–6.
25. Garrett WS. The gut microbiota and colon cancer. *Science*. 2019;364(6446):1133–5.
26. Atrian S, Heitman J, Thiele DJ. *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis Supplemental Information. *Cell host microbe*. 2012;13:1–16.
27. Alfano M, Canducci F, Nebuloni M, Clementi M, Montorsi F, Salonia A. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2016;13(2):77–90.
28. Dewar M, Izawa J, Li F, Chanyi RM, Reid G, Burton JP. Microbiome. In: Ku JH, editor. *Bladder Cancer*. Elsevier Inc.; 2018. 615–28.
29. Mager LF, Burkhard R, Pett N, Cooke NCA, Brown K, Ramay H, et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science*. 2020;369(6509):1481–9.
30. Kogan MI, Naboka YL, Ibishev KS, Gudima IA, Naber KG. Human urine is not sterile - Shift of paradigm. *Urol Int*. 2015;94(4):445–52.
31. Wolfe AJ, Brubaker L. Urobiome updates: advances in urinary microbiome research. *Nat Rev Urol*. 2018;1.
32. Wojciuk B, Salabura A, Grygorcewicz B, Kędzierska K, Ciechanowski K, Dołęgowska B. Urobiome: In Sickness and in Health. *Microorganisms*. 2019;7(548).
33. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3(41).
34. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, Castillo E, Del Moral JS-G, Gómez-Millán J, et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *Eur Urol Focus*. 2016;4(1):128–38.
35. Gottschick C, Deng ZL, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017;5(1):99.
36. Thomas-White K, Forster SC, Kumar N, Van Kuiken M, Putonti C, Stares MD, et al. Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nat Commun*. 2018;9(1):1557.
37. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Jeremy P. The microbiome of the urinary tract — a role beyond infection. *Nat Publ Gr*. 2015;12(2):81–90.
38. Wein AJ. Re: The microbiome of the urinary tract - A role beyond infection. *J Urol*.

- 2015;194(6):1643–5.
39. Bajic P, Wolfe AJ, Gupta GN. The Urinary Microbiome: Implications in Bladder Cancer Pathogenesis and Therapeutics. *Urology*. 2019;126:10–5.
40. Hourigan SK, Zhu W, Wong SWW, Clemency NC, Provenzano M, Vilboux T, et al. Studying the urine microbiome in superficial bladder cancer: Samples obtained by midstream voiding versus cystoscopy. *BMC Urol*. 2020;20(1):1–8.
41. Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Jeansson SL, Jakobsen KS. Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis. *BMC Microbiol*. 2012;12(205).
42. Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Eri LM, Jeansson SL, Jakobsen KS. Pathogens in Urine from a Female Patient with Overactive Bladder Syndrome Detected by Culture-independent High Throughput Sequencing: A Case Report. *Open Microbiol J*. 2015;8(1):148–53.
43. Bučević Popović V, Šitum M, Chow CET, Chan LS, Roje B, Terzić J. The urinary microbiome associated with bladder cancer. *Sci Rep*. 2018;8(1).
44. Groah SL, Pérez-Losada M, Caldovic L, Ljungberg IH, Sprague BM, Castro-Nallar E, et al. Redefining Healthy Urine: A Cross-Sectional Exploratory Metagenomic Study of People With and Without Bladder Dysfunction. *J Urol*. 2016;196(2):579–87.
45. Reid G, Burton JP. Urinary incontinence: Making sense of the urinary microbiota in clinical urology. *Nat Rev Urol*. 2016;13(10):567–8.
46. Nienhouse V, Gao X, Dong Q, Nelson DE, Toh E, McKinley K, et al. Interplay between bladder microbiota and urinary antimicrobial peptides: Mechanisms for human urinary tract infection risk and symptom severity. *PLoS One*. 2014;9(12):1–26.
47. Lewis AL, Kline KA. Gram-positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2):1–54.
48. Stemler KM, Mysorekar IU. Infectious Diseases: Urinary Tract Infections (Bacterial). In: McManus L, Mitchell R, editors. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. Elsevier Inc.; 2014. 2914–22.
49. Sellers DJ, Chess-Williams R. Muscarinic agonists and antagonists: Effects on the urinary bladder. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;208:375–400.
50. Bradley WE, Teague CT. Cerebellar influence on the micturition reflex. *Exp Neurol*. 1969;23(3):399–411.
51. Šitum M, Gotovac J. *Urologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
52. Haschek WM, Rousseaux CG. Handbook of toxicologic pathology. *Handb Toxicol Pathol King G Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(9):1138–9.
53. Panicker ABJN. Lower Urinary Tract Dysfunction and the Nervous System. In: Aminoff M, Josephson SA, editors. *Aminoff's Neurology and General Medicine: Fifth Edition*. Elsevier Inc.; 2014. 613–31.
54. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
55. Grayson M. Bladder Cancer. *Nature*. 2017;551(7679):S33.
56. Park SK. Epidemiology. In: Ku JH, editor. *Bladder Cancer*. Elsevier Inc.; 2018. 3–20.
57. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al.

- Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:1–19.
58. McGrath M, Michaud DS, De Vivo I. Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women. *Am J Epidemiol*. 2006;163(3):236–44.
 59. Lukas C, Selinski S, Prager HM, Blaszkewicz M, Hengstler JG, Golka K. Occupational bladder cancer: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes, exposures, and prognosis. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2017;80(7–8):439–52.
 60. Letašiová S, Medveová A, Ovíková A, Duinská M, Volkovová K, Mosoiu C, et al. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Heal*. 2012;11(Suppl 1):S11.
 61. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 2000;77(1):41–51.
 62. Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, Catto JWF. Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(9):1282–90.
 63. Al-Zalabani AH, Stewart KFJ, Wesselius A, Schols AMWJ, Zeegers MP. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*. 2016;31(9):811–51.
 64. Benjamin RM. Exposure to tobacco smoke causes immediate damage: A report of the surgeon general. *Public Health Rep*. 2011;126(2):158–159.
 65. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;306(7):737–45.
 66. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol*. 2018;15(3):143–54.
 67. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):106–19.
 68. Park JH, Moon KC. Tumor, Nodes, Metastases (TNM) Classification System for Bladder Cancer. In: Ku JH, editor. *Bladder Cancer*. Elsevier Inc.; 2018. 181–4.
 69. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, et al. Profiling the Urinary Microbiota in Male Patients With Bladder Cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:167.
 70. Kim YA, Moon KC. Histological Classification of Bladder Tumors. In: Ku JH, editor. *Bladder Cancer*. Elsevier Inc.; 2018. 147–80.
 71. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet*. 1999;353(9165):1689–94.
 72. Zlotta AR, Fleshner NE, Jewett MA. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: An update. *J Can Urol Assoc*. 2009;3(6 Suppl 4):S199–S205.
 73. Berdik C, Ashour M. Unlocking bladder cancer. *Nature*. 2017;551(7679):S34–5.
 74. Shin JH, Lim JS, Jeon BH. Pathophysiology of Bladder Cancer. In: Ku JH, editor. *Bladder Cancer*. Elsevier Inc.; 2018. 33–41.
 75. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017;171(3):540–556.e25.
 76. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2010;420(6917):860–7.
 77. Fortuny J, Kogevinas M, Zens MS, Schned A, Andrew AS, Heaney J, et al. Analgesic

- and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: A population based case control study. *BMC Urol.* 2007;7(13).
78. David B. Thompson, Larry E. Siref, Michael P. Feloney, Ralph J. Hauke and DKA. Immunological Basis in the Pathogenesis and Treatment of Bladder Cancer. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(2):265–79.
 79. Abraham SN, Miao Y. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(10):655–63.
 80. Ho PL, Lay EJ, Jian W, Parra D, Chan KS. Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 2012;72(13):3135–42.
 81. Morales A. Treatment of carcinoma in situ of the bladder with BCG - A phase II trial. *Cancer Immunol Immunother.* 1980;9:69–72.
 82. Larsen ES, Joensen UN, Poulsen AM, Goletti D, Johansen IS. Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. *APMIS.* 2020;128(2):92–103.
 83. Domingos-Pereira S, Cesson V, Chevalier MF, Derré L, Jichlinski P, Nardelli-Haeffliger D. Preclinical efficacy and safety of the TY21a vaccine strain for intravesical immunotherapy of non-muscle-invasive bladder cancer. *Oncoimmunology.* 2017;6(1):1–7.
 84. Alhunaidi O, Zlotta AR. The use of intravesical BCG in urothelial carcinoma of the bladder. *Ecancermedicalscience.* 2019;13(905).
 85. Zhao W, Schorey JS, Bong-Mastek M, Ritchey J, Brown EJ, Ratliff TL. Role of a bacillus calmette-guerin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. *Int J Cancer.* 2000;86(1):83–8.
 86. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer-A current perspective. *Nat Rev Urol.* 2014;11(3):153–62.
 87. Ingersoll MA, Albert ML. From infection to immunotherapy: Host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal Immunol.* 2013;6(6):1041–53.
 88. De Boer EC, De Jong WH, Van Der Meijden APM, Steerenberg PA, Witjes JA, Vegt PDJ, et al. Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunol Immunother.* 1991;33(6):411–6.
 89. Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1993;150(3):1018–23.
 90. Seow SW, Rahmat JN, Bay BH, Lee YK, Mahendran R. Expression of chemokine/cytokine genes and immune cell recruitment following the instillation of Mycobacterium bovis, bacillus Calmette- Guérin or Lactobacillus rhamnosus strain GG in the healthy murine bladder. *Immunology.* 2008;124(3):419–27.
 91. Ayari C, Bergeron A, Larue H, Mnard C, Fradet Y. Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. *J Urol.* 2011;185(5):1915–21.
 92. Bevers RFM, Kurth KH, Schamhart DHJ. Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer.* 2004;91(4):607–12.
 93. Hahn NM, Burton JP, Ingersoll MA, Sfanos KS, Vareki SM, Markowski MC, et al. The Microbiome and Genitourinary Cancer: A Collaborative Review. *Eur Urol.* 2019;75(4):637–46.
 94. Davis CP, Cohen MS, Hackett RL, Anderson MD, Warren MM. Urothelial hyperplasia

- and neoplasia. III. Detection of nitrosamine production with different bacterial genera in chronic urinary tract infections of rats. *J Urol*. 1991;145(4):875–80.
95. Ainsworth C. MICROBIOME: A bag of surprises. *Nature*. 2017;551(7679):S40–1.
 96. Seow SW, Rahmat JNB, Mohamed AAK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. *Lactobacillus* species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than *Mycobacterium Bovis* (bacillus Calmette-Guerin). *J Urol*. 2002;168(5):2236–229.
 97. Shih Wee S, Yuan Kun L, Boon Huat B, Mahendran R. *Lactobacillus*: An alternative immunotherapy for bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(22 Supplement).
 98. Karlsson M, Scherbak N, Reid G, Jass J. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 enhances NF-kappaB activation in *Escherichia coli*-stimulated urinary bladder cells through TLR4. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):15.
 99. Hayatsu H, Hayatsu T. CANCER urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef. 1993;73:173–9.
 100. Xu W, Yang L, Lee P, Huang WC, Nossa C, Ma Y, et al. Mini-review: perspective of the microbiome in the pathogenesis of urothelial carcinoma. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(1):57–61.
 101. Mai G, Chen L, Li R, Liu Q, Zhang H, Ma Y. Common core bacterial biomarkers of bladder cancer based on multiple datasets. *Biomed Res Int*. 2019;2019(4824909).
 102. Rodriguez RM, Hernandez BY, Menor M, Deng Y, Khadka VS. The landscape of bacterial presence in tumor and adjacent normal tissue across 9 major cancer types using TCGA exome sequencing. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:631–41.
 103. Liu F, Liu A, Lu X, Zhang Z, Xue Y, Xu J, et al. Dysbiosis Signatures of the Microbial Profile in Tissue from Bladder Cancer. *Cancer Med*. 2019;8(16):1–4.
 104. Colaço A, Lopes C, Oliveira PA. BBN as an Urothelial Carcinogen. 2012;740:727–39.
 105. Santos L, Amado F, Bernardo C, Costa C, Freitas R, Oliveira P, et al. What we have learned from urinary bladder cancer models. *J Cancer Metastasis Treat*. 2015;2:51–8.
 106. Nagao M, Suzuki E, Yasuo K, Nagao M, Suzuki E, Yasuo K, et al. Mutagenicity of N - Butyl- N - (4-hydroxybutyl) nitrosamine , a Bladder Carcinogen , and Related Compounds Mutagenicity of N-Butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine , a Bladder Carcinogen , and Related Compounds. 1977;(February):399–407.
 107. Oliveira PA. The N-butyl-N-4-hydroxybutyl Nitrosamine Mouse Urinary Bladder Cancer Model. 2018;1655:155–67.
 108. Suzuki E. The metabolic fate of N-butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine in the rat. Gann, Japanese J Cancer Res. 1980;71:856–62.
 109. Hashimoto Y, Suzuki K, Okada M. Induction of urinary bladder tumors by intravesicular instillation of butyl(4 hydroxybutyl)nitrosoamine and its principal urinary metabolite, butyl(3 carboxypropyl)nitrosoamine in rats. Gann, Japanese J Cancer Res. 1974;65(1):69–73.
 110. Kobayashi T, Owczarek TB, McKiernan JM, Abate- C, Biology C, Irving H, et al. Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):42–54.
 111. Fantini D, Glaser AP, Rimar KJ, Wang Y, Schipma M, Varghese N, et al. A Carcinogen-induced mouse model recapitulates the molecular alterations of human muscle invasive bladder cancer. *Oncogene*. 2018;37(14):1911–25.
 112. Degoricija M, Korac-Prlic J, Vilovic K, Ivanisevic T, Haupt B, Palada V, et al. The

- dynamics of the inflammatory response during BBN-induced bladder carcinogenesis in mice. *J Transl Med.* 2019;17(1):394.
113. Forster, Catherine S., James J. Cody, Nirad Banskota, Crystal Stroud, Yi-Ju Hsieh, Dannah Farah, Olivia Lamanna, Olfat Hammam, Ljubica Caldovic MHH. Profiling of urine bacterial DNA to identify an “oncobiome” in a mouse model of bladder cancer. *bixriv.* 2018.
 114. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):1–21.
 115. Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27–30.
 116. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics.* 2009;10(1):161.
 117. Luo W, Brouwer C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics.* 2013;29(14):1830–1.
 118. Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(18):6424–31.
 119. Ozaki K, Sukata T, Yamamoto S, Uwagawa S, Seki T, Kawasaki H, et al. High susceptibility of p53(+/-) knockout mice in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine urinary bladder carcinogenesis and lack of frequent mutation in residual allele. *Cancer Res.* 1998;58(17):3806–11.
 120. He Y-WW, Li H, Zhang J, Hsu C-LL, Lin E, Zhang N, et al. The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens. *Nat Immunol.* 2004;5(1):88–97.
 121. Carrillo GL, Su J, Monavarfeshani A, Fox MA. F-spondin Is Essential for Maintaining Circadian Rhythms. *Front Neural Circuits.* 2018;12:13.
 122. Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell.* 2007;131(6):1047–58.
 123. Li Y, Yang J, Li S, Zhang J, Zheng J, Hou W, et al. N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 2011;286(37):32289–99.
 124. Lu B, Zhang Q, Wang H, Wang Y, Nakayama M, Ren D. Extracellular Calcium Controls Background Current and Neuronal Excitability via an UNC79-UNC80-NALCN Cation Channel Complex. *Neuron.* 2010;68(3):488–99.
 125. Tamano S, Shirai T, Kawabe M, Ni IH, Mori Y, Okada M, et al. Low susceptibility of nude mice to induction of invasive urinary bladder cancers by N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Toxicol Pathol.* 1992;20(2):205–11.
 126. Lahiri S, Kim H, Garcia-Perez I, Reza MM, Martin KA, Kundu P, et al. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med.* 2019;11(502).
 127. Qiao LY, Xia C, Shen S, Lee SH, Ratz PH, Fraser MO, et al. Urinary bladder organ hypertrophy is partially regulated by Akt1-mediated protein synthesis pathway. *Life Sci.* 2018;201:63–71.
 128. Thaïss CA, Levy M, Korem T, Dohnalová L, Shapiro H, Jaitin DA, et al. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell.* 2016;167(6):1495–1510.e12.

129. Noh JY, Han DH, Kim MH, Ko IG, Kim SE, Park N, et al. Presence of multiple peripheral circadian oscillators in the tissues controlling voiding function in mice. *Exp Mol Med*. 2014;46(e81).
130. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*. 2016;167(4):915–32.
131. Chamero P, Marton TF, Logan DW, Flanagan K, Cruz JR, Saghatelian A, et al. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*. 2007;450(7171):899–902.
132. Weger BD, Dric Gobet C, Yeung J, Chou J, Naef F. The Mouse Microbiome Is Required for Sex-Specific Diurnal Rhythms of Gene Expression and Metabolism. *Cell Metab*. 2019;29(2):362–382.e8.
133. Sjögren K, Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res*. 2012;27(6):1357–67.
134. Hu F, Zhang L, Zheng J, Zhao L, Huang J, Shao W, et al. Spontaneous Production of Immunoglobulin M in Human Epithelial Cancer Cells. Fuxe J, editor. *PLoS One*. 2012;7(12):e51423.
135. Arora PK. Bacilli-Mediated Degradation of Xenobiotic Compounds and Heavy Metals. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:570307.
136. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*. 2017;279(1):90–105.
137. Godaly G, Hang L, Frendéus B, Svanborg C. Transepithelial Neutrophil Migration Is CXCR1 Dependent In Vitro and Is Defective in IL-8 Receptor Knockout Mice. *J Immunol*. 2000;165(9):5287–94.
138. Agace WW, Patarroyo M, Svensson M, Carlemalm E, Svanborg C. *Escherichia coli* induces transuroepithelial neutrophil migration by an intercellular adhesion molecule-1-dependent mechanism. *Infect Immun*. 1995;63(10):4054–62.
139. Murai T, Mori Y, Tatematsu K, Koide A, Hagiwara A, Makino S, et al. Differences in susceptibility to N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis between SD/gShi rats with spontaneous hypospermatogenesis and SD/cShi rats with spontaneous hydronephrosis. *Cancer Sci*. 2005;96(10):637–44.
140. Albenberg L, Esipova T V., Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*. 2014;147(5):1055–1063.e8.

KRATKA BIOGRAFIJA

BLANKA ROJE, *Medicinski Fakultet Sveučilišta u Splitu, Šoltanska 2, Split, Hrvatska, blanka.roje@mefst.hr*

RADNO ISKUSTVO

Doktorand, Laboratorij za istraživanja raka, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
[2016 - trenutno]
Učitelj pripravnik biologije, Osnovna škola Dobri Split
[05/2016 - 10/2016]
Volonter istraživač, Kemijski odjel Sveučilišta u Splitu Prirodoslovno-matematički fakultet
[06/2015 - 05/2016]

OBRAZOVANJE

Poslijediplomski studij "Translacijska istraživanja u biomedicine"
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
[2016 - trenutno]
Magistar edukacije biologije i kemije,
Sveučilište u Splitu Prirodoslovno-matematički fakultet
[2013 - 2015]
Prvostupnik Biologije i kemije,
Sveučilište u Splitu Prirodoslovno-matematički fakultet
[2010 - 2013]

OBJAVLJENI RADOVI

The urinary microbiome associated with bladder cancer,
Bučević Popović V, Šitum M, Chow CET, Chan LS, Roje B, Terzić J.
DOI: 10.1038/s41598-018-29054-w
Scientific Reports, 2018; 8 (1).

Microbiota Alters Urinary Bladder Weight and Gene Expression,
Roje B, Elek A, Palada V, Bom J, Iljazović A, Šimić A, Šušak L, Vilović K, Strowig T, Vlahoviček K, Terzić J
DOI: 10.3390/microorganisms8030421
Microorganisms 2020; 8 (3), 421.

KONFERENCIJE I USAVRŠAVANJA

Tromjesečno usavršavanje u laboratoriju Michaela Zimmermanna, EMBL, Heidelberg, Njemačka, 2020.
Konferencija „*New approaches and concepts in microbiology*“, poster prezentacija „*Microbiome dependent urinary bladder gene expression*“, EMBL, Heidelberg, Njemačka, 2019.
Tečaj za rad s laboratorijskim životinjama za istraživače, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu – TRIBE, Split, 2017.
Tečaj iz protočne citometrije, Dječja bolnica Srebrnjak, Zagreb, 2017.
SIICA Škola imunologije, Messina, Italija, 2018.